



(21) 申請案號：110149370 (22) 申請日：中華民國 110 (2021) 年 12 月 29 日

(51) Int. Cl. : *C12N5/0783 (2010.01)* *C12N15/12 (2006.01)*  
*C12N5/10 (2006.01)* *A61K35/17 (2015.01)*  
*A61P37/02 (2006.01)*

(30) 優先權：2020/12/30 美國 63/131,987

(71) 申請人：美商英特利亞醫療公司 (美國) INTELLIA THERAPEUTICS, INC. (US)  
 美國

(72) 發明人：魯杜羅 克立絲多福 RUDULIER, CHRISTOPHER (CA)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：57 項 圖式數：10 共 269 頁

## (54) 名稱

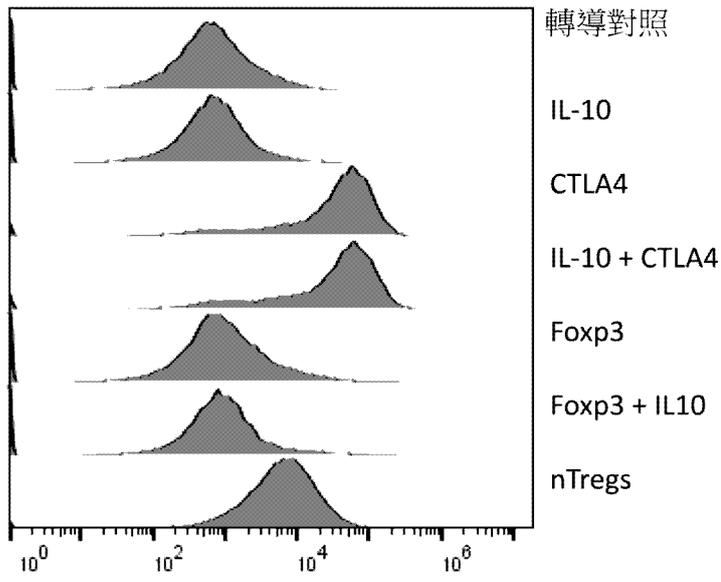
工程化之 T 細胞

## (57) 摘要

本發明係關於經工程化以包含編碼 IFNG 之內源性核酸序列之修飾(例如減弱(knockdown))、編碼 TNFA 之內源性核酸序列之修飾(例如減弱)及編碼調節 T 細胞促進分子之序列插入之 T 細胞，及其組合物及用途。

The present disclosure relates to T cells engineered to comprise a modification, e.g., knockdown, of an endogenous nucleic acid sequence encoding an IFNG, a modification, e.g., knockdown, of an endogenous nucleic acid sequence encoding a TNFA, and insertion of sequence(s) encoding a regulatory T cell promoting molecule and compositions and uses thereof.

指定代表圖：



【圖1A】

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

工程化之T細胞

### 【英文發明名稱】

ENGINEERED T CELLS

### 【中文】

本發明係關於經工程化以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如減弱(knockdown))、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如減弱)及編碼調節T細胞促進分子之序列插入之T細胞，及其組合物及用途。

### 【英文】

The present disclosure relates to T cells engineered to comprise a modification, e.g., knockdown, of an endogenous nucleic acid sequence encoding an IFNG, a modification, e.g., knockdown, of an endogenous nucleic acid sequence encoding a TNFA, and insertion of sequence(s) encoding a regulatory T cell promoting molecule and compositions and uses thereof.

### 【指定代表圖】

圖1A

### 【代表圖之符號簡單說明】

無

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

工程化之T細胞

### 【英文發明名稱】

ENGINEERED T CELLS

### 【技術領域】

### 【先前技術】

【0001】 適應性免疫係一種防禦機制，身體藉由該防禦機制可消除外源病原體。T細胞係可介導此免疫反應之免疫細胞。T細胞受體(TCR)係T細胞表面上可識別抗原之蛋白質複合物。T細胞多樣性來源於TCR  $\alpha$ 及 $\beta$ 基因座之重排。

【0002】 適應性免疫之一個特徵係區分「自身」與「非自身」抗原之能力。自體免疫及自體發炎疾患之特徵在於針對「自身」抗原之致病性免疫反應。一些重排TCR  $\alpha$ 及 $\beta$ 基因座產生自反應性T細胞。Owen等人，Regulatory T Cell Development in the Thymus, J Immunol 203(8) (2019)。許多自反應性T細胞由於在胸腺中經純系缺失而被消除，但其他T細胞可逃避純系缺失並引起有害之免疫反應。同上。稱為調節T細胞(Treg)之特化T細胞對「自體」耐受性而言很重要。同上。Treg可抑制過度之免疫反應、自體免疫反應及非所需之免疫反應，例如於移植物抗宿主疾病中。同上。Treg之失調(例如，若Treg之數量不足或若Treg功能不正常)可有助於自體免疫反應。同上。

【0003】 用於治療自體免疫疾患之當前療法旨在抑制適應性免疫過程或免疫細胞之活化。儘管此等療法可抑制有害之免疫反應，例如，自體

免疫反應，但其等亦可抑制有利之免疫反應。Treg療法已用以抑制不同疾病，包括移植物抗宿主疾病(GvHD)中之抗原特異性免疫反應，其中供體細胞在造血幹細胞移植後介導宿主組織之免疫攻擊。Pierini等人，T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptor Promoter Immune Tolerance, JCI Insight 2(20) (2017)。然而，「基於Treg之療法之臨床實施仍存在重大挑戰」。同上。因此，仍需有效T細胞療法(包括Treg療法)，以抑制免疫反應，包括發炎及自體免疫。

### 【發明內容】

【0004】 本發明提供T細胞或T細胞群體，該等T細胞或T細胞群體經工程化以包含編碼調節T細胞促進分子之異源性核酸，其在啟動子序列控制下；編碼干擾素 $\gamma$  (IFNG)之內源性核酸序列之修飾，其中該修飾減弱該IFNG之表現；及編碼腫瘤壞死因子 $\alpha$  (TNFA)之內源性核酸序列之修飾，其中該修飾減弱TNFA之表現，及其組合物及用途，例如，用於抑制免疫反應，包括發炎及自體免疫。在一些實施例中，該調節T細胞促進分子係選自介白素-10 (IL10)、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA4)、轉化生長因子 $\beta$ 1 (TGFB1)、吲哚胺2,3-二氧酶1 (IDO1)、外核昔三磷酸二磷酸水解酶1 (ENTPD1)、5'-外核昔酸酶(NT5E)、介白素-22 (IL-22)、雙調蛋白(AREG)、介白素-35 (IL35)、GARP、CD274分子(CD274)、叉頭盒P3 (FOXP3)、IKAROS家族鋅指2 (IKZF2)、家族性嗜酸性粒細胞增多症 (eosinophilia familial)(EOS)、干擾素調節因子4 (IRF4)、淋巴增強結合因子1 (LEF1)，及BTB域及CNC同源物2 (BACH2)。

【0005】 在一些實施例中，T細胞或T細胞群體係經工程化以包含編碼IL10之異源性核酸，其在啟動子序列控制下；編碼IFNG之內源性核酸

序列之修飾，其中該修飾減弱該IFNG之表現；及編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾，其中該修飾減弱TNFA之表現。

**【0006】** 在一些實施例中，T細胞或T細胞群體係經工程化以包含編碼CTLA4之異源性核酸，其在啟動子序列控制下；編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾，其中該修飾減弱該IFNG之表現；及編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾，其中該修飾減弱TNFA之表現。

**【0007】** 在一些實施例中，T細胞或T細胞群體係經工程化以包含編碼IL10及CTLA4之異源性核酸序列，各者均於啟動子序列控制下；編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾，其中該修飾減弱該IFNG之表現；及編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾，其中該修飾減弱TNFA之表現。

**【0008】** 在一些實施例中，T細胞或T細胞群體係經進一步工程化以包含編碼以下之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)：介白素17A (IL17A)、介白素-2 (IL2)、介白素6 (IL6)、穿孔蛋白1 (PRF1)、顆粒酶A (GZMA)或顆粒酶B (GZMB)。

**【0009】** 在一些實施例中，T細胞或T細胞群體係經進一步工程化以包含編碼內源性T細胞受體(TCR)之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)。

**【0010】** 在一些實施例中，T細胞或T細胞群體係經進一步工程化以包含靶向受體之異源性編碼序列，其在啟動子序列控制下。在一些實施例中，該靶向受體包含嵌合抗原受體(CAR)或T細胞受體(TCR)。在一些實施例中，該靶向受體靶向選自以下之配體：黏膜血管位址素(addressin)細胞黏附分子1 (MADCAM1)、腫瘤壞死因子 $\alpha$  (TNFA)、CEA細胞黏附分子6 (CEACAM6)、血管細胞黏附分子1 (VCAM1)、瓜胺酸化波形蛋白

(vimentin)、髓鞘鹼性蛋白(MBP)、MOG (髓鞘寡樹突膠細胞糖蛋白)、蛋白脂蛋白1 (PLP1)、CD19分子(CD19)、CD20分子(CD20)、TNF受體超家族成員17 (TNFRSF17)、二肽基肽酶樣6 (DPP6)、溶質載體家族2成員2 (SCL2A2)、麩胺酸脫羧酶(GAD2)、橋粒芯蛋白(desmoglein)3 (DSG3)，及MHC I類HLA-A (HLA-A\*02)。

**【0011】** 在一些實施例中，T細胞群體之至少30%、35%，較佳至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%包含編碼調節T細胞促進分子之序列之插入，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。在一些實施例中，T細胞群體之至少50%、55%、60%、65%，較佳至少70%、75%、80%、85%、90%或95%包含修飾(例如，減弱)於IFNG序列中，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。在一些實施例中，T細胞群體之至少50%、55%、60%、65%，較佳至少70%、75%、80%、85%、90%或95%包含修飾(例如，減弱)於TNFA序列中，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。在一些實施例中，T細胞群體之至少50%、55%、60%、65%，較佳至少70%、75%、80%、85%、90%或95%包含修飾(例如，減弱)於TCR序列中，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。在一些實施例中，T細胞群體之至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%包含編碼靶向受體(例如，CAR)之序列之插入，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。

**【0012】** 本文描述之用於減弱基因表現之修飾可包含插入、缺失或取代中之一或多者。本文描述之異源性序列可併入表現構築體內。多種異源性序列可併入單一表現構築或併入各別表現構築體內。本文描述之異源性序列可併入游離基因體表現構築體內。本文描述之異源性序列可插入基

因體內，例如，非靶向插入或靶向插入。在一些實施例中，該靶向插入係於選自以下之位點內：TCR基因座、TNF基因座、IFNG基因座、IL17A基因座、IL6基因座、IL2基因座、腺相關病毒整合位點1 (AAVS1)基因座。

**【0013】** 本文亦提供工程化之T細胞之醫藥組合物及用途。在一些實施例中，該等工程化之T細胞及其醫藥組合物可對需免疫抑制之個體投與。在一些實施例中，該等工程化之T細胞及其醫藥組合物可適用於治療免疫疾病或自體免疫疾病，例如，潰瘍性結腸炎、克羅恩氏病(Crohn's disease)、類風濕性關節炎、牛皮癬、多發性硬化症、全身性紅斑狼瘡、1型糖尿病，及移植物抗宿主疾病(GvHD)。

**【0014】** 在一些實施例中，本文描述之序列之插入或序列之修飾(例如，減弱)可由引導RNA與RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas核酸酶)之組合介導。在一些實施例中，本文描述之序列之插入或序列之減弱可由另一合適之基因編輯系統，例如，鋅指核酸酶(ZFN)系統或轉錄活化因子樣效應物核酸酶(TALEN)系統介導。

#### **【圖式簡單說明】**

**【0015】** 圖1A至1E係顯示未經轉導或經指示編碼序列之插入轉導之CD3+CD4+細胞；或於CD3+CD4+CD25+ nTreg中之螢光染色之強度之流式細胞分析技術資料之直方圖。圖1A係經轉導之T細胞或指示對照中CTLA表現之螢光強度的直方圖。圖1B係經轉導之T細胞或指示對照中IL10表現之螢光強度的直方圖。圖1C係經轉導之T細胞或指示對照中Foxp3表現之螢光強度的直方圖。圖1D係經轉導之T細胞或指示對照中Helios表現之螢光強度的直方圖。圖1E係經轉導之T細胞或指示對照中

Eos表現之螢光強度的直方圖。

【0016】 圖2A及2B係顯示來自GvHD之小鼠模型之結果的圖。圖2A係顯示注射經指示編碼序列之插入或指示對照轉導之CD3+CD4+細胞；注射CD4+CD25+ Treg、PBMC或未注射細胞(僅輻射)後存活天數之存活曲線。圖2B係顯示在注射經轉導之CD3+CD4+細胞或如指示之對照後在處死時自小鼠脾分離之人類淋巴細胞之定量的圖。

【0017】 圖3A至3E係顯示來自以指示編碼序列之插入或指示對照轉導之受刺激之CD3+CD4+細胞中活體外細胞介素概況分析之結果的圖。圖3A顯示由經轉導之T細胞或指示對照在細胞刺激後之活體外IL6產生。圖3B顯示由經轉導之T細胞或指示對照在細胞刺激後之活體外TNF- $\alpha$ 產生。圖3C顯示由經轉導之T細胞或指示對照在細胞刺激後之活體外IL10產生。圖3D顯示由經轉導之T細胞或指示對照在細胞刺激後之活體外IL13產生。圖3E顯示由經轉導之T細胞或指示對照在細胞刺激後之活體外IL2產生。圖3F顯示由經轉導之T細胞或指示對照在細胞刺激後之活體外IFN- $\gamma$ 產生。

【0018】 圖4係顯示混合淋巴細胞反應分析中如藉由CTV稀釋量測之經轉導之T細胞對細胞增生之抑制百分比的圖，在混合淋巴細胞反應分析中，使經CTV標記之T細胞及CD-3耗盡之PBMC與指示編碼序列之插入或指示對照轉導之CD3+CD4+細胞以指示比率混合。

【0019】 圖5A至5E係顯示未經轉導或經單獨IL10及CTLA4之編碼序列(未編輯)之插入或與IFNG及TNFA中之一或兩者之剔除(KO)之組合轉導之CD3+CD4+細胞；或CD3+CD4+CD25+ nTreg之螢光染色的強度之流式細胞分析技術資料之直方圖。圖5A係經轉導之T細胞或指示對照中

CTLA4表現之螢光強度的直方圖。圖5B係經轉導之T細胞或指示對照中IL10表現之螢光強度的直方圖。圖5C係經轉導之T細胞或指示對照中FOXP3表現之螢光強度的直方圖。圖5D係經轉導之T細胞或指示對照中Helios表現之螢光強度的直方圖。圖5E係經轉導之T細胞或指示對照中Eos表現之螢光強度的直方圖。

【0020】圖6A及6B係顯示來自GvHD之小鼠模型之結果之圖。圖6A係顯示對小鼠注射PBMC、未經轉導或經單獨IL10及CTLA4之編碼序列(未編輯)之插入或與IFNG及TNFA中之一或兩者之編輯(KO)之組合轉導之CD3+CD4+細胞；注射CD3+CD4+CD25+ nTreg；或未注射細胞(僅輻射)後之存活天數之存活曲線。圖6B係顯示在注射經轉導之CD3+CD4+細胞或如指示之對照細胞後在處死時自小鼠之脾分離之人類淋巴細胞之定量的圖。

【0021】圖7A至7F係顯示來自未經轉導或經單獨IL10及CTLA4之編碼序列(未編輯)之插入或與IFNG或TNFA中之一或兩者之編輯(KO)之組合轉導之受刺激之CD3+CD4+細胞；或CD4+CD25+ nTreg中活體外細胞介素概況分析之結果的圖。圖7A顯示由經轉導之T細胞或指示對照在細胞刺激後之活體外IL6產生。圖7B顯示由經轉導之T細胞或指示對照在細胞刺激後之活體外TNF- $\alpha$ 產生。圖7C顯示由經轉導之T細胞在細胞刺激後之活體外IL10產生。圖7D顯示由經轉導之T細胞在細胞刺激後之活體外IL13產生。圖7E顯示由經轉導之T細胞在細胞刺激後之活體外IL2產生。圖7F顯示由工程化之細胞在細胞刺激後之活體外IFN- $\gamma$ 產生。

【0022】圖8係顯示混合淋巴細胞反應分析中如藉由CTV稀釋量測之工程化之T細胞對細胞增生之抑制百分比的圖，在混合淋巴細胞反應分

析中，使經CTV標記之T細胞及CD-3耗盡之PBMC與指示編碼序列之插入或指示對照轉導之CD3+CD4+細胞以指示比率混合。

**【0023】** 圖9A及9B係顯示來自GvHD之小鼠模型之結果的圖。圖9A係顯示對小鼠注射PBMC、未經轉導或經IL10及CTLA4之編碼序列(野生型(wt)或高親和力(HA)，如指示)之插入與IFNG及TNFA兩者之編輯(KO)之組合轉導之CD3+CD4+細胞；CD3+CD4+CD25+ nTreg；或未注射細胞(媒介物)後存活天數之存活曲線。圖9B係顯示在注射經轉導之CD3+CD4+細胞或如指示之對照細胞後在處死時自小鼠之脾分離之人類淋巴細胞之定量的圖。

**【0024】** 圖10A及10B係顯示混合淋巴細胞分析中如藉由CTV稀釋量測之增生抑制百分比的圖。圖10A顯示在有或無發炎預處理之情況下之增生抑制。圖10B顯示在指示之發炎細胞介素之存在下在有或無進一步發炎預處理之情況下之增生抑制。指示之個別p值係\*p<0.05，\*\*p<0.01，及\*\*\*p<0.001。

#### **【實施方式】**

**【0025】** 現將詳細參考本發明之某些實施例，其等實例闡述於隨附圖式中。儘管結合闡述之實施例描述本發明，但將瞭解該等實施例無意將本發明限制於彼等實施例。相反，本發明意欲涵蓋所有替代、修飾及等同物，其等可包括於如由隨附實施例定義之本發明內。

**【0026】** 本文使用之章節標題僅用於組織目的且不應解釋為以任何方式限制所需標的。在藉由參考併入之任何材料與本說明書中定義之任何術語或本說明書之任何其他表達內容矛盾之事件中，以本說明書為準。

#### **【0027】**

## I. 定義

在詳細描述本教示之前，應瞭解本發明不限於特定組合物或方法步驟，因此其等可變化。應注意，如本說明書及隨附實施例中使用，除非內文另有明確規定，否則單數形式「一」、「一個」及「該」包括複數個參考物。因此，例如，提及「結合物」包括複數個結合物及提及「細胞」包括複數個細胞或細胞群體及類似物。如本文使用，術語「包括」及其語法變體意欲非限制性的，使得清單中項目之引用不排除可經取代或添加至列舉項目之其他類似項目。

**【0028】** 數值範圍包括界定該範圍之數字。應瞭解考慮到有效數字及與量測相關聯之誤差，量測值及可量測值係近似值。同樣，使用「包含 (comprise)」、「包含 (comprises)」、「包含 (comprising)」、「含有 (contain)」、「含有 (contains)」、「含有 (containing)」、「包括 (include)」、「包括 (includes)」及「包括 (including)」無意為限制性的。應瞭解先前一般描述及實施方式兩者均僅為例示性及解釋性的且非限制本教示。

**【0029】** 除非本說明書中明確提及，否則列舉「包含」各種組件之本說明書中之實施例亦審慎考慮為「由列舉組件構成」或「基本上由由列舉組件構成」；列舉「由各種組件構成」之本說明書中之實施例亦審慎考慮為「包含列舉組件」或「基本上由列舉組件構成」；及列舉「基本上由各種組件構成」之本說明書中之實施例亦審慎考慮為「由列舉組件構成」或「包含列舉組件」(此可互換性不適用於此等術語於隨附申請專利範圍中之用途)。

**【0030】** 除非內文另有明確指示，否則術語「或」以包容性意義使

用，即，等同於「及/或」。

**【0031】** 當在清單或範圍前使用術語「約」時，術語「約」修飾該清單之各成員或該範圍之各端點。術語「約」或「大約」意謂如由一般技術者確定之特定值之可接受誤差，其部分取決於量測或確定該值之方式。本文使用術語「約」意謂於此項技術中之典型公差範圍內。例如，「約」可瞭解為與平均值相差約2個標準差。在某些實施例中，約意謂+10%。在某些實施例中，約意謂+5%。

**【0032】** 應瞭解如自內文顯而易見，在一個數字或一系列數字前之術語「至少」包括與術語「至少」相鄰之數字，及邏輯上可包括之所有後續數字或整數。例如，核酸分子中核苷酸之數量必須係整數。例如，「20個核苷酸核酸分子之至少17個核苷酸」意謂17、18、19或20個核苷酸具有指示性質。當至少出現在一系列數字或範圍前時，應瞭解「至少」可修飾該等系列或範圍中之各數字。

**【0033】** 如本文使用，「不超過」或「小於」應瞭解為與片語相鄰之值及邏輯較低值或整數，如自內文邏輯至零。例如，「不超過2個核苷酸鹼基對」之雙螺旋區域具有2、1或0個核苷酸鹼基對。當「不超過」或「小於」出現在一系列數字或範圍前時，應瞭解修飾該等序列或範圍中之各數字。

**【0034】** 如本文使用，範圍包括上限及下限兩者。

**【0035】** 如本文使用，應瞭解當一個值之最大量由100%（例如，100%抑制或100%封裝）表示時，該值受偵測方法限制。例如，100%抑制應瞭解為抑制至低於分析之偵測程度的程度，及100%封裝應瞭解為於囊泡外不可偵測到旨在用於封裝之材料。

【0036】 除非另有說明，否則如本文使用之下列術語及片語意欲具有下列含義。

【0037】 如本文使用，「減弱」係指藉由基因編輯減少特定基因產物(例如，全長或野生型mRNA、蛋白質或兩者)於(例如)細胞、細胞群體、組織或器官中之表現。在一些實施例中，基因編輯可由序列，例如，下一代測序(NGS)評估。如相較於合適對照(例如，其中尚未修飾基因序列)，表現可減少至少70%、75%、80%、85%、90%、95%，或減少至低於分析之偵測程度。蛋白質之減弱可藉由自受關注之組織、細胞群體或流體偵測該蛋白質之量進行量測。用於量測mRNA之減弱之方法係已知且包括自受關注之組織或細胞群體分離之mRNA之測序。流式細胞分析技術分析係一種用於量測蛋白質表現之減弱的已知方法。針對分泌之蛋白質，可於流體(諸如組織培養基或血液，或來源於其之血清或血漿)中評估減弱。在一些實施例中，「減弱」可係指特定基因產物之表現之一些損失，例如轉錄或轉譯為全長蛋白質之全長、野生型mRNA之量減少，或由一群細胞表現之蛋白質之量減少。眾所周知，mRNA序列中之變化將導致野生型或全長蛋白質之表現減少。在一些實施例中，「減弱」可係指特定基因產物(例如，體液或組織培養基中之IFNG或TNFA基因產物)之表現之一些損失。內源性核酸序列(例如，編碼IFNG或TNFA)之修飾可導致減弱。

【0038】 如本文使用，「T細胞受體」或「TCR」係指T細胞中之受體。一般而言，TCR係含有兩個TCR多肽鏈( $\alpha$ 及 $\beta$ )之異二聚體受體分子。 $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈TCR多肽可與各種CD3分子複合，並在抗原結合後引起免疫反應，包括發炎及自體免疫。如本文使用，TCR之減弱係指任何TCR基因部分或完全減弱，例如，TRBC1基因之部分之缺失，單獨或與其他TCR基因部

分或完全減弱組合。

【0039】 「TRAC」用以係指T細胞受體 $\alpha$ 鏈。人類野生型TRAC序列可於NCBI Gene ID：28755；Ensembl：ENSG00000277734獲得。T細胞受體 $\alpha$ 恆定、TCRA、IMD7、TRCA及TRA係TRAC之基因同義詞。

【0040】 「TRBC」用以係指T細胞受體 $\beta$ 鏈，例如，TRBC1及TRBC2。「TRBC1」及「TRBC2」係指兩個編碼T細胞受體 $\beta$ 鏈之同源性基因，T細胞受體 $\beta$ 鏈係TRBC1或TRBC2基因之基因產物。

【0041】 人類野生型TRBC1序列可於NCBI Gene ID：28639；Ensembl：ENSG00000211751獲得。T細胞受體 $\beta$ 恆定，V\_區段轉譯產物，BV05S1J2.2、TCRBC1及TCRB係TRBC1之基因同義詞。

【0042】 人類野生型TRBC2序列可於NCBI Gene ID：28638；Ensembl：ENSG00000211772獲得。T細胞受體 $\beta$ 恆定，V\_區段轉譯產物，及TCRBC2係TRBC2之基因同義詞。

【0043】 如本文使用，「免疫反應」係指一或多種免疫系統反應，例如，相較於未受刺激之對照免疫系統，免疫系統細胞諸如(但不限於) T細胞、B細胞、自然殺手細胞、單核球、嗜中性球、嗜酸性球、嗜鹼性球、肥大細胞、紅血球、樹突細胞、抗原呈遞細胞、巨噬細胞或吞噬細胞之產生或活性增加。該免疫系統曝露於抗原(例如，外源或自體抗原諸如(但不限於)病原體(微生物、病毒、普里昂蛋白、真菌等)、過敏原(灰塵、花粉、塵蟎等)、毒素(化學品、藥物等)或生理變化(高膽固醇血症、肥胖、器官移植等))可引起免疫反應。免疫反應亦可包括其中於GvHD中造血幹細胞移植後供體細胞介導宿主組織之免疫攻擊之反應。該免疫反應可導致發炎。該免疫反應可靶向、攻擊、移除或中和抗原(例如，外源或自

體抗原)。該免疫反應可為或可不為所需。該免疫反應可為急性或慢性的。該免疫反應可損害該免疫反應針對之細胞、組織或器官。

**【0044】** 如本文使用，「自體免疫反應」係指一或多種免疫系統對例如由個體自身之細胞、組織或器官產生之自體抗原之反應。相較於合適對照(例如，健康對照)，該自體免疫反應可導致免疫系統細胞諸如(但不限於) T細胞、B細胞、自然殺手細胞、單核球、嗜中性球、嗜酸性球、嗜鹼性球、肥大細胞、紅血球、樹突細胞、抗原呈遞細胞、巨噬細胞或吞噬細胞之產生或活性增加。該自體免疫反應可導致發炎(例如，長期發炎)，或導致自體免疫疾病。該自體免疫反應可靶向、攻擊、移除或中和由個體自身之細胞、組織或器官產生之自體抗原，此可導致自體免疫疾病。

**【0045】** 如本文使用，「抑制」免疫反應係指相較於合適對照(例如，未經本文描述之工程化之T細胞處理或在用本文描述之工程化之T細胞處理之前)，降低或抑制一或多種免疫系統反應(例如，免疫系統細胞之產生或活性)之程度。「抑制」免疫反應可係指相較於合適對照(例如，未經本文描述之工程化之T細胞處理或在用本文描述之工程化之T細胞處理之前)，該等免疫系統細胞之產生或活性降低。「抑制」免疫反應可係指增加免疫耐受性。例如，該等免疫系統細胞之產生或活性可由細胞計數，例如，淋巴細胞計數或脾細胞計數；細胞活性，例如，T細胞分析；或基因或蛋白質表現，例如，生物標誌物表現量測；其中相較於合適對照(例如，未經本文描述之工程化之T細胞處理或在用本文描述之工程化之T細胞處理之前)，該產生或活性降低50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%，或低於該分析之偵測程度。

**【0046】** 如本文使用，「自體免疫疾病」或「自體免疫疾患」係指

以對個體自身之抗原、細胞、組織或器官之病理性免疫反應為特徵之病症。自體免疫疾病及疾患之實例包括(但不限於)：潰瘍性結腸炎、克羅恩氏病、類風濕性關節炎、牛皮癬、多發性硬化症、全身性紅斑狼瘡，及1型糖尿病。在一些實施例中，該等工程化之T細胞具有自體或同種異體用途。

【0047】如本文使用，「免疫疾患」應瞭解為以個體中之病理性或非所需免疫反應為特徵之疾病或病症。在某些實施例中，免疫疾患係自體免疫疾病。在某些實施例中，免疫疾患係GvHD。在某些實施例中，患有免疫疾患之個體需抑制免疫反應。在某些實施例中，患有免疫疾患之個體需增加免疫耐受性。

【0048】「T細胞」在曝露於抗原後之免疫反應中發揮主要作用。例如，當藉由工程化(例如)自幹細胞或藉由轉分化(例如，重編程體細胞)形成T細胞時，T細胞可為天然存在或非天然。藉由細胞表面上存在T細胞受體，可區分T細胞與其他淋巴細胞。此定義中包括習知適應性T細胞，其包括輔助CD4+ T細胞、細胞毒性CD8+ T細胞、記憶T細胞及調節CD4+ T細胞，及先天樣T細胞，包括自然殺手T細胞、黏膜相關不變T細胞及 $\gamma\delta$  T細胞。在一些實施例中，T細胞係CD4+。在一些實施例中，T細胞係CD3+/CD4+。

【0049】「調節T細胞」或「Treg」係指藉由抑制過度免疫反應(包括發炎及自體免疫)於自體耐受性中發揮主要作用之特化T細胞。Treg可為天然存在或非天然，例如，當藉由工程化，例如，藉由編碼IFNG及TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)及至少一個編碼調節T細胞促進分子之序列之插入形成Treg時。天然存在之Treg或天然Treg或nTreg係

通常於胸腺中發育並藉由抑制過度免疫反應發揮作用以促進自體耐受性之特化T細胞。在一些實施例中，細胞(諸如習知T細胞或習知T細胞群體，例如，未針對nTreg細胞之存在富集之T細胞群體)可藉由修飾編碼TNFA及IFNG之內源性核酸序列，例如，減弱編碼TNFA及IFNG之核酸序列，及將編碼調節T細胞促進分子之序列插入細胞內以顯示調節T細胞之表型特性及抑制功能加以工程化，且此等可稱為經轉導或「工程化」之T細胞。在一些實施例中，工程化之T細胞包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾及編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾，及異源性調節T細胞促進分子(諸如IL10或CTLA4)之插入。內源性核酸序列之修飾(例如，減弱內源性基因之表現之修飾)可包含一或多個插入缺失或取代突變於基因體序列中或由其構成。

**【0050】** 如本文使用，「調節T細胞促進分子」係指促進將習知T細胞轉化為調節T細胞之分子(包括免疫抑制分子及Treg轉錄因子)。此外，調節T細胞促進分子亦係指賦予習知T細胞調節活性之分子，包括Treg相關免疫抑制分子及轉錄因子。免疫抑制分子之實例可包括(但不限於)介白素-10 (IL10)、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA4)、轉化生長因子 $\beta$ 1 (TGFB1)、吲哚胺2,3-二氧酶1 (IDO1)、外核苷三磷酸二磷酸水解酶1 (ENTPD1)、5'-外核苷酸酶 (NT5E)、介白素-22 (IL22)、雙調蛋白 (AREG)、介白素-35 (IL35)、含有富含白胺酸重複序列的32 (leucine rich repeat containing 32 ; GARP)、CD274分子 (CD274)、叉頭盒P3 (FOXP3)、IKAROS家族鋅指2 (IKZF2)、家族性嗜酸性粒細胞增多症 (EOS)、干擾素調節因子4 (IRF4)、淋巴增強結合因子1 (LEF1)，及BTB域及CNC同源物2 (BACH2)。在一些實施例中，調節T細胞促進分子可以

特定組合(例如，IL10及CTLA4、ENTPD1及NT5E，及IL22及AREG)使用。特定言之，本文提供IL10及CTLA4組合。在一些實施例中，免疫抑制分子之表現可由轉錄因子(諸如FoxP3、Helios、Eos、IRF4、Lef1或BACH2)之表現促進。

**【0051】** 在一些實施例中，習知T細胞可經工程化以修飾、插入或刪除基因體中之序列，及「工程化」之T細胞顯示天然調節T細胞之一或多種表型特性及抑制功能。例如，該「工程化」之T細胞在如下文實例2及3提供之混合淋巴細胞反應分析中顯示抑制活性，或較佳可在下文實例2及3呈現之小鼠模型中，較佳以統計學顯著方式抑制移植物抗宿主疾病(亦參見，例如，Parmar等人，*Ex vivo fucosylation of third-party human regulatory T cells enhances anti-graft-versus-host disease potency in vivo*, *Blood* 125(9) (2015))。在一些實施例中，該「工程化」之T細胞係已經調節T細胞促進分子之編碼序列之插入修飾，及具有促發炎細胞介素(例如，IFNG及TNFA兩者)之表現之修飾(例如，減弱)的習知T細胞。在一些實施例中，用於工程化之起始T細胞群體未針對天然Treg之存在富集，例如，該起始T細胞群體具有小於20%之天然Treg。

**【0052】** 如本文使用，「促發炎」分子(例如，細胞介素)增加如本文描述之免疫反應，例如，以劑量反應方式減小Treg在實例2及3呈現之移植物抗宿主疾病之小鼠模型中之效用。促發炎分子之實例包括(但不限於)IFNG、TNFA、IL17A、IL6、IL2、穿孔蛋白1 (PRF1)、顆粒酶A (GZMA)、顆粒酶B (GZMB)。

**【0053】** 如本文使用，「靶向受體」係指存在於細胞(例如，T細胞)之表面上以允許該細胞結合至靶位點(例如，有機體中之特定細胞或組織)

之受體。靶向受體包括(但不限於)嵌合抗原受體(CAR)、T細胞受體(TCR)，及通過內部傳訊域中之至少一個跨膜域可操作地連接之細胞表面分子之受體，內部傳訊域在一經結合蛋白質之細胞外受體部分即可活化T細胞，舉例而言，該蛋白質為黏膜位址素細胞黏附分子-1 (MadCAM-1)、TNFA、CEA細胞黏附分子6 (CEACAM6)、血管細胞黏附分子1 (VCAM1)、瓜胺酸化波形蛋白、髓鞘鹼性蛋白(MBP)、MOG (髓鞘寡樹突膠細胞醣蛋白)、蛋白脂蛋白1 (PLP1)、CD19分子(CD19)、CD20分子(CD20)、TNF受體超家族成員17 (TNFRSF17)、溶質載體家族2成員2 (SCL2A2)、麩胺酸脫羧酶(GAD2)、橋粒芯蛋白3 (DSG3)，及MHC I類HLA-A (HLA-A\*02)。

**【0054】** 如本文使用，「嵌合抗原受體」係指細胞外抗原識別域，例如，scFv、VHH、奈米抗體；可操作地連接至細胞內傳訊域，當結合抗原時其活化T細胞。CAR由四個區域構成：抗原識別域、細胞外鉸鏈區、跨膜域及細胞內T細胞傳訊域。此等受體為此項技術中熟知(參見，例如，WO2020092057、WO2019191114、WO2019147805、WO2018208837，其等中之各者之內容之相應部分係以引用之方式併入本文中)。亦審慎考慮通過銜接分子促進免疫細胞結合至靶細胞之反向通用CAR (參見，例如，WO2019238722，該案之內容係以全文引用之方式併入本文中)。CAR可靶向可發展抗體之任何抗原且通常針對顯示於待靶向之細胞或組織之表面上的分子。在一些實施例中，該CAR可將工程化之T細胞靶向至胃腸道，例如，該CAR靶向MAdCAM-1。在一些實施例中，該CAR可將工程化之T細胞靶向至包含內皮細胞之組織，例如，該CAR靶向VCAM-1，例如，用於抑制疾患(諸如克羅恩氏病及多發性硬化症)中之

免疫反應。在一些實施例中，該CAR可將工程化之T細胞靶向至內皮細胞，例如，該CAR靶向CEACAM6，例如，用於抑制疾患(諸如克羅恩氏病)中之免疫反應。在一些實施例中，該CAR可將工程化之T細胞靶向至前B細胞，例如，該CAR靶向CD19，例如，用於抑制疾患(諸如多發性硬化症及全身性紅斑狼瘡)中之免疫反應。在一些實施例中，該CAR可將工程化之T細胞靶向至B淋巴細胞，例如，該CAR靶向CD20，例如，用於抑制疾患(諸如多發性硬化症及全身性紅斑狼瘡)中之免疫反應。在一些實施例中，該CAR可將工程化之T細胞靶向至發炎組織，例如，該CAR靶向TNFA，例如，用於抑制疾患(諸如類風濕性關節炎、發炎腸疾、潰瘍性結腸炎或克羅恩氏病)中之免疫反應。在一些實施例中，該CAR可將工程化之T細胞靶向至發炎組織，例如，該CAR靶向TGF- $\beta$ 1，例如，用於抑制疾患(諸如發炎腸疾、潰瘍性結腸炎或克羅恩氏病)中之免疫反應。在一些實施例中，該CAR可將工程化之T細胞靶向至神經組織，例如，該CAR靶向MBP、MOG或PLP1，例如，用於抑制疾患(諸如多發性硬化症)中之免疫反應。在一些實施例中，該CAR可將工程化之T細胞靶向至包含成熟B淋巴細胞之組織，例如，該CAR靶向TNFRSF17，例如，用於抑制疾患(諸如全身性紅斑狼瘡)中之免疫反應。在一些實施例中，該CAR可將工程化之T細胞靶向至滑膜組織，例如，該CAR靶向瓜胺酸化波形蛋白，例如，用於抑制疾患(諸如類風濕性關節炎)中之免疫反應。在一些實施例中，該CAR靶向二肽基肽酶樣6 (DPP6)、溶質載體家族2成員2 (SCL2A2)、麩胺酸脫羧酶(GAD2)、橋粒芯蛋白3 (DSG3)或MHC I類HLA-A (HLA-A\*02)。另外CAR標靶(例如，發炎抗原)為此項技術中已知。參見，例如，WO2020092057A1，該案之內容係以全文引用之方式

併入本文中。

**【0055】** 如本文使用，「治療」係指治療劑對個體中疾病或疾患之任何投與或施用，且包括抑制該疾病、阻止其發展、減輕該疾病之一或多種症狀、治癒該疾病、預防該疾病之一或多種症狀或預防該疾病之一或多種症狀之復發。治療自體免疫或發炎反應或疾患可包括緩解與特定疾患相關聯之發炎，導致疾病特異性症狀之緩解。使用本文描述之工程化之T細胞治療可在另外治療劑，例如，抗發炎劑、免疫抑制劑，或用於治療自體免疫疾患之生物製劑(例如，類克(Remicade)、修美樂(Humira))之前、之後或組合使用。

**【0056】** 「啟動子」係指控制調節區連接之基因之表現的調節區。

**【0057】** 本文使用「聚核苷酸」及「核酸」係指包含核苷或核苷類似物之多聚體化合物，其具有沿主鏈連接在一起之含氮雜環鹼基或鹼基類似物，包括習知RNA、DNA、混合RNA-DNA，及其類似物之聚合物。核酸「主鏈」可由各種鍵聯構成，包括以下中之一或多者：糖-磷酸二酯鍵聯、肽-核酸鍵(「肽核酸」或PNA；PCT編號：WO 95/32305)、硫代磷酸酯鍵聯、甲基膦酸酯鍵聯，或其組合。核酸之糖部分可為核糖、脫氧核糖，或具有取代(例如，2'甲氧基或2'鹵化物取代)之類似化合物。含氮鹼基可為習知鹼基(A、G、C、T、U)，其類似物(例如，經修飾之尿苷，諸如5-甲氧基尿苷、假尿苷或N1-甲基假尿苷等)；肉苷；嘌呤或嘧啶之衍生物(例如，N<sup>4</sup>-甲基脫氧鳥苷、脫氮或氮雜嘌呤、脫氮或氮雜嘧啶、於5或6位置具有取代基之嘧啶鹼基(例如，5-甲基胞嘧啶)，於2、6或8位置具有取代基之嘌呤鹼基、2-胺基-6-甲基胺基嘌呤、O<sup>6</sup>-甲基鳥嘌呤、4-硫基-嘧啶、4-胺基-嘧啶、4-二甲基胍-嘧啶及O<sup>4</sup>-烷基-嘧啶；美國專利第

5,378,825 號及 PCT 編號：WO 93/13121)。針對一般討論，參見 *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams 等人編，第 11 版，1992)。核酸可包括一或多個「無鹼基」殘基，其中聚合物主鏈位置不包括含氮鹼基(美國專利第 5,585,481 號)。核酸可包含僅習知 RNA 或 DNA 糖、鹼基及鍵聯，或可包括習知組分及取代兩者(例如，具有 2' 甲氧基鍵聯之習知鹼基，或含有習知鹼基及一或多種鹼基類似物之聚合物)。核酸包括「鎖核酸」(LNA)，一種含有一或多個 LNA 核苷酸單體之類似物，其中雙環呋喃醣單元鎖定於 RNA 模擬糖構象中，此增強對互補 RNA 及 DNA 序列之雜交親和力 (Vester 及 Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41)。RNA 及 DNA 可具有不同之糖部分且可因 RNA 中存在尿嘧啶或其類似物及 DNA 中存在胸腺嘧啶或其類似物而不同。

**【0058】** 本文可互換使用「引導 RNA」、「gRNA」及簡單「引導」係指包含引導序列之引導物，例如，crRNA (亦稱為 CRISPR RNA)，或 crRNA 及 trRNA 之組合(亦稱為 tracrRNA)。該 crRNA 及 trRNA 可結合成單個 RNA 分子(單個引導 RNA，sgRNA)，或例如，呈兩個各別 RNA 分子(雙重引導 RNA，dgRNA)。「引導 RNA」或「gRNA」係指各類型。該 trRNA 可為天然存在之序列，或相較於天然存在之序列具有修飾或變化之 trRNA 序列。引導 RNA (諸如 sgRNA 或 dgRNA) 可包括如本文描述之經修飾之 RNA。

**【0059】** 如本文使用，「引導序列」係指引導 RNA 內之序列，其與靶序列互補並用以將引導 RNA 引導至靶序列用於由 RNA 引導之 DNA 結合劑結合或修飾(例如，裂解)。「引導序列」亦可稱為「靶向序列」或「間隔序列」。引導序列可為 20 個鹼基對長度，例如，在化膿性鏈球菌

(*Streptococcus pyogenes*)(即，Spy Cas9)及相關Cas9同源物/異種同源物之情況下。較短或較長序列亦可用作引導，例如，15、16、17、18、19、21、22、23、24或25個核苷酸長度。例如，在一些實施例中，該引導序列包含與標靶互補之序列之至少15、16、17、18、19或20個連續核苷酸。在一些實施例中，該靶序列係於基因中或於染色體上，例如，且與該引導序列互補。在一些實施例中，引導序列與其相應靶序列之間的互補性或一致性程度可為約75%、80%、85%、90%、95%或100%。例如，在一些實施例中，該引導序列包含與序列之至少15、16、17、18、19或20個連續核苷酸具有約75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性之序列。在一些實施例中，該引導序列及靶區可為100%互補或一致。在其他實施例中，該引導序列及該靶區可含有至少一個錯配。例如，該引導序列及該靶序列可含有1、2、3或4個錯配，其中該靶序列總長度係至少17、18、19、20或更多個鹼基對。在一些實施例中，該引導序列及該靶區可含有1至4個錯配，或其等可完全互補，其中該引導序列包含至少17、18、19、20或更多個核苷酸。在一些實施例中，該引導序列及該靶區可含有1、2、3或4個錯配，其中該引導序列包含20個核苷酸。

**【0060】** RNA引導之DNA結合劑之靶序列包括基因體DNA之正股及負股兩者(即，給定之序列及該序列之反向互補序列)，因為RNA引導之DNA結合劑之核酸受質係雙股核酸。因此，在據說引導序列「與靶序列互補」之情況下，應瞭解該引導序列可指導引導RNA結合至靶序列之反向互補體。因此，在一些實施例中，在該引導序列結合靶序列之反向互補體之情況下，除該引導序列中U取代T外，該引導序列與該靶序列之某些核苷酸一致(例如，不包括PAM之靶序列)。

【0061】如本文使用，「RNA引導之DNA結合劑」意謂具有RNA及DNA結合活性之多肽或多肽複合物，或此複合物之DNA結合次單元，其中該DNA結合活性為序列特異性且取決於該RNA之序列。術語RNA引導之DNA結合劑亦包括編碼此等多肽之核酸。例示性RNA引導之DNA結合劑包括Cas裂解酶/切口酶。例如，若例示性RNA引導之DNA結合劑係經修飾以允許DNA裂解，例如，經由與FokI裂解酶域融合，則例示性RNA引導之DNA結合劑可包括其不活化形式(「dCas DNA結合劑」)。如本文使用，「Cas核酸酶」包含Cas裂解酶及Cas切口酶。Cas裂解酶及Cas切口酶包括III型CRISPR系統之Csm或Cmr複合物、其Cas10、Csm1或Cmr2次單元、I型CRISPR系統之級聯複合物、其Cas3次單元及2類Cas核酸酶。如本文使用，「2類Cas核酸酶」係具有RNA引導之DNA結合活性之單鏈多肽。2類Cas核酸酶包括2類Cas裂解酶/切口酶(例如，H840A、D10A或N863A變體)，其進一步具有RNA引導之DNA裂解酶或切口酶活性，及2類dCas DNA結合劑，其中例如若2類dCas DNA結合劑係經修飾以允許DNA裂解而使裂解酶/切口酶活性不活化，或具有C至T脫胺酶或A至G脫胺酶活性。在一些實施例中，該RNA引導之DNA結合劑包含脫胺酶區及RNA引導之DNA切口酶，諸如Cas9切口酶。2類Cas核酸酶包括(例如) Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、HF Cas9 (例如，N497A、R661A、Q695A、Q926A變體)、HypaCas9 (例如，N692A、M694A、Q695A、H698A變體)、eSPCas9(1.0) (例如，K810A、K1003A、R1060A變體)及eSPCas9(1.1) (例如，K848A、K1003A、R1060A變體)蛋白質及其修飾。Cpf1蛋白(Zetsche等人，Cell, 163: 1-13 (2015))亦含有RuvC樣核酸酶域。Zetsche之Cpf1序列係以全文引用之方式併入本文中。

參見，例如，Zetsche，表S1及S3。參見，例如，Makarova等人，Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36 (2015)；Shmakov等人，Molecular Cell, 60:385-397 (2015)。如本文使用，RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas核酸酶、Cas9核酸酶或化膿性鏈球菌Cas9核酸酶)之遞送包括多肽或mRNA之遞送。

**【0062】** 下文提供Cas9分子之例示性核苷酸及多肽序列。用於鑑別編碼Cas9多肽序列之替代核苷酸序列(包括替代天然存在之變體)之方法為此項技術中已知。亦審慎考慮與Cas9核酸序列、胺基酸序列或編碼本文提供之胺基酸序列之核酸序列中之任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之序列。

**【0063】**

Cas9之例示性開放閱讀框

```
AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCAA
CUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCU
CCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUC
AAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUCCGGCGAGAC
CGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGGCGGUACA
CCCGGCGGAAGAACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCC
AACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUUCACCGGCUGGA
GGAGUCCUUCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACC
CCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAG
UACCCACCAUCUACCACCGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCAC
CGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCUUGGCCACA
```

UGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUCGAGGGGCGACCUGAAC  
CCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCA  
GACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCUCCG  
GCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCC  
CGGCGGCUGGAGAACCUGAUCGCCAGCUGCCCGGCAGAGAAGAA  
GAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCUGUCCUGGGCCUGA  
CCCCAACUUCAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAG  
CUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCU  
GCUGGCCCAGAUCCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCG  
CCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGG  
GUGAACACCGAGAUACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAU  
CAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCUGCUGAAGG  
CCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUC  
UUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGG  
CGCCUCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGG  
AGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCG  
GGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCA  
UCCCCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGG  
CGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAA  
GAUCGAGAAGAUCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCC  
CCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAG  
UCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGA  
CAAGGGCGCCUCCGCCAGUCCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACU

UCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCC  
CUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGU  
GAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCG  
GCGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAAC  
CGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGA  
AGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGAC  
CGGUUCAACGCCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAU  
CAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACA  
UCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGGACCGG  
GAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCACCUGUUCGA  
CGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGGCGGGUACACCGGCU  
GGGGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUAACGGCAUCCGGGACAAG  
CAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACUUCUGAAGUCCGACGGCUU  
CGCCAACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGA  
CCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCAGGUGUCCGGCCAGGGC  
GACUCCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGC  
CAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGC  
UGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGUGAUC  
GAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAA  
CUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGC  
UGGGCUCCCAGAUCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAG  
CUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUUGUACUACCUGCAGAACGGCCG  
GGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCG

ACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGAC  
GACUCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCG  
GGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGA  
UGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACC  
CAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCU  
GUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGG  
AGACCCGGCAGAUCAACCAAGCACGUGGGCCAGAUCCUGGACUCC  
CGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGA  
GGUGAAGGUGAUCAACCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCC  
GGAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUAACAACUAC  
CACCACGCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCCGC  
CCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACG  
GCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCC  
GAGCAGGAGAUCCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUC  
CAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAGAUCAACCUGGCCAACG  
GCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACC  
GGCGAGAUUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCG  
GAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCG  
AGGUGCAGACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAG  
CGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCC  
CAAGAAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCACCGUGGCCUACUCCG  
UGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCU  
GAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGCGGU

CCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUGGAGGCCAAGGGC  
 UACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGU  
 ACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCC  
 UCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCUCCUGCCCUC  
 CAAGUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGC  
 UGAAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUG  
 GAGCAGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCUC  
 CGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACA  
 AGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGG  
 GAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCU  
 GGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACC  
 GGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUG  
 AUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCU  
 GUCCCAGCUGGGCGGCGACGGCGGGCUCUCCCCAAGAAGAAGC  
 GGAAGGUGUGA (SEQ ID NO: 114)

**【0064】**

Cas9之例示性胺基酸序列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI  
 KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNE  
 AKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL  
 RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLF  
 IQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEK  
 KNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLA

QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH  
HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF  
IKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAIL  
RRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEE  
TITPWNFEVVDK GASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYF  
TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQL  
KEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN  
EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGW  
GRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKED  
IQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRH  
KPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVE  
NTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLK  
DDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ  
RKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNT  
KYDENDKLIREVKVITLKS KLVSDFRKFDFQFYK VREINNYHHAHDAY  
LNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATA  
KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT  
VRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK  
KYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEK  
NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKG  
NELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII  
EQISEFSKR VILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNL  
GAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLG

GDGGGSPKKRKV (SEQ ID NO: 115)

【0065】

Cas9之例示性開放閱讀框

AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAA  
ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCG  
AGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAU  
CAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAA  
CAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGUA  
CACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA  
GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCACAGACUG  
GAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGAC  
ACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAA  
AAGUACCCGACAAUCUACCACCGAGAAAGAAGCUGGUCGACAG  
CACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCAC  
ACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAAGGAGACCUG  
AACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGU  
CCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAA  
GCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAG  
AGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAA  
GAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGAC  
UGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA  
AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAA  
CCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCUGG

CAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUG  
AGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAU  
GAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGA  
AGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC  
UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGG  
AGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCC  
UGGAAAAGAUGGACGGAAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAA  
CAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGA  
AGCAUCCCGCACCCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCU  
GAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAG  
AAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUC  
GGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAA  
GAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGU  
CGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGA  
CAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG  
CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGAC  
AAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUC  
CUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAA  
GACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUAC  
UUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAG  
UCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAAACAUACCACGACCUG  
CUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAA  
ACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUC

GAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCAC  
ACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAG  
AUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGA  
AUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUCCUGAA  
GAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACG  
ACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUC  
AGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGC  
AGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGG  
UCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGGAAGACACAAGCCGGAA  
ACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAA  
GGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAA  
GGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGA UCCUGAAGGAACACCCGGU  
CGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACC  
UGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUC  
AACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAG  
CUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAA  
GCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAA  
GUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACG  
CAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCA  
GAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCA  
AGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCA  
CAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGA  
CAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC

UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCAGA  
GAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGC  
AGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAA  
GCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG  
AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAA  
AGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAA  
AUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGA  
AACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGGAAGA  
GACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAA  
CAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAG  
GAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAG  
AAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGC  
CCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAA  
GGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGA  
AUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGA  
CUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUG  
AUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGG  
AAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGA  
AACGAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCU  
GGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACG  
AACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACACAAGCACUACCUGGAC  
GAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCU  
GGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGC

ACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCAC  
CUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUA  
CUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGG  
AAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUG  
UACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAG  
GAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCUAG (SEQ ID NO: 116)

**【0066】**

具有Hibit標籤之Cas9之例示性開放閱讀框

AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCAA  
CUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCU  
CCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUC  
AAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUCCGGCGAGAC  
CGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGGCGGGCGGUACA  
CCCGGGCGGAAGAACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCC  
AACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUUCACCAGGCUGGA  
GGAGUCCUUCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACC  
CCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAG  
UACCCACCAUCUACCACCGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCAC  
CGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCUUGGCCACA  
UGAUCAAGUUCGGGGCCACUUCUGAUCGAGGGCGACCUGAAC  
CCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCA  
GACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCUCCG  
GCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCC

CGGCGGCUGGAGAACCUGAUCGCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAA  
GAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCUGUCCUGGGCCUGA  
CCCCAACUUCAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAG  
CUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCU  
GCUGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCG  
CCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGG  
GUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAU  
CAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGG  
CCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUC  
UUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGG  
CGCCUCCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGG  
AGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCG  
GGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCA  
UCCCCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGG  
CGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAA  
GAUCGAGAAGAUCUGACCUUCCGGAUCCCUACUACGUGGGCC  
CCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAG  
UCCGAGGAGACCAUCACCCCUUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGA  
CAAGGGCGCCUCCGCCAGUCCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACU  
UCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCC  
CUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGU  
GAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUCCUGUCCG  
GCGAGCAGAAGAAGGCCAUCCUGGACCUGCUGUUCAAGACCAAC

CGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGA  
AGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGAC  
CGGUUCAACGCCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAU  
CAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACA  
UCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGGACCGG  
GAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCACCUGUUCGA  
CGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCU  
GGGGCCGGCUGUCCC GGAAGCUGAUAACGGCAUCCGGGACAAG  
CAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUU  
CGCCAACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGA  
CCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCAGGUGUCCGGCCAGGGC  
GACUCCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGC  
CAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGC  
UGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGUGAUC  
GAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAA  
CUCCC GGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGC  
UGGGCUCCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAG  
CUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCG  
GGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCG  
ACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCUGAAGGAC  
GACUCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCG  
GGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCGAGGAGGUGGUGAAGAAGA  
UGAAGAACUACUGGCCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACC

CAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCU  
GUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGG  
AGACCCGGCAGAUACCAAGCACGUGGCCCAGAUCCUGGACUCC  
CGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGA  
GGUGAAGGUGAUACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUC  
GGAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUACAACUAC  
CACCACGCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCCG  
CCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACG  
GCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCC  
GAGCAGGAGAUCCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUC  
CAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAGAUACCCUGGCCAACG  
GCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACC  
GGCGAGAUUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCG  
GAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCG  
AGGUGCAGACCGGCCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAG  
CGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCC  
CAAGAAGUACGGCGGCCUUCGACUCCCCACCGUGGCCUACUCCG  
UGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCU  
GAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGCGGU  
CCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCUCCUGGAGGCCAAGGGC  
UACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGU  
ACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCC  
UCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCUCCUC

CAAGUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGC  
 UGAAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUG  
 GAGCAGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCUC  
 CGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACA  
 AGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGG  
 GAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCU  
 GGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACC  
 GGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUG  
 AUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCU  
 GUCCCAGCUGGGCGGCGACGGCGGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGC  
 GGAAGGUGUCCGAGUCCGCCACCCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGG  
 CGGCUGUUCAAGAAGAUCUCCUGA (SEQ ID NO: 117)

【0067】

具有Hibit標籤之Cas9之例示性胺基酸序列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI  
 KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEM  
 AKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL  
 RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLF  
 IQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEK  
 KNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLA  
 QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH  
 HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF  
 IKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTEFDNGSIPHQIHLGELHAIL

RRQEDFYFPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEE  
 TITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMNTNFDKNLPNEKVLPKHSLLEYEYF  
 TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQL  
 KEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN  
 EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGW  
 GRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKED  
 IQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDELVKVMGRH  
 KPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVE  
 NTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLK  
 DDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ  
 RKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNT  
 KYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAY  
 LNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATA  
 KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT  
 VRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK  
 KYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEK  
 NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKG  
 NELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII  
 EQISEFSKRVLADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNL  
 GAPAAFKEYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSIITGLYETRIDLSQLG  
 GDGGGSPKKKRKVSESATPESVSGWRLFKKIS\* (SEQ ID NO: 118)

**【0068】** 如本文使用，「核糖核蛋白」(RNP)或「RNP複合物」係指引導RNA連同RNA引導之DNA結合劑諸如Cas核酸酶，例如，Cas裂解

酶、Cas切口酶或dCas DNA結合劑(例如，Cas9)。在一些實施例中，該引導RNA將該RNA引導之DNA結合劑(諸如Cas9)引導至靶序列，且該引導RNA與該靶序列雜交及該RNA引導之DNA結合劑結合至該靶序列；在該RNA引導之DNA結合劑係裂解酶或切口酶之情況下，結合後可接著雙股DNA裂解或單股DNA裂解。

**【0069】** 如本文使用，若第一序列與第二序列之比對顯示該第二序列之全部位置之X%或更多與該第一序列匹配，則認為該第一序列「包含與第二序列具有至少X%一致性之序列」。例如，序列AAGA包含與序列AAG具有100%一致性之序列，因為比對將產生100%一致性，其中與該第二序列之所有三個位置均匹配。只要相關核苷酸(諸如胸苷、尿苷或經修飾之尿苷)具有相同互補體(例如，針對胸苷、尿苷或經修飾之尿苷中之所有為腺苷；另一實例係胞嘧啶及5-甲基胞嘧啶，其等中之兩者均具有鳥苷或經修飾之鳥苷作為互補體)，RNA與DNA之間的差異(一般尿苷換為胸苷或反之亦然)及核苷類似物(諸如經修飾之尿苷)之存在不導致聚核苷酸之間的一致性 or 互補性之差異。因此，例如，認為其中X係任何經修飾之尿苷，諸如假尿苷、N1-甲基假尿苷或5-甲氧基尿苷之序列5'-AXG與AUG 100%一致，因為兩者與相同序列(5'-CAU)完全互補。例示性比對演算法係此項技術中熟知的史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)及尼德勒曼-翁施(Needleman-Wunsch)演算法。熟習此項技術者將瞭解適用於待比對之給定序列對之演算法及參數設定之選擇；對於一般長度相似且預期針對胺基酸一致性>50%或針對核苷酸一致性>75%之序列，使用由EBI於www.ebi.ac.uk網頁伺服器提供之尼德勒曼-翁施演算法介面之默認設定的尼德勒曼-翁施演算法係一般適當的。

**【0070】** 如本文使用，若第一序列鹼基之X%之鹼基與第二序列配對，則認為該第一序列「與第二序列X%互補」。例如，第一序列5'AAGA3'與第二序列3'TTCT5' 100%互補，及該第二序列與該第一序列100%互補。在一些實施例中，第一序列5'AAGA3'與第二序列3'TTCTGTGA5' 100%互補，而該第二序列與該第一序列50%互補。

**【0071】** 如本文使用，本文使用「mRNA」係指為完全或主要RNA或經修飾之RNA且包含可轉譯為多肽之開放閱讀框(即，可充當核糖體及胺基醯化tRNA轉譯之受質)之聚核苷酸。mRNA可包含磷酸酯-糖主鏈，包括核糖殘基或其類似物，例如，2'-甲氧基核糖殘基。在一些實施例中，mRNA磷酸酯-糖主鏈之糖基本上由核糖殘基，2'-甲氧基核糖殘基，或其組合構成。

**【0072】** 如本文使用，「插入缺失」係指由許多核苷酸插入於靶核酸中雙股斷裂(DSB)之位點或於該位點經刪除所構成之插入/缺失突變。

**【0073】** 如本文使用，「靶序列」係指靶基因中與gRNA之引導序列具有互補性之核酸序列。該靶序列及該引導序列之相互作用指導RNA引導之DNA結合劑結合於該靶序列內，並可能切口或裂解(取決於藥劑之活性)。

**【0074】** 如本文使用，「多肽」係指野生型或變體蛋白(例如，突變體、片段、融合體，或其組合)。變體多肽可具有野生型多肽之至少或約5%、10%、15%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%功能活性。在一些實施例中，該變體與該野生型多肽之序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性。

在一些實施例中，變體多肽可為高活性變體。在某些情況下，該變體具有介於該野生型多肽之功能活性之約80%與約120%、140%、160%、180%、200%、300%、400%、500%或更多之間。

**【0075】** 如本文使用，「異源性基因」係指已作為外源性源引入細胞內(例如，於基因體基因座，諸如安全港基因座(包括TCR基因座)處插入)之基因。即，該引入之基因關於其插入位點係異源性。自此異源性基因表現之多肽稱為「異源性多肽」。該異源性基因可為天然存在或經工程化，且可為野生型或變體。該異源性基因可包括除編碼該異源性多肽之序列外之核苷酸序列(例如，內部核醣體進入位點)。該異源性基因可為基因體中天然存在之基因，呈野生型或變體(例如，突變體)的形式。例如，儘管該細胞含有受關注之基因(呈野生型或呈變體的形式)，但相同基因或其變體可呈外源性源的形式引入，以(例如)於高度表現之基因座處表現。該異源性基因亦可為基因體中非天然存在，或該基因體中表現非天然存在之異源性多肽之基因。「異源性基因」、「外源性基因」及「轉基因」可互換使用。在一些實施例中，該異源性基因或轉基因包括外源性核酸序列，例如，核酸序列對受體細胞而言非內源性。在一些實施例中，該異源性基因或轉基因包括外源性核酸序列，例如，該受體細胞中非天然存在之核酸序列。例如，異源性基因關於其插入位點及關於其受體細胞可為異源性。

**【0076】** 「安全港」基因座係基因體內之基因座，其中可插入基因而對細胞無顯著有害影響。本文使用之核酸酶靶向之安全港基因座之非限制性實例包括AAVS1 (PPP1 R12C)、TCR、B2M，及本文描述之任何靶向減弱之基因座，例如，TNFA、IFNG、IL17A及IL6基因體基因座。在一些實施例中，於靶向減弱之一或多個基因座(諸如TRC基因，例如，

TRAC基因)處插入有利於同種異體細胞。其他合適之安全港基因座為此項技術中已知。

### 【0077】

## II. 組合物

### A. 工程化之T細胞

【0078】 本文提供T細胞及T細胞群體，及其組合物及用途，T細胞及T細胞群體係經工程化以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼調節T細胞促進分子之異源性序列插入該細胞內。在一些實施例中，該調節T細胞促進分子係選自IL10、CTLA4、TGFB1、IDO1、ENTPD1、NT5E、IL22、AREG、IL35、GARP、CD274、FOXP3、IKZF2、EOS、IRF4、LEF1及BACH2。

【0079】 在一些實施例中，T細胞或T細胞群體係經工程化以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將各在啟動子序列之控制下編碼兩個或更多個調節T細胞促進分子之異源性序列插入該細胞內。例如，該工程化之T細胞包含在第一啟動子之控制下編碼第一調節T細胞促進分子之第一異源性序列及在第二啟動子之控制下編碼第二調節T細胞促進分子之第二異源性序列。該第一啟動子及該第二啟動子可為相同啟動子或不同啟動子。

【0080】 在一些實施例中，T細胞或T細胞群體係經工程化以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子之控制下編碼IL10之異源性序列插入該細胞內。在一些實施例中，該T細胞係經工程化以包含編碼IFNG之

內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子之控制下編碼CTLA4之異源性序列插入該細胞內。在一些實施例中，該T細胞係經工程化以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、將在啟動子之控制下編碼IL10之異源性序列插入該細胞內及將在啟動子之控制下編碼CTLA4之異源性序列插入該細胞內。

**【0081】** 在一些實施例中，T細胞或T細胞群體係經工程化以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子之控制下編碼調節T細胞促進分子之異源性序列插入該細胞內，且顯示天然存在之調節T細胞(nTreg)之至少一種抑制活性，例如，在活體外或活體內分析(例如，GvHD之動物模型)中免疫反應或生物標誌物之抑制。

**【0082】** 在一些實施例中，將編碼調節T細胞促進分子之異源性序列併入表現構築體內。在一些實施例中，可將編碼兩種或更多種調節T細胞促進分子之異源性序列併入兩種或更多種各別之表現構築體內。例如，編碼第一調節T細胞促進分子之第一異源性序列提供於第一表現構築體中，及編碼第二調節T細胞促進分子之第二異源性序列提供於第二各別之表現構築體中。在一些實施例中，該表現構築體係游離基因體表現構築體。在一些實施例中，將編碼該調節T細胞促進分子之異源性序列插入基因體內，例如，靶向或非靶向插入。

**【0083】** 在一些實施例中，可將編碼調節T細胞促進分子之序列插入選自以下之位點內：TCR基因座，例如，TRAC基因座；TNF基因座、IFNG基因座、IL17A基因座、IL6基因座、IL2基因座或腺相關病毒整合

位點1 (AAVS1)基因座。

【0084】 在一些實施例中，工程化之T細胞群體包含TNFA序列中藉由基因編輯之修飾(例如，減弱)，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估，其中至少50%、55%、60%、65%，較佳至少70%、75%、80%、85%、90%或95%細胞包含插入、缺失或取代於內源性TNFA序列中。在一些實施例中，相較於合適對照(例如，其中如(例如)藉由ELISA或流式細胞分析技術確定尚未修飾TNFA基因)，TNFA (全長、野生型蛋白質或mRNA)之表現減少至少50%、55%、60%、65%，較佳至少70%、75%、80%、85%、90%、95%，或減少至低於分析之偵測限值。TNFA蛋白及mRNA表現於例如T細胞群體中之分析為此項技術中已知且由本文提供(參見實例2及3)。在某些實施例中，藉由實例2及3中提供之方法，TNFA之減弱導致2500 pg/ml或更小之TNFA量。

【0085】 在一些實施例中，工程化之T細胞群體包含IFNG序列中藉由基因編輯之修飾(例如，減弱)，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估，其中至少50%、55%、60%、65%，較佳至少70%、75%、80%、85%、90%或95%細胞包含插入、缺失或取代於內源性IFNG序列中。在一些實施例中，相較於合適對照(例如，其中如(例如)藉由ELISA或流式細胞分析技術確定尚未修飾IFNG基因)，IFNG (全長、野生型蛋白質或mRNA)之表現減少至少50%、55%、60%、65%，較佳至少70%、75%、80%、85%、90%、95%，或減少至低於分析之偵測限值。IFNG蛋白及mRNA表現於例如T細胞群體中之分析為此項技術中已知且由本文提供(參見實例2及3)。在某些實施例中，藉由實例2及3中提供之方法，IFNG之減弱導致300,000 pg/ml或更小之IFNG量。

【0086】 在一些實施例中，減弱基因(例如，TNFA或IFNG)之表現之修飾係插入、缺失或取代中之一或多者。

【0087】 在一些實施例中，工程化之T細胞或T細胞群體包含例如藉由基因編輯之編碼調節T細胞促進分子之序列之插入，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估，其中至少30%、35%，較佳至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%細胞包含編碼調節T細胞促進分子之序列之插入。在一些實施例中，相較於合適對照，例如，其中如(例如)藉由ELISA或流式細胞分析技術確定尚未插入調節T細胞促進分子基因，插入之調節T細胞促進分子(例如，IL10)導致蛋白質或mRNA之表現統計學顯著增加。在一些實施例中，該等工程化之T細胞包含藉由基因編輯之編碼IL10之序列之插入，例如，如藉由測序(例如NGS)評估，其中至少30%、35%，較佳至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%細胞包含編碼IL10之序列之插入。在一些實施例中，相較於合適對照，例如，其中調節T細胞促進分子，插入之編碼IL10之序列導致蛋白質或mRNA之表現統計學顯著增加。IL10蛋白及mRNA表現於例如T細胞群體中之分析係經本文描述且為此項技術中已知，例如，ELISA及流式細胞分析技術。在某些實施例中，如藉由實例2及3中之方法確定，IL10量係至少300 pg/ml。

【0088】 在一些實施例中，工程化之T細胞或T細胞群體包含例如藉由基因編輯之編碼CTLA4之序列之插入，例如，如藉由測序(例如NGS)評估，其中至少30%、35%，較佳至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%細胞包含編碼CTLA4之序列之插入。在一些實施例中，相較於合適對照，例如，其中調節T細胞促進

分子，插入之編碼CTLA4之序列導致蛋白質或mRNA之表現統計學顯著增加。CTLA4蛋白及mRNA表現於例如T細胞群體中之分析係經本文描述且為此項技術中已知，例如，ELISA及流式細胞分析技術。

【0089】 在一些實施例中，T細胞群體包含經工程化以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及編碼調節T細胞促進分子之序列之插入之T細胞。在一些實施例中，該T細胞群體中至少40%、45%，較佳至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100% (例如，於所用分析之偵測限值內)T細胞係經工程化以包含異源性調節T細胞促進分子，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。在一些實施例中，該T細胞群體中至少50%、55%、60%、65%，較佳至少70%、75%，較佳至少80%、85%、90%、95%或100%T細胞係經工程化以包含編碼TNFA之序列之修飾(例如，減弱)，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。在一些實施例中，該T細胞群體中至少50%、55%、60%、65%，較佳至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%T細胞係經工程化以包含編碼IFNG之序列之修飾(例如，減弱)，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。在一些實施例中，該T細胞群體中至少40%、45%，較佳至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%T細胞係經工程化以包含編碼調節T細胞促進分子之序列之插入，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。在一些實施例中，該T細胞群體中至少30%、35%，較佳至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%T細胞係經工程化以包含編碼IL10之序列之插入，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。在一些實施例中，該T細

胞群體中至少30%、35%，較佳至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%T細胞係經工程化以包含編碼CTLA4之序列之插入，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。

**【0090】** 在一些實施例中，包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼調節T細胞促進分子之異源性序列插入工程化之T細胞或T細胞群體，進一步包含編碼介白素17A (IL17A)、介白素6 (IL6)、介白素2 (IL2)、穿孔蛋白1 (PRF1)、顆粒酶A (GZMA)或顆粒酶B (GZMB)之內源性核酸序列之修飾，其中該修飾分別減弱該IL17A、IL6、IL2、PRF1、GZMA或GZMB之表現。

**【0091】** 在一些實施例中，T細胞或T細胞群體係使用基因編輯系統，例如，使用RNA引導之DNA結合劑工程化。在一些實施例中，該等T細胞係使用CRISPR/Cas基因編輯系統工程化。在一些實施例中，該等T細胞係使用CRISPR/Cas II型基因編輯系統，例如，使用Cpf1工程化。在一些實施例中，該等T細胞係使用CRISPR/Cas9基因編輯系統，例如，使用SpyCas9工程化。例示性Cas9序列係由本文提供。

**【0092】** 在一些實施例中，T細胞或T細胞群體係使用引導RNA工程化，引導RNA特異性靶向IFNG及TNFA基因內之位點以提供IFNG及TNFA基因之減弱。例示性序列提供於表1及2中，及各列舉引導序列之標靶之基因體坐標。

**【0093】** 在一些實施例中，工程化之T細胞或T細胞群體包含使用本文揭示之引導RNA及RNA引導之DNA結合劑減弱之IFNG及TNFA基因。在一些實施例中，本文揭示藉由於T細胞之IFNG及TNFA基因內，例如，

使用本文揭示之引導RNA及RNA引導之DNA結合劑(例如，CRISPR/Cas系統)，誘導斷裂(例如，雙股斷裂(DSB)或單股斷裂(切口))工程化之T細胞。該等方法可活體外或離體用於例如製造用於抑制免疫反應(包括發炎及自體免疫)之細胞產物。在一些實施例中，本文揭示之引導RNA藉由RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas核酸酶)於IFNG基因內之本文描述之位點處介導靶特異性切割。在一些實施例中，本文揭示之引導RNA藉由RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas核酸酶)於TNFA基因內之本文描述之位點處介導靶特異性切割。應知曉，在一些實施例中，該等引導RNA包含結合至或可結合至該等區域之引導序列。

**【0094】** 提供於選自彼等表1中列舉者之基因體坐標處包含基因修飾之工程化之T細胞或T細胞群體，例如，於IFNG內包含列舉之基因體範圍之任一者內之插入缺失或取代突變之細胞。亦提供於選自彼等表2中列舉者之基因體坐標處包含基因修飾之工程化之T細胞，例如，於TNFA內包含列舉之基因體範圍之任一者內之插入缺失或取代突變之細胞。在一些實施例中，該工程化之T細胞將包含選自表1之基因體坐標區域內之修飾及選自表2之基因體坐標區域內之修飾。

**【0095】** 在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含與選自表1或表2中之序列組之序列具有95%、90%、85%、80%或75%一致性之引導序列。在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含與選自表1或表2中之序列組之序列具有95%、90%、85%、80%或75%一致性之引導序列。

**【0096】** 在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含具有選自由與選自表1中之序列組之序列具有95%、90%、85%、80%或75%一致性之序列構成之群之序列的至少15、16、17、18、19或20個連續核苷酸之引導

序列。在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含選自表1中之序列組之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸的引導序列。在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含與選自表1中之序列組之序列具有95%、90%、85%、80%或75%一致性之引導序列。在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含選自表1中之序列組之序列之17、18、19或20個連續核苷酸的引導序列。在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含選自表1中之序列組之引導序列。

**【0097】** 在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含具有選自由與選自表2中之序列組之序列具有95%、90%、85%、80%或75%一致性之序列構成之群的序列之至少15、16、17、18、19或20個連續核苷酸之引導序列。在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含選自表2中之序列組之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸的引導序列。在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含與選自表2中之序列組之序列具有95%、90%、85%、80%或75%一致性之引導序列。在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含選自表2中之序列組之序列之17、18、19或20個連續核苷酸之引導序列。在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含選自表2中之序列組之引導序列。

**【0098】** 除非另有說明，否則整個基因體坐標均根據人類參考基因體hg38。

**【0099】** 在某些實施例中，包括包含靶向IFNG之引導序列之引導RNA及包含靶向TNFA之引導序列之引導RNA。

表1：用於減弱IFNG之人類引導序列及染色體坐標

例示性基因體坐標(hg38)	外顯子	股	引導序列(5'至3')	SEQ ID NO
chr12:68155336-68155356	4	+	GCAGGCAGGACAACCAUUAC	1
chr12:68155337-68155357	4	+	CAGGCAGGACAACCAUUACU	2
chr12:68155374-68155394	4	-	AGGAGUCAGAUGCUGUUUCG	3
chr12:68155394-68155414	4	-	CUAAAACAGGGAAGCGAAAA	4
chr12:68155398-68155418	4	+	CGCUUCCCUGUUUUAGCUGC	5
chr12:68155406-68155426	4	-	UGUCGCCAGCAGCUAAAACA	6
chr12:68155407-68155427	4	-	CUGUCGCCAGCAGCUAAAAC	7
chr12:68155420-68155440	4	+	GCGACAGUUCAGCCAUCACU	8
chr12:68155435-68155455	4	-	ACAUGAACUCAUCCAAGUGA	9
chr12:68155447-68155467	4	+	GUUCAUGUAUUGCUUUGCGU	10
chr12:68157972-68157992	3	+	GACAUUCAUGUCUUCUUGA	11
chr12:68157989-68158009	3	+	UGAUGGUCUCCACACUCUUU	12
chr12:68157989-68158009	3	-	AAAGAGUGUGGAGACCAUCA	13
chr12:68158001-68158021	3	-	CCAGAGCAUCCAAAAGAGUG	14
chr12:68158215-68158235	2	-	GAUAAUGGAACUCUUUUCUU	15
chr12:68158230-68158250	2	-	CAUUCAGAUGUAGCGGAUAA	16
chr12:68158237-68158257	2	-	UGCAGGUCAUUCAGAUGUAG	17
chr12:68159524-68159544	1	+	CUUCUUUUACAUAUGGGUCC	18
chr12:68159559-68159579	1	-	UGCAUCGUUUUGGGUUCUCU	19
chr12:68159568-68159588	1	-	UUUCAGCUCUGCAUCGUUUU	20

例示性基因體坐標(hg38)	外顯子	股	引導序列(5'至3')	SEQ ID NO
chr12:68159569-68159589	1	-	UUUUCAGCUCUGCAUCGUUU	21

表2：用於減弱TNFA之人類引導序列及染色體坐標

例示性基因體坐標(hg38)	外顯子	股	引導序列(5'至3')	SEQ ID NO
chr6:31575742-31575762	1	+	UGAGCACUGAAAGCAUGAUC	22
chr6:31575749-31575769	1	+	UGAAAGCAUGAUCCGGGACG	23
chr6:31575755-31575775	1	+	CAUGAUCCGGGACGUGGAGC	24
chr6:31575781-31575801	1	-	CUUCUUGGGGAGCGCCUCCU	25
chr6:31575783-31575803	1	+	GAGGCGCUCCCCAAGAAGAC	26
chr6:31575784-31575804	1	+	AGGCGCUCCCCAAGAAGACA	27
chr6:31575785-31575805	1	+	GGCGCUCCCCAAGAAGACAG	28
chr6:31575786-31575806	1	+	GCGCUCCCCAAGAAGACAGG	29
chr6:31575794-31575814	1	+	CAAGAAGACAGGGGGGCCCC	30
chr6:31575794-31575814	1	-	GGGGCCCCCUGUCUUCUUG	31
chr6:31575796-31575816	1	-	CUGGGGCCCCCUGUCUUCU	32
chr6:31575813-31575833	1	-	AAGCACCGCCUGGAGCCCUG	33
chr6:31575814-31575834	1	-	CAAGCACCGCCUGGAGCCCU	34
chr6:31575823-31575843	1	-	GCUGAGGAACAAGCACCGCC	35
chr6:31575842-31575862	1	+	CCUCUUCUCCUUCUGAUCG	36
chr6:31575846-31575866	1	+	UUCUCCUUCUGAUCGUGGC	37
chr6:31575853-31575873	1	-	GGCGCCUGCCACGAUCAGGA	38

例示性基因體坐標(hg38)	外顯子	股	引導序列(5'至3')	SEQ ID NO
chr6:31575857-31575877	1	-	UGGUGGCGCCUGCCACGAUC	39
chr6:31575888-31575908	1	+	CUGCUGCACUUUGGAGUGAU	40
chr6:31575890-31575910	1	-	CGAUCACUCCAAAGUGCAGC	41
chr6:31575898-31575918	1	+	UUGGAGUGAUCGGCCCCCAG	42
chr6:31575899-31575919	1	+	UGGAGUGAUCGGCCCCCAGA	43
chr6:31575917-31575937	1	-	AGGCACUCACCUCUCCCUC	44
chr6:31576538-31576558	2	-	UGAUUAGAGAGAGGUCCCUG	45
chr6:31576539-31576559	2	-	CUGAUUAGAGAGAGGUCCCU	46
chr6:31576540-31576560	2	-	GCUGAUUAGAGAGAGGUCCC	47
chr6:31576544-31576564	2	+	CCUCUCUCUAAUCAGCCCUC	48
chr6:31576547-31576567	2	-	CCAGAGGGCUGAUUAGAGAG	49
chr6:31576550-31576570	2	+	UCUAAUCAGCCCUCUGGCC	50
chr6:31576562-31576582	2	-	UACUGACUGCCUGGGCCAGA	51
chr6:31576563-31576583	2	-	UUACUGACUGCCUGGGCCAG	52
chr6:31576570-31576590	2	-	GAGACACUUACUGACUGCCU	53
chr6:31576571-31576591	2	-	GGAGACACUUACUGACUGCC	54
chr6:31576785-31576805	3	-	GGGCUACAGGCUUGUCACUC	55
chr6:31576786-31576806	3	-	UGGGCUACAGGCUUGUCACU	56
chr6:31576798-31576818	3	-	UUACCUACAACAUGGGCUAC	57
chr6:31576805-31576825	3	-	AGAGCUCUUACCUACAACAU	58
chr6:31576806-31576826	3	-	CAGAGCUCUUACCUACAACA	59

例示性基因體坐標(hg38)	外顯子	股	引導序列(5'至3')	SEQ ID NO
chr6:31577110-31577130	4	+	UCCAGCAAACCCUCAAGCUG	60
chr6:31577112-31577132	4	+	CAGCAAACCCUCAAGCUGAG	61
chr6:31577122-31577142	4	-	GGAGCUGCCCCUCAGCUUGA	62
chr6:31577123-31577143	4	-	UGGAGCUGCCCCUCAGCUUG	63
chr6:31577136-31577156	4	+	AGCUCCAGUGGCUGAACCGC	64
chr6:31577137-31577157	4	+	GCUCCAGUGGCUGAACCGCC	65
chr6:31577143-31577163	4	-	UGGCCCGGCGGUUCAGCCAC	66
chr6:31577152-31577172	4	+	CCGCCGGGCCAAUGCCCUCC	67
chr6:31577155-31577175	4	-	CCAGGAGGGCAUUGGCCCGG	68
chr6:31577159-31577179	4	+	GCCAAUGCCCUCCUGGCCAA	69
chr6:31577163-31577183	4	-	GCCAUUGGCCAGGAGGGCAU	70
chr6:31577164-31577184	4	+	UGCCCUCCUGGCCAAUGGCG	71
chr6:31577170-31577190	4	-	GCUCCACGCCAUUGGCCAGG	72
chr6:31577173-31577193	4	-	UCAGCUCCACGCCAUUGGCC	73
chr6:31577178-31577198	4	-	AUCUCUCAGCUCCACGCCAU	74
chr6:31577185-31577205	4	+	GGAGCUGAGAGAUAAACCAGC	75
chr6:31577188-31577208	4	+	GCUGAGAGAUAAACCAGCUGG	76
chr6:31577200-31577220	4	+	CCAGCUGGUGGUGCCAUCAG	77
chr6:31577201-31577221	4	+	CAGCUGGUGGUGCCAUCAGA	78
chr6:31577216-31577236	4	-	AUGAGGUACAGGCCCUUGA	79
chr6:31577227-31577247	4	-	CCUGGGAGUAGAUGAGGUAC	80

例示性基因體坐標(hg38)	外顯子	股	引導序列(5'至3')	SEQ ID NO
chr6:31577237-31577257	4	+	UACUCCCAGGUCCUCUCAA	81
chr6:31577245-31577265	4	-	CUUGGCCCUUGAAGAGGACC	82
chr6:31577295-31577315	4	-	GGCGAUGCGGCUGAUGGUGU	83
chr6:31577296-31577316	4	-	CGGCGAUGCGGCUGAUGGUG	84
chr6:31577301-31577321	4	-	GGAGACGGCGAUGCGGCUGA	85
chr6:31577308-31577328	4	-	UCUGGUAGGAGACGGCGAUG	86
chr6:31577311-31577331	4	+	CGCCGUCUCCUACCAGACCA	87
chr6:31577322-31577342	4	-	GAGGUUGACCUUGGUCUGGU	88
chr6:31577331-31577351	4	-	GGCAGAGAGGAGGUUGACCU	89
chr6:31577349-31577369	4	+	CCAUCAAGAGCCCCUGCCAG	90
chr6:31577350-31577370	4	+	CAUCAAGAGCCCCUGCCAGA	91
chr6:31577362-31577382	4	-	CUGGGGUCUCCCUCUGGCAG	92
chr6:31577363-31577383	4	-	UCUGGGGUCUCCCUCUGGCA	93
chr6:31577397-31577417	4	-	GAUGGGCUCUAUACCAGGGCU	94
chr6:31577401-31577421	4	+	CUGGUAUGAGCCCAUCUAUC	95
chr6:31577402-31577422	4	-	AGAUAGAUGGGCUCUAACCA	96
chr6:31577402-31577422	4	+	UGGUAUGAGCCCAUCUAUCU	97
chr6:31577403-31577423	4	-	CAGAUAGAUGGGCUCUAUACC	98
chr6:31577406-31577426	4	+	AUGAGCCCAUCUAUCUGGGA	99
chr6:31577407-31577427	4	+	UGAGCCCAUCUAUCUGGGAG	100
chr6:31577414-31577434	4	-	AAGACCCCUCCCAGAUAGAU	101

例示性基因體坐標(hg38)	外顯子	股	引導序列(5'至3')	SEQ ID NO
chr6:31577437-31577457	4	-	GUCGGUCACCCUUCUCCAGC	102
chr6:31577454-31577474	4	+	GACUCAGCGCUGAGAUCAAU	103
chr6:31577455-31577475	4	-	GAUUGAUCUCAGCGCUGAGU	104
chr6:31577480-31577500	4	-	UCGGCAAAGUCGAGAUAGUC	105
chr6:31577481-31577501	4	-	CUCGGCAAAGUCGAGAUAGU	106
chr6:31577483-31577503	4	+	UAUCUCGACUUUGCCGAGUC	107
chr6:31577484-31577504	4	+	AUCUCGACUUUGCCGAGUCU	108
chr6:31577488-31577508	4	+	CGACUUUGCCGAGUCUGGGC	109
chr6:31577498-31577518	4	+	GAGUCUGGGCAGGUCUACUU	110
chr6:31577499-31577519	4	+	AGUCUGGGCAGGUCUACUUU	111
chr6:31577499-31577519	4	-	AAAGUAGACCUGCCCAGACU	112
chr6:31577532-31577552	4	-	GGAUGUUCGUCCUCCUCACA	113

【0100】 下文顯示用於減弱TNFA之非限制性修飾之引導序列(hg38坐標chr12:68158001-68158021)：

mC\*mC\*mA\*GAGCAUCCAAAAGAGUGGUUUUAGAmGmCmUm  
AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU  
CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA  
mGmUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU (SEQ ID NO: 119)，其中  
m係2'-OMe修飾之核苷酸/核苷殘基，\*指示殘基之間的硫代磷酸酯鍵聯，  
大寫字母指示殘基，較佳包含核糖糖。

【0101】 下文顯示用於減弱IFNG之非限制性修飾之引導序列(hg38

坐標chr6:31576805-31576825)：

mA\*mG\*mA\*GCUCUUACCUACAACAUGUUUUAGAmGmCmUm  
AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU  
CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA  
mGmUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU (SEQ ID NO: 120)。

【0102】 下文顯示例示性修飾之 mock 引導物 (hg38 坐標 chr1:0-20)：

mG\*mA\*mU\*CACGUCGGCCGUUGGCGGUUUUAGAmGmCmUm  
AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU  
CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA  
mGmUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU (SEQ ID NO: 121)。

【0103】 在一些實施例中，本文揭示工程化之T細胞，藉由使用引導RNA及RNA引導之DNA結合劑，及包含異源性IL10核酸之構築體(例如，供體構築體或模板)將異源性IL10核酸引入或插入於T細胞或T細胞群體之基因體基因座內例如以製造工程化之T細胞。在一些實施例中，本文揭示藉由(例如)使用引導RNA及RNA引導之DNA結合劑及包含異源性IL10核酸之構築體(例如，供體)，自T細胞或T細胞群體之基因體基因座表現異源性IL10而經工程化之T細胞。在一些實施例中，本文揭示藉由(例如)使用引導RNA及RNA引導之DNA結合劑(例如，CRISPR/Cas系統)於T細胞或T細胞群體之基因體內誘導斷裂(例如，雙股斷裂(DSB)或單股斷裂(切口))以插入IL10基因而經工程化之T細胞。亦提供藉由該等方法製造之細胞及細胞群體。

【0104】 在一些實施例中，本文揭示T細胞藉由使用引導RNA及

RNA引導之DNA結合劑，及包含異源性CTLA4核酸之構築體(例如供體構築體或模板)將異源性CTLA4核酸引入或插入T細胞或T細胞群體之基因體基因座內工程化，例如以製造工程化之T細胞。在一些實施例中，本文揭示藉由例如使用引導RNA及RNA引導之DNA結合劑及包含異源性CTLA4核酸之構築體(例如供體)，自T細胞或T細胞群體之基因體基因座表現異源性CTLA4而工程化之T細胞。在一些實施例中，本文揭示藉由例如使用引導RNA及RNA引導之DNA結合劑(例如CRISPR/Cas系統)，於T細胞或T細胞群體之基因體內誘導斷裂(例如雙股斷裂(DSB)或單股斷裂(切口))以插入CTLA4基因而工程化之T細胞。亦提供藉由該等方法製造之細胞及細胞群體。

**【0105】** 在一些實施例中，本文揭示T細胞藉由使用引導RNA及RNA引導之DNA結合劑，及一或多種包含異源性CTLA4核酸及異源性IL10核酸之構築體(例如供體構築體或模板)將異源性CTLA4核酸及異源性IL10核酸引入或插入T細胞或T細胞群體之基因體基因座內工程化，例如以製造工程化之T細胞。在一些實施例中，本文揭示藉由例如使用引導RNA及RNA引導之DNA結合劑及一或多種包含異源性CTLA4核酸及異源性IL10核酸之構築體(例如供體構築體或模板)，自T細胞或T細胞群體之基因體基因座表現異源性CTLA4及異源性IL10而工程化之T細胞。在一些實施例中，本文揭示藉由例如使用引導RNA及RNA引導之DNA結合劑(例如CRISPR/Cas系統)，於T細胞或T細胞群體之基因體內誘導斷裂(例如雙股斷裂(DSB)或單股斷裂(切口))以插入CTLA4基因及IL10基因而工程化之T細胞。在一些實施例中，該等引導RNA藉由RNA引導之DNA結合劑(例如Cas核酸酶)於本文描述之位點介導靶特异性切割以插入編碼兩個或更多個

調節T細胞促進分子(例如IL10及CTLA4)之序列。應知曉，在一些實施例中，該等引導RNA包含結合至或可結合至該等區域之引導序列。亦提供藉由該等方法製造之細胞及細胞群體。

**【0106】** 下文提供調節T細胞促進分子之例示性核苷酸及多肽序列。用於鑑別編碼多肽序列之替代核苷酸序列(包括替代天然存在之變體及非人類同源物)之方法為此項技術中已知。下文提供編碼IL10及CTLA4之例示性核酸序列。其他合適之IL10及CTLA4序列為此項技術中已知。參見，例如，Gorby等人，Engineered IL-10 variants elicit potent immuno-modulatory activities at therapeutic low ligand doses, *BioRxiv* (2020)及Xu等人，Affinity and cross-reactivity engineering of CTLA4-Ig to modulate T cell costimulation, *J Immunol* (2012)，其等內容及序列係以引用之方式併入本文中。用於鑑別替代IL10及CTLA4序列之方法亦為此項技術中已知。參見，例如，同上，亦審慎考慮與本文描述之核酸序列、胺基酸序列或編碼胺基酸序列之核酸序列中之任一者(例如，由於突變或截短)具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之序列。在一些實施例中，亦提供編碼本文提供之胺基酸序列中之任一者之核酸序列。

**【0107】** 提供編碼IL10之非限制性例示性核酸序列：

野生型IL10：

ATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCCTCCTGACTG  
GGGTGAGGGCCAGCCCAGGCCAGGGCACCAGTCTGAGAACAGC  
TGCACCCACTTCCCAGGCAACCTGCCTAACATGCTTCGAGATCTCC  
GAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATC

AGCTGGACAACCTTGTTGTTAAAGGAGTCCTTGCTGGAGGACTTTA  
AGGGTTACCTGGGTTGCCAAGCCTTGTCTGAGATGATCCAGTTTTA  
CCTGGAGGAGGTGATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCAGACA  
TCAAGGCGCATGTGAACTCCCTGGGGGAGAACCTGAAGACCCTCA  
GGCTGAGGCTACGGCGCTGTCATCGATTTCTTCCCTGTGAAAACA  
AGAGCAAGGCCGTGGAGCAGGTGAAGAATGCCTTTAATAAGCTCC  
AAGAGAAAGGCATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCA  
TCAACTACATAGAAGCCTACATGACAATGAAGATACGAAAC (SEQ  
ID NO: 122)

## 【0108】

高親和力IL10 (N36I、N110I、K117N、F129L) :

ATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCCTCCTGACTG  
GGGTGAGGGCCAGCCCAGGCCAGGGCACCCAGTCTGAGAACAGC  
TGCACCCACTTCCCAGGCATCCTGCCTAACATGCTTCGAGATCTCC  
GAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATC  
AGCTGGACAACCTTGTTGTTAAAGGAGTCCTTGCTGGAGGACTTTA  
AGGGTTACCTGGGTTGCCAAGCCTTGTCTGAGATGATCCAGTTTTA  
CCTGGAGGAGGTGATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCAGACA  
TCAAGGCGCATGTG<sup>Gatc</sup>TCCCTGGGGGAGAACCTGAATACCCTCAG  
GCTGAGGCTACGGCGCTGTCATCGA<sup>ctc</sup>CTTCCCTGTGAAAACAAG  
AGCAAGGCCGTGGAGCAGGTGAAGAATGCCTTTAATAAGCTCCAA  
GAGAAAGGCATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCATC  
AACTACATAGAAGCCTACATGACAATGAAGATACGAAAC (SEQ ID

NO: 123)

【0109】 提供IL10之非限制性例示性胺基酸序列：

野生型IL10：

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRD  
LRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFY  
LEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRRCHRFLPCENKSK  
AVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN (SEQ ID

NO: 124)

【0110】

高親和力IL10 (N36I、N110I、K117N、F129L)：

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGILPNMLRDL  
RDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFY  
EEVMPQAENQDPDIKAHVISLGENLNTLLRLRRCHRLLPCENKSKA  
VEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN (SEQ ID

NO: 125)

【0111】 提供編碼CTLA4之非限制性例示性核酸序列：

野生型CTLA4：

ATGGCCTGCTTGGGCTTCCAAAGGCATAAAGCCCAGCTTAAT  
CTTGCTACTCGCACGTGGCCCTGCACATTGCTCTTTTTTCCTCCTGTT  
CATTCCCGTGTTTTGCAAGGCGATGCATGTGGCACAACCTGCCGTC  
GTTCTGGCATCATCAAGAGGTATTGCTAGCTTCGTTTGTGAGTACG  
CCTCCCCTGGAAAAGCGACGGAGGTGCGCGTCACTGTATTGCGGC  
AAGCCGACAGCCAAGTTACTGAAGTCTGCGCGGCAACGTATATGA

TGGGCAATGAGCTGACATTCCTTGACGATTCAATCTGCACGGGAA  
 CAAGTAGTGGTAACCAGGTGAATCTCACTATTCAAGGTCTGAGAG  
 CCATGGACACCGGCCTCTACATTTGTAAGGTGGAGCTGATGTATC  
 CTCCCCCATATTATCTGGGGATCGGAAATGGGACACAGATATATG  
 TTATTGATCCCGAGCCATGTCCCGATAGTGACTTCCTCTTGTGGAT  
 ACTTGCCGCTGTGAGCAGTGGTTTGTTTTTTTTATTCATTCCTCCTTA  
 CGGCAGTATCACTTTCAAAAATGCTCAAGAAGCGAAGTCCTTTGA  
 CAACTGGCGTATATGTCAAAAATGCCACCAACAGAGCCCGAATGTG  
 AGAAACAGTTCCAGCCGTACTTTATTCCTATAAAC (SEQ ID NO:  
 126)

**【0112】**

高親和力 CTLA4 (貝拉西普 (belatacept) ; 結合域 : A29Y 、  
 L104E) :

ATGGCCTGCTTGGGCTTCCAAAGGCATAAAGCCCAGCTTAAT  
 CTTGCTACTCGCACGTGGCCCTGCACATTGCTCTTTTTTCCTCCTGTT  
 CATTCCCGTGTTTTGCAAGGCGATGCATGTGGCACAACCTGCCGTC  
 GTTCTGGCATCATCAAGAGGTATTGCTAGCTTCGTTTGTGAGTACG  
 CCTCCCCTGGAAAATACACGGAGGTGCGCGTCACTGTATTGCGGC  
 AAGCCGACAGCCAAGTTACTGAAGTCTGCGCGGCAACGTATATGA  
 TGGGCAATGAGCTGACATTCCTTGACGATTCAATCTGCACGGGAA  
 CAAGTAGTGGTAACCAGGTGAATCTCACTATTCAAGGTCTGAGAG  
 CCATGGACACCGGCCTCTACATTTGTAAGGTGGAGCTGATGTATC  
 CTCCCCCATATTATGAGGGGATCGGAAATGGGACACAGATATATG

TTATTGATCCCGAGCCATGTCCCGATAGTGACTTCCTCTTGTGGAT  
 ACTTGCCGCTGTGAGCAGTGGTTTGTTTTTTTTATTCATTCCTCCTTA  
 CGGCAGTATCACTTTCAAAAATGCTCAAGAAGCGAAGTCCTTTGA  
 CAACTGGCGTATATGTCAAAAATGCCACCAACAGAGCCCGAATGTG  
 AGAAACAGTTCCAGCCGTACTTTATTCCTATAAAC (SEQ ID NO:  
 127)

**【0113】**

高親和力CTLA4 (結合域：A29H)：

ATGGCCTGCTTGGGCTTCCAAAGGCATAAAGCCCAGCTTAAT  
 CTTGCTACTCGCACGTGGCCCTGCACATTGCTCTTTTTTCCTCCTGTT  
 CATTCCCGTGTTTTTGCAAGGCGATGCATGTGGCACAACTGCCGTC  
 GTTCTGGCATCATCAAGAGGTATTGCTAGCTTCGTTTGTGAGTACG  
 CCTCCCCTGGAAAACATACGGAGGTGCGCGTCACTGTATTGCGGC  
 AAGCCGACAGCCAAGTTACTGAAGTCTGCGCGGCAACGTATATGA  
 TGGGCAATGAGCTGACATTCCTTGACGATTCAATCTGCACGGGAA  
 CAAGTAGTGGTAACCAGGTGAATCTCACTATTCAAGGTCTGAGAG  
 CCATGGACACCGGCCTCTACATTTGTAAGGTGGAGCTGATGTATC  
 CTCCCCCATATTATCTGGGGATCGGAAATGGGACACAGATATATG  
 TTATTGATCCCGAGCCATGTCCCGATAGTGACTTCCTCTTGTGGAT  
 ACTTGCCGCTGTGAGCAGTGGTTTGTTTTTTTTATTCATTCCTCCTTA  
 CGGCAGTATCACTTTCAAAAATGCTCAAGAAGCGAAGTCCTTTGA  
 CAACTGGCGTATATGTCAAAAATGCCACCAACAGAGCCCGAATGTG  
 AGAAACAGTTCCAGCCGTACTTTATTCCTATAAAC (SEQ ID NO:

128)

## 【0114】

高親和力CTLA4 (結合域：K28H、A29H)：

ATGGCCTGCTTGGGCTTCCAAAGGCATAAAGCCCAGCTTAAT  
CTTGCTACTCGCACGTGGCCCTGCACATTGCTCTTTTTTCCTCCTGTT  
CATTCCCGTGTTTTTGCAAGGCGATGCATGTGGCACAACTGCCGTC  
GTTCTGGCATCATCAAGAGGTATTGCTAGCTTCGTTTGTGAGTACG  
CCTCCCCTGGACATCACACGGAGGTGCGCGTCACTGTATTGCGGC  
AAGCCGACAGCCAAGTTACTGAAGTCTGCGCGGCAACGTATATGA  
TGGGCAATGAGCTGACATTCCTTGACGATTCAATCTGCACGGGAA  
CAAGTAGTGGTAACCAGGTGAATCTCACTATTCAAGGTCTGAGAG  
CCATGGACACCGGCCTCTACATTTGTAAGGTGGAGCTGATGTATC  
CTCCCCCATATTATCTGGGGATCGGAAATGGGACACAGATATATG  
TTATTGATCCCGAGCCATGTCCCGATAGTGACTTCCTCTTGTGGAT  
ACTTGCCGCTGTGAGCAGTGGTTTTTTTTTTATTCATTCCTCCTTA  
CGGCAGTATCACTTTCAAAAATGCTCAAGAAGCGAAGTCCTTTGA  
CAACTGGCGTATATGTCAAAAATGCCACCAACAGAGCCCGAATGTG  
AGAAACAGTTCCAGCCGTACTTTATTCCTATAAAC (SEQ ID NO:

129)

【0115】 提供CTLA4之非限制性例示性胺基酸序列：

野生型CTLA4：

MACLGFQRHKAQLNLATRTWPCTLLFLLFIPVFCKAMHVAQP  
AVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATY

MMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYP  
PPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVS  
LSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPEPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:  
130)

**【0116】**

高親和力CTLA4 (貝拉西普；結合域：A29Y、L104E)：

MACLGFQRHKAQLNLATRTPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQP  
AVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATY  
MMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYP  
PPYYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVS  
LSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPEPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:  
131)

**【0117】**

高親和力CTLA4 (結合域：A29H)：

MACLGFQRHKAQLNLATRTPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQP  
AVVLASSRGIASFVCEYASPGKHTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATY  
MMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYP  
PPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVS  
LSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPEPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:  
132)

**【0118】**

高親和力CTLA4 (結合域：K28H、A29H)：

MACLGFQRHKAQLNLATRTPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQP

AVVLASSRGIASFVCEYASPGHHTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATY  
MMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYP  
PPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVS  
LSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPEPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:  
133)

**【0119】** 在一些實施例中，包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼調節T細胞促進分子之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞或T細胞群體顯示天然存在之調節T細胞(nTreg)之至少一種抑制活性，例如，活體外或活體內分析(例如，GvHD之動物模型)中免疫反應或生物標誌物之抑制。在一些實施例中，包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼調節T細胞促進分子之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞或T細胞群體相較於nTreg顯示經改善之抑制活性，例如，活體外或活體內分析(例如，GvHD之動物模型)中免疫反應或生物標誌物之抑制增加。例如，於GvHD之小鼠模型中，接受包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)及將在啟動子序列之控制下編碼調節T細胞促進分子之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞的小鼠相較於對照(例如，接受PBMC之小鼠)顯示經改善之存活。

### **【0120】**

#### **B. 靶向受體**

在一些實施例中，包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減

弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如,減弱),及將在啟動子序列之控制下編碼調節T細胞促進分子之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞進一步包含插入編碼靶向受體之異源性序列之細胞內。編碼該靶向受體之序列係在啟動子序列(例如,內源性啟動子或異源性啟動子)控制下。

**【0121】** 在一些實施例中,靶向受體係嵌合抗原受體(CAR)、T細胞受體(TCR),或通過內部傳訊域中之至少一個跨膜域可操作地連接之細胞表面分子之受體,內部傳訊域在一經結合細胞外受體部分即可活化T細胞。在一些實施例中,該靶向受體可為存在於細胞(例如,T細胞)表面上以允許該細胞結合至靶位點(例如,有機體中之特定細胞或組織)之受體。該靶向受體未必係抗原受體,例如,該靶向受體可為可靶向整合素之RGD肽。在一些實施例中,該靶向受體靶向選自由以下組成之群之分子: MAdCAM-1、TNFA、CEACAM6、VCAM-1、瓜胺酸化波形蛋白、髓鞘鹼性蛋白(MBP)、MOG(髓鞘寡樹突膠細胞醣蛋白)、蛋白脂蛋白1(PLP1)、CD19分子(CD19)、CD20分子(CD20)、TNFRSF17、二肽基肽酶樣6(DPP6)、溶質載體家族2成員2(SCL2A2)、麩胺酸脫羧酶(GAD2)、橋粒芯蛋白3(DSG3),及MHC I類HLA-A(HLA-A\*02)。

**【0122】** 在一些實施例中,工程化之T細胞包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如,減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如,減弱)、編碼選自IL10、CTLA4、TGFB1、IDO1、ENTPD1、NT5E、IL22、AREG、IL35、GARP、CD274、FOXP3、IKZF2、EOS、IRF4、LEF1及BACH2之調節T細胞促進分子之序列之插入及編碼靶向受體(例如,CAR,例如,靶向MAdCAM-1之CAR)之序列之插入。

**【0123】** 在一些實施例中，工程化之T細胞包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼IL10之序列之插入及編碼靶向受體(例如，CAR，例如，靶向MAdCAM-1之CAR)之序列之插入。

**【0124】** 在一些實施例中，工程化之T細胞包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼CTLA4之序列之插入及編碼靶向受體(例如，CAR，例如，靶向MAdCAM-1之CAR)之序列之插入。

**【0125】** 在一些實施例中，工程化之T細胞包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼IL10之序列之插入、編碼CTLA4之序列之插入及編碼靶向受體(例如，CAR，例如，靶向MAdCAM-1之CAR)之序列之插入。

**【0126】** 在一些實施例中，將編碼靶向受體之序列併入表現構築體內。在一些實施例中，包含編碼靶向受體之序列之表現構築體進一步包含編碼調節T細胞促進分子之序列，例如，將編碼該靶向受體之序列及編碼該調節T細胞促進分子之序列併入相同之表現構築體內。在一些實施例中，包含編碼該靶向受體之序列之表現構築體不進一步包含編碼調節T細胞促進分子之序列，例如，將編碼該調節T細胞促進分子之序列併入各別之表現構築體內。在一些實施例中，包含編碼該靶向受體之序列之表現構築體係游離基因體表現構築體。在一些實施例中，將編碼該靶向受體之序列插入基因體內，例如，靶向或非靶向插入。

**【0127】** 在一些實施例中，編碼靶向受體之序列可插入選自以下之位點內：TCR基因座，例如，TRAC基因座、TNF基因座、IFNG基因

座、IL17A基因座、IL6基因座、IL2基因座或腺相關病毒整合位點1 (AAVS1)基因座。

**【0128】** 在一些實施例中，工程化之T細胞包含藉由基因編輯之編碼靶向受體之序列之插入，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。

**【0129】** 在一些實施例中，T細胞群體包含T細胞，其等係經工程化以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼調節T細胞促進分子之序列之插入及編碼靶向受體(例如，CAR)之序列之插入。在一些實施例中，該T細胞群體中至少40%、45%，較佳至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%T細胞係經工程化以包含編碼該靶向受體之序列之插入，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。應瞭解可使用此項技術中已知的選擇方法富集具有靶向受體之細胞群體中的T細胞群體。

**【0130】** 在一些實施例中，本文揭示工程化之T細胞，藉由使用引導RNA及RNA引導之DNA結合劑，及包含靶向受體(例如，CAR)、核酸之構築體(例如，供體構築體或模板)將靶向受體(例如，CAR)、核酸引入或插入於T細胞內，例如，於T細胞或T細胞群體之基因體基因座內例如以製造工程化之T細胞。在一些實施例中，本文揭示藉由(例如)使用引導RNA及RNA引導之DNA結合劑及包含靶向受體(例如，CAR)、核酸之構築體(例如，供體)，自T細胞或T細胞群體之基因體基因座表現靶向受體(例如，CAR)而經工程化之T細胞。在一些實施例中，本文揭示藉由(例如)使用引導RNA及RNA引導之DNA結合劑(例如，CRISPR/Cas系統)，於T細胞或T細胞群體之基因體內誘導斷裂(例如，雙股斷裂(DSB)或單股

斷裂(切口))以插入該靶向受體(例如，CAR)而經工程化之T細胞。亦提供藉由該等方法製造之細胞及細胞群體。

**【0131】** 在一些實施例中，靶向受體(例如，CAR)可賦予包含該靶向受體(例如，CAR)之工程化之T細胞例如對特定細胞、組織或器官之靶特异性。

**【0132】** 在一些實施例中，靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至胃腸道系統，例如，該靶向受體係靶向MAdCAM-1之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如發炎腸疾、潰瘍性結腸炎或克羅恩氏病)中之免疫反應。

**【0133】** 在一些實施例中，靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至發炎組織，例如，該靶向受體係靶向TNFA之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如發炎腸疾、潰瘍性結腸炎或克羅恩氏病)中之免疫反應。

**【0134】** 在一些實施例中，靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至內皮細胞，例如，該靶向受體係靶向CEACAM6之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如克羅恩氏病)中之免疫反應(包括發炎)。

**【0135】** 在一些實施例中，靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至包含內皮細胞之組織，例如，該靶向受體係靶向VCAM-1之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如克羅恩氏病及多發性硬化症)中之免疫反應。

**【0136】** 在一些實施例中，CAR可將工程化之T細胞靶向至滑膜組織，例如，該靶向受體係靶向瓜胺酸化波形蛋白之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如類風濕性關節炎)中之免疫反應。

**【0137】** 在一些實施例中，靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T

細胞靶向至神經組織，例如，該靶向受體係靶向MBP、MOG或PLP1之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如多發性硬化症)中之免疫反應。

**【0138】** 在一些實施例中，靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至B細胞，例如，該靶向受體係靶向CD19之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如多發性硬化症及全身性紅斑狼瘡)中之免疫反應。

**【0139】** 在一些實施例中，靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至B細胞，例如，該靶向受體係靶向CD20之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如多發性硬化症及全身性紅斑狼瘡)中之免疫反應。

**【0140】** 在一些實施例中，靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至包含成熟B淋巴細胞之組織，例如，該靶向受體係靶向TNFRSF17之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如全身性紅斑狼瘡)中之免疫反應。

**【0141】** 在一些實施例中，靶向受體(例如，CAR)靶向SCL2A2。在一些實施例中，該靶向受體(例如，CAR)靶向DPP6。在一些實施例中，該靶向受體(例如，CAR)靶向GAD2。在一些實施例中，該靶向受體(例如，CAR)靶向DSG3。在一些實施例中，該靶向受體(例如，CAR)靶向MHC I類HLA-A (HLA-A\*02)。

**【0142】** 靶向(例如)發炎抗原之另外CAR為此項技術中已知。參見，例如，WO2020092057A1，該案之內容係以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，插入可藉由偵測受關注之工程化之T細胞、工程化之T細胞群體、組織、體液或包含該等工程化之T細胞之組織培養基中蛋白質或mRNA之量評估。在一些實施例中，藉由基因編輯之插入可藉由序列，例如，下一代測序(NGS)評估。用於靶向受體(例如，CAR)之蛋白

質及mRNA表現之分析係經本文描述且為此項技術中已知。

**【0143】** 在一些實施例中，工程化之T細胞或T細胞群體不包括異源性靶向受體。

**【0144】**

### **C. T細胞受體(TCR)**

在一些實施例中，包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼調節T細胞促進分子之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞或T細胞群體進一步包含編碼TCR基因序列之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)。

**【0145】** 在一些實施例中，包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、將在啟動子序列之控制下編碼調節T細胞促進分子之異源性序列插入細胞內、將編碼靶向受體之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞或T細胞群體進一步包含編碼TCR基因序列之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)。

**【0146】** 通常，TCR係含有兩個TCR多肽鏈( $\alpha$ 及 $\beta$ )之異二聚體受體分子。適用於靶向減弱之 $\alpha$ 及 $\beta$ 基因體序列或基因座為此項技術中已知。在一些實施例中，該等工程化之T細胞包含TCR  $\alpha$ 鏈基因序列(例如，TRAC)之修飾(例如，減弱)。參見，例如，NCBI Gene ID：28755；Ensembl：ENSG00000277734 (T細胞受體 $\alpha$ 恆定)、US 2018/0362975及WO2020081613。

**【0147】** 在一些實施例中，工程化之T細胞或T細胞群體包含編碼

IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼選自IL10、CTLA4、TGFB1、IDO1、ENTPD1、NT5E、IL22、AREG、IL35、GARP、CD274、FOXP3、IKZF2、EOS、IRF4、LEF1及BACH2之調節T細胞促進分子之序列之插入，及編碼TCR基因序列之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)。

**【0148】** 在一些實施例中，工程化之T細胞或T細胞群體包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼IL10或CTLA4之序列之插入，及編碼TCR基因序列之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)。

**【0149】** 在一些實施例中，工程化之T細胞或T細胞群體包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼調節T細胞促進分子之序列之插入，及內源性TCR基因序列(例如，TRAC基因序列)之修飾(例如，減弱)。

**【0150】** 在一些實施例中，工程化之T細胞或T細胞群體包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼選自IL10、CTLA4、TGFB1、IDO1、ENTPD1、NT5E、IL22、AREG、IL35、GARP、CD274、FOXP3、IKZF2、EOS、IRF4、LEF1及BACH2之調節T細胞促進分子之序列之插入，及內源性TCR基因(例如，TRAC基因序列)之修飾(例如，減弱)。

**【0151】** 在一些實施例中，工程化之T細胞或T細胞群體包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼IL10或CTLA4之序列之插入，及TCR基因(例如，TRAC基因序列)之修飾(例如，減弱)。

**【0152】** 在一些實施例中，工程化之T細胞或T細胞群體包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼調節T細胞促進分子之序列之插入，及內源性TCR基因(例如，TRAC基因序列)之修飾(例如，減弱)。

**【0153】** 在此等實施例之任一者中，工程化之T細胞或T細胞群體可進一步包含編碼如本文描述之靶向受體(例如，CAR，例如，靶向MAdCAM-1之CAR)之序列之插入。

**【0154】** 在一些實施例中，工程化之T細胞或T細胞群體包含藉由基因編輯之TRC基因序列之修飾(例如，減弱)，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估，其中至少50%、55%、60%、65%，較佳至少70%、75%、80%、85%、90%或95%細胞包含插入、缺失或取代於內源性TRC基因序列中。在一些實施例中，相較於合適對照(例如，其中尚未修飾該TRC基因)，TRC減少至少50%、55%、60%、65%，較佳至少70%、75%、80%、85%、90%、95%，或減少至低於分析之偵測限值。用於TRC蛋白質及mRNA表現之分析為此項技術中已知。

**【0155】** 在一些實施例中，工程化之T細胞或T細胞群體包含藉由基因編輯插入編碼靶向受體之序列，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。

**【0156】** 在一些實施例中，T細胞群體包含經工程化以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼調節T細胞促進分子之序列之插入，及至少一個TCR基因序列之修飾(例如，減弱)之T細胞。在一些實施例中，該T細胞群體中至少50%、55%、60%、65%，較佳至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%T細胞係經工程化以包含至少一個TCR基因序列

之修飾(例如，減弱)，例如，如藉由測序(例如，NGS)評估。

**【0157】** 在一些實施例中，使用特異性靶向TCR基因(例如，TRAC基因)內之位點之引導RNA以提供該等TCR基因之修飾(例如，減弱)。

**【0158】** 在一些實施例中，TCR基因使用引導RNA及RNA引導之DNA結合劑於T細胞中經修飾(例如，減弱)。在一些實施例中，本文揭示藉由(例如)使用引導RNA及RNA引導之DNA結合劑(例如，CRISPR/Cas系統)，於T細胞之TCR基因內誘導斷裂(例如，雙股斷裂(DSB)或單股斷裂(切口))而經工程化之T細胞。該等方法可活體外或離體用於例如製造用於抑制免疫反應之細胞產物。

**【0159】** 在一些實施例中，引導RNA藉由RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas核酸酶)於TCR基因內之本文描述之位點處介導靶特異性切割。應知曉，在一些實施例中，該等引導RNA包含結合至或可結合至該等區域之引導序列。

#### **【0160】**

#### **D. 引導RNA**

在本文實施例之任一者中，引導RNA可進一步包含trRNA。在本文描述之各組合物及方法實施例中，crRNA及trRNA可結合成單個RNA (sgRNA)或可位於各別RNA (dgRNA)上。在sgRNA之內文中，該等crRNA及trRNA組分可(例如)經由磷酸二酯鍵或其他共價鍵共價連接。在一些實施例中，該sgRNA包含一或多個不為磷酸二酯鍵聯之鍵聯於核苷酸之間。

**【0161】** 在本文描述之組合物、用途及方法實施例之各者中，引導RNA可包含呈「雙重引導RNA」或「dgRNA」的兩個RNA分子。該

dgRNA包含第一RNA分子及第二RNA分子，該第一RNA分子包含含有(例如)本文顯示之引導序列之crRNA，及該第二RNA分子包含trRNA。該第一及第二RNA分子可不為共價連接，但可經由該crRNA與該trRNA部分之間的鹼基配對形成RNA雙螺旋。

**【0162】** 在本文描述之組合物、用途及方法實施例之各者中，引導RNA可包含呈「單個引導RNA」或「sgRNA」的單個RNA分子。該sgRNA可包含crRNA (或其部分)，其包含本文顯示之引導序列共價連接至trRNA。該sgRNA可包含本文顯示之引導序列之15、16、17、18、19或20個連續核苷酸。在一些實施例中，該crRNA及該trRNA係經由連接子共價連接。在一些實施例中，該sgRNA經由該crRNA與該trRNA部分之間之鹼基配對形成莖環結構。在一些實施例中，該crRNA及該trRNA係經由一或多個不為磷酸二酯鍵之鍵共價連接。

**【0163】** 在一些實施例中，trRNA可包含來源於天然存在之CRISPR/Cas系統之trRNA序列之所有或部分。在一些實施例中，該trRNA包含經截短或修飾之野生型trRNA。該trRNA之長度取決於所用CRISPR/Cas系統。在一些實施例中，該trRNA包含5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100或超過100個核苷酸或由其構成。在一些實施例中，該trRNA可包含某些二級結構，諸如，例如，一或多個髮夾或莖環結構，或一或多個凸起結構。

**【0164】** 在一些實施例中，靶序列或區域可與引導RNA之引導序列互補。在一些實施例中，引導RNA之引導序列與其相應靶序列之間的互補性或一致性程度可為75%、80%、85%、90%、95%或100%。在一些實

施例中，該靶序列及gRNA之引導序列可為100%互補或一致。在其他實施例中，該靶序列及該gRNA之引導序列可含有一個錯配。例如，該靶序列及該gRNA之引導序列可含有1、2、3、4或5個錯配，其中該引導序列之總長度係約20或20。在一些實施例中，該靶序列及該gRNA之引導序列可含有1至4個錯配，其中該引導序列係約20或20個核苷酸。

**【0165】** 在本文實施例之任一者中，本文引導序列中之各者可進一步包含另外核苷酸以形成crRNA或引導RNA，例如，在該引導序列後的其3'端具有下列例示性核苷酸序列：以5'至3'方向，GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 134)。在sgRNA之情況下，上文引導序列可進一步包含另外核苷酸以形成sgRNA，例如，在該引導序列之3'端後具有下列例示性核苷酸序列：

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC  
CGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ  
ID NO: 135)或

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC  
CGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID  
NO: 136)。

**【0166】** 在任何實施例中，本文揭示之引導RNA結合至原型間隔區相鄰基序(PAM)上游之區域。如熟習此項技術者將瞭解，該PAM序列出現於與含有靶序列之股相對之股上並隨CRISPR/Cas系統變化。即，該PAM序列係於靶股之互補股上(該股含有引導RNA結合之靶序列)。在一些實施例中，該PAM係選自由以下組成之群：NGG、NNGRRT、NNGRR(N)、NNAGAAW、NNNNG(A/C)TT及NNNNRYAC。

【0167】 在一些實施例中，本文提供之引導RNA序列係與PAM序列相鄰之序列互補。

【0168】 在一些實施例中，引導RNA序列包含與選自本文表格的根據人類參考基因體hg38中之坐標之基因體區域內之序列互補之序列。在一些實施例中，該引導RNA序列包含與包含來自選自本文表格之基因體區域內之5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25個連續核苷酸之序列互補之序列。在一些實施例中，該引導RNA序列包含與包含跨選自本文表格之基因體區域之5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25個連續核苷酸之序列互補之序列。

【0169】 本文揭示之引導RNA介導導致雙股斷裂(DSB)之靶特異性切割。本文揭示之引導RNA介導導致單股斷裂(SSB或切口)之靶特異性切割。

## 【0170】

### E. 經化學修飾之gRNA

在本文實施例之任一者中，gRNA可經化學修飾。包含一或多種經修飾之核苷或核苷酸之gRNA稱為「經修飾之」gRNA或「經化學修飾之」gRNA，以描述一或多種用以替代或補充典型A、G、C及U殘基之非天然或天然存在之組分或構型之存在。在一些實施例中，經修飾之gRNA用非典型核苷或核苷酸合成，本文稱為「經修飾」。經修飾之核苷及核苷酸可包括以下中之一或多者：(i)磷酸二酯主鏈鍵聯中非連接之磷酸酯氧之一或兩者或連接之磷酸酯氧之一或多者之改變，例如，替代(例示性主鏈修飾)；(ii)核糖糖之成分(例如，核糖糖上2'羥基)的改變，例如，替代(例示

性糖修飾)；(iii)用「脫磷酸化」連接子大規模替代磷酸酯部分(例示性主鏈修飾)；(iv)包括用非典型核鹼基修飾或替代天然存在之核鹼基(例示性鹼基修飾)；(v)核糖-磷酸酯主鏈之替代或修飾(例示性主鏈修飾)；(vi)寡核苷酸之3'端或5'端之修飾，例如，末端磷酸酯基團之移除、修飾或替代或部分、帽或連接子之結合(此等3'或5'帽修飾可包含糖或主鏈修飾)；及(vii)糖之修飾或替代(例示性糖修飾)。

**【0171】** 化學修飾(諸如彼等上文列舉者)可組合以提供包含核苷及核苷酸(統稱為「殘基」)之經修飾之gRNA，其等可具有二、三、四或更多個修飾。例如，經修飾之殘基可具有經修飾之糖及經修飾之核鹼基。在一些實施例中，gRNA之每個鹼基均經修飾，例如，所有鹼基均具有經修飾之磷酸酯基團，諸如硫代磷酸酯基團。在某些實施例中，gRNA分子之磷酸酯基團之所有或大體上所有係經硫代磷酸酯基團置換。在一些實施例中，經修飾之gRNA包含至少一個經修飾之殘基於該RNA之5'端或附近。在一些實施例中，經修飾之gRNA包含至少一個經修飾之殘基於該RNA之3'端或附近。某些gRNA包含至少一個經修飾之殘基於該之RNA之5'端及3'端或附近。

**【0172】** 在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含WO2018/107028中揭示之修飾模式中之一者，該案之內容係以係以引用之方式併入本文之相關部分中。在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含US20170114334中揭示之結構/修飾模式中之一者，該案係以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文揭示之引導RNA包含WO2017/136794、WO2017004279、US2018187186、US2019048338中揭示之結構/修飾模式中之一者，其等係以引用之方式併入本文中。

**【0173】****F. 編碼RNA引導之DNA結合劑之mRNA**

在一些實施例中，細胞或方法包含mRNA，其包含編碼RNA引導之DNA結合劑(諸如如本文描述之Cas核酸酶)之開放閱讀框(ORF)。Cas9 ORF係由本文提供且為此項技術中已知。作為一項實例，該Cas9 ORF可經密碼子最佳化，使得編碼序列包括一或多種胺基酸之一或多種替代密碼子。如本文使用之「替代密碼子」係指給定胺基酸之密碼子用法之變化，且可或可不為給定表現系統之較佳或最佳化密碼子(經密碼子最佳化)。較佳密碼子用法或給定表現系統中耐受良好之密碼子為此項技術中已知。WO2013/176772、WO2014/065596、WO2016/106121及WO2019/067910之Cas9編碼序列、Cas9 mRNA及Cas9蛋白質序列係以引用之方式併入本文中。特定言之，WO2019/067910段落[0449]處表之ORF及Cas9胺基酸序列，及WO2019/067910之段落[0214]至[0234]之Cas9 mRNA及ORF係以引用之方式併入本文中。

**【0174】** 在一些實施例中，經修飾之ORF可於至少於一個、複數個或所有尿苷位置處包含經修飾之尿苷。在一些實施例中，該經修飾之尿苷係於5位置處，例如，經鹵素、甲基或乙基修飾之尿苷。在一些實施例中，該經修飾之尿苷係於1位置處，例如，經鹵素、甲基或乙基修飾之假尿苷。該經修飾之尿苷可為(例如)假尿苷、N1-甲基-假尿苷、5-甲氧基尿苷、5-碘尿苷，或其組合。在一些實施例中，該經修飾之尿苷係5-甲氧基尿苷。在一些實施例中，該經修飾之尿苷係5-碘尿苷。在一些實施例中，該經修飾之尿苷係假尿苷。在一些實施例中，該經修飾之尿苷係N1-甲基-假尿苷。在一些實施例中，該經修飾之尿苷係假尿苷及N1-甲基-假尿苷之

組合。在一些實施例中，該經修飾之尿苷係假尿苷及5-甲氧基尿苷之組合。在一些實施例中，該經修飾之尿苷係N1-甲基假尿苷及5-甲氧基尿苷之組合。在一些實施例中，該經修飾之尿苷係5-碘尿苷及N1-甲基-假尿苷之組合。在一些實施例中，該經修飾之尿苷係假尿苷及5-碘尿苷之組合。在一些實施例中，該經修飾之尿苷係5-碘尿苷及5-甲氧基尿苷之組合。

**【0175】** 在一些實施例中，本文揭示之 mRNA 包含 5' 帽，諸如 Cap0、Cap1 或 Cap2。5' 帽係一般 7-甲基鳥嘌呤核糖核苷酸(其可經進一步修飾，例如，ARCA (抗反向帽類似物；Thermo Fisher Scientific 貨號 AM8045) 係包含 7-甲基鳥嘌呤 3'-甲氧基-5'-三磷酸酯連接至鳥嘌呤核糖核苷酸之 5' 位置之帽類似物) 通過 5'-三磷酸酯連接至 mRNA 之 5' 至 3' 鏈之第一核苷酸之 5' 位置，即，第一帽近端核苷酸。在 Cap0 中，該 mRNA 之第一及第二帽近端核苷酸之核糖兩者均包含 2'-羥基。在 Cap1 中，該 mRNA 之第一及第二轉錄核苷酸之核糖分別包含 2'-甲氧基及 2'-羥基。參見，例如，CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG；TriLink Biotechnologies 貨號 N-7113) 或 CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG；TriLink Biotechnologies 貨號 N-7133)。在 Cap2 中，該 mRNA 之第一及第二帽近端核苷酸之核糖兩者均包含 2'-甲氧基。參見，例如，Katibah 等人，(2014) Proc Natl Acad Sci USA 111(33):12025-30；Abbas 等人，(2017) Proc Natl Acad Sci USA 114(11):E2106-E2115。

**【0176】** 在一些實施例中，mRNA 進一步包含聚腺苷酸化(聚 A) 尾。在一些實施例中，該聚 A 尾包含 20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 個腺嘌呤 (SEQ ID NO: 147)，視需要多達 300 個腺嘌呤 (SEQ ID NO: 148)。在一些實施例中，該聚 A 尾包含 95、96、97、98、99 或 100 個

腺嘌呤核苷酸(SEQ ID NO: 149)。

**【0177】**

**G. 用於工程化之T細胞**

自富集CD4+ T細胞之細胞群體製備本文提供之工程化之細胞。此等細胞可容易獲自可自各種來源(包括(例如) StemCell Technologies)購買獲得之新鮮白細胞單采術(leukopak)樣本。CD4+ T細胞可使用市售套組使用例行方法，例如，藉由使用人類CD4+ T細胞分離套組陰性選擇進行分離。然而，自其他來源製備CD4+ T細胞之方法亦為此項技術中已知。例如，可使用多潛能細胞諸如造血幹細胞(HSC諸如彼等自骨髓或臍帶血分離者)、造血祖細胞細胞(例如，淋巴祖細胞細胞)或間充質幹細胞(MSC)以獲得CD4+ T細胞。多潛能細胞可發育成多於一種細胞類型，但在分化程度上比富潛能細胞更有限。該等多潛能細胞可來源於既定細胞系或自人類骨髓或臍帶分離。例如，該等HSC可自病患或健康供體在G-CSF誘導之移動、普樂沙福(plerixafor)誘導之移動，或其組合後分離。為自血液或骨髓分離HSC，血液或骨髓中之細胞可由結合非所需細胞之抗體諸如針對CD4及CD8 (T細胞)、CD45 (B細胞)、GR-1 (顆粒球)及Iad (分化之抗原呈遞細胞)之抗體加以淘選(參見，例如，Inaba等人，(1992) J Exp Med. 176: 1693-1702)。用以促進分化成CD4+ T細胞之方法為此項技術中已知。

**【0178】**

**III. 遞送方法**

引導RNA、RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas核酸酶)及本文揭示之核酸序列可使用此項技術中可用之各種已知且合適之方法活體外或離體遞送至細胞或細胞群體，以產生包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾

(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼調節T細胞促進分子(例如，IL10、CTLA4)之序列之插入；及視需要進一步包含編碼靶向受體(例如，CAR)之序列之插入，及視需要進一步包含TCR序列之修飾(例如，減弱)之工程化之T細胞。該引導RNA、RNA引導之DNA結合劑及核酸構築體可視需要使用相同或不同之遞送方法個別或以任何組合一起遞送。

**【0179】** 可使用習知基於病毒及非病毒之基因遞送方法以將引導RNA及RNA引導之DNA結合劑及供體構築體引入細胞(例如，哺乳動物細胞)及靶組織中。如本文進一步提供非病毒載體遞送系統核酸諸如非病毒載體、質體載體及例如裸核酸，及與遞送媒介物諸如脂質體、脂質奈米顆粒(LNP)或泊洛沙姆(poloxamer)複合之核酸。病毒載體遞送系統包括DNA及RNA病毒。

**【0180】** 用於核酸之非病毒遞送之方法及組合物包括電穿孔、脂轉染、顯微注射、基因槍(biolistics)、病毒體(virosome)、脂質體、免疫脂質體、LNP、聚陽離子或脂質:核酸結合物、裸核酸(例如，裸DNA/RNA)、人工病毒粒子，及藥劑增強之DNA攝取。使用(例如)Sonitron 2000系統(Rich-Mar)之聲孔法(sonoporation)亦可用於遞送核酸。

**【0181】** 含有引導RNA、RNA引導之DNA結合劑及供體構築體單獨或組合之各種遞送系統(例如，載體、脂質體、LNP)亦可對細胞或細胞培養物離體投與。投與係藉由通常用於將分子引入與血液、流體或細胞之最終接觸之途徑中之任一者，包括(但不限於)注射、輸注、局部施用及電穿孔。適用於投與此等核酸之方法為熟習此項技術者可用且熟知。

【0182】 在某些實施例中，本發明提供編碼本文揭示之組合物中之任一者之DNA或RNA載體，例如，包含本文描述之引導序列中之任一者或多者之引導RNA，例如，用於修飾(例如，減弱) IFNG及TNFA或包含編碼調節T細胞促進分子(例如，IL10)或靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)之序列之供體構築體。在一些實施例中，該載體亦包含編碼RNA引導之DNA結合劑之序列。在某些實施例中，本發明包含編碼本文描述之組合物中之任一者或多者，或以任何組合之DNA或RNA載體。在一些實施例中，該等載體進一步包含(例如)啟動子、強化子及調節序列。在一些實施例中，包含含有本文描述之引導序列中之任一者或多者之引導RNA之載體亦包含一或多種如本文揭示之編碼crRNA、trRNA，或crRNA及trRNA之核苷酸序列。

【0183】 在某些實施例中，本發明提供編碼調節T細胞促進分子及靶向受體之DNA或RNA載體。此等載體容許基於亦含有該調節T細胞促進分子之編碼序列之細胞之受體的存在選擇細胞。基於細胞表面分子之存在之陽性及陰性選擇方法為此項技術中已知。

【0184】 在一些實施例中，載體包含編碼本文描述之引導RNA之核苷酸序列。在一些實施例中，該載體包含一個拷貝之引導RNA。在其他實施例中，該載體包含超過一個拷貝之引導RNA。在具有超過一個引導RNA之實施例中，該等引導RNA可不相同，使得其等靶向不同之靶序列，或可因其等靶向相同之靶序列而為一致。在一些實施例中，在該等載體包含超過一個引導RNA之情況下，各引導RNA可具有其他不同之性質，諸如與RNA引導之DNA核酸酶之複合物(諸如Cas RNP複合物)內之活性或穩定性。在一些實施例中，編碼該引導RNA之核苷酸序列可操作地

連接至至少一種轉錄或轉譯控制序列，諸如啟動子，3' UTR或5' UTR。在一項實施例中，該啟動子可為tRNA啟動子，例如，tRNA<sup>Lys3</sup>或tRNA嵌合體。參見 Mefferd 等人，RNA. 2015 21:1683-9；Scherer 等人，Nucleic Acids Res. 2007 35: 2620-2628。在一些實施例中，該啟動子可由RNA聚合酶III (Pol III)識別。Pol III啟動子之非限制性實例包括U6及H1啟動子。在一些實施例中，編碼該引導RNA之核苷酸序列可操作地連接至小鼠或人類U6啟動子。在其他實施例中，編碼該引導RNA之核苷酸序列可操作地連接至小鼠或人類H1啟動子。在具有超過一個引導RNA之實施例中，用以驅動表現之啟動子可相同或不同。在一些實施例中，編碼該引導RNA之crRNA之核苷酸及編碼該引導RNA之trRNA之核苷酸可提供於相同載體上。在一些實施例中，編碼該crRNA之核苷酸及編碼該trRNA之核苷酸可由相同啟動子驅動。在一些實施例中，該crRNA及trRNA可轉錄為單一轉錄本。例如，該crRNA及trRNA可自單一轉錄本處理以形成雙分子引導RNA。或者，該crRNA及trRNA可轉錄為單分子引導RNA (sgRNA)。在其他實施例中，該crRNA及該trRNA可由相同載體上其等相應之啟動子驅動。在又其他實施例中，該crRNA及該trRNA可由不同載體編碼。

**【0185】** 在一些實施例中，編碼引導RNA之核苷酸序列可位於包含編碼RNA引導之DNA結合劑(諸如Cas蛋白)之核苷酸序列之相同載體上。在一些實施例中，該引導RNA及RNA引導之DNA結合劑(諸如Cas蛋白)之表現可由其等自身之相應啟動子驅動。在一些實施例中，該引導RNA之表現可由驅動RNA引導之DNA結合劑(諸如Cas蛋白)之表現之相同啟動子驅動。在一些實施例中，該引導RNA及RNA引導之DNA結合劑(諸如Cas

蛋白)轉錄本可包含於單一轉錄本內。例如，該引導RNA可於RNA引導之DNA結合劑(諸如Cas蛋白)轉錄本之未轉譯區域(UTR)內。在一些實施例中，該引導RNA可於該轉錄本之5' UTR內。在其他實施例中，該引導RNA可於該轉錄本之3' UTR內。在一些實施例中，該轉錄本之細胞內半衰期可藉由於其3' UTR內包含該引導RNA減小並藉此縮短其3' UTR之長度。在另外實施例中，該引導RNA可於該轉錄本之內含子內。在一些實施例中，可於該引導RNA所在內含子處添加合適之剪接位點使得該引導RNA正確剪接出該轉錄本。在一些實施例中，在時間上非常接近之該RNA引導之DNA結合劑(諸如Cas蛋白質)及該引導RNA自相同載體之表現可促進更高效形成CRISPR RNP複合物。

**【0186】** 在一些實施例中，編碼引導RNA或RNA引導之DNA結合劑之核苷酸序列可位於包含構築體之相同載體上，該構築體包含編碼調節T細胞促進分子(例如，IL10、CTLA4)；或靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)之序列。在一些實施例中，包含編碼該調節T細胞促進分子(例如，IL10、CTLA4)；或靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)之序列之構築體及相同載體上之引導RNA (或RNA引導之DNA結合劑)之接近性可促進該構築體更高效插入由該引導RNA/RNA引導之DNA結合劑產生之插入位點內。

**【0187】** 在某些實施例中，DNA及RNA載體可於該載體中或於基因體插入位點處包括超過一個用於在單個啟動子下表現之開放閱讀框。在此等實施例中，自裂解肽之編碼序列可包括於該等開放閱讀框之間。該自裂解肽可為(例如) 2A肽，例如，P2A肽、E2A肽、F2A肽或T2A肽。

**【0188】** 在一些實施例中，載體包含一或多種編碼sgRNA之核苷酸

序列及編碼RNA引導之DNA結合劑(其可為Cas蛋白，諸如Cas9或Cpf1)之mRNA。在一些實施例中，該載體包含一或多種編碼crRNA、trRNA之核苷酸序列及編碼RNA引導之DNA結合劑(其可為Cas蛋白，諸如，Cas9或Cpf1)之mRNA。在一項實施例中，該Cas9來自化膿性鏈球菌(即，Spy Cas9)。在一些實施例中，編碼該crRNA、trRNA，或crRNA及trRNA(其可為sgRNA)之核苷酸序列包含引導序列側接來自天然存在之CRISPR/Cas系統之重複序列之所有或部分或由其構成。包含該crRNA、trRNA，或crRNA及trRNA或由其構成之核酸可進一步包含載體序列，其中該載體序列包含連同該crRNA、trRNA，或crRNA及trRNA一起非天然發現之核酸或由其等構成。

**【0189】** 在一些實施例中，crRNA及trRNA係由一種載體內之非連續核酸編碼。在其他實施例中，該crRNA及該trRNA可由連續核酸編碼。在一些實施例中，該crRNA及該trRNA係由單個核酸之相對股編碼。在其他實施例中，該crRNA及該trRNA係由單個核酸之相同股編碼。

**【0190】** 在一些實施例中，如本文揭示，載體包含含有編碼調節T細胞促進分子(例如，IL10)，或靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1)之序列之供體構築體。在一些實施例中，除本文揭示之供體構築體外，該載體可進一步包含編碼如本文描述之引導RNA之核酸或編碼RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas核酸酶，諸如Cas9)之核酸。在一些實施例中，編碼RNA引導之DNA結合劑之核酸各或兩者均於來自包含本文揭示之供體構築體之載體之各別載體上。在實施例之任一者中，如本文描述，該載體可包括其他序列，其等包括(但不限於)啟動子、強化子、調節序列。在一些實施例中，該啟動子不驅動供體構築體之調節T細胞促進

分子(例如, IL10), 或靶向受體(例如, CAR, 例如, MAdCAM-1)之表現。在一些實施例中, 該載體包含一或多種編碼 crRNA、trRNA, 或 crRNA 及 trRNA 之核苷酸序列。在一些實施例中, 該載體包含一或多種編碼 sgRNA 之核苷酸序列及編碼 RNA 引導之 DNA 核酸酶(其可為 Cas 核酸酶(例如, Cas9))之 mRNA。在一些實施例中, 該載體包含一或多種編碼 crRNA、trRNA 之核苷酸序列, 及編碼 RNA 引導之 DNA 核酸酶(其可為 Cas 核酸酶, 諸如, Cas9)之 mRNA。在一些實施例中, 該 Cas9 來自化膿性鏈球菌(即, Spy Cas9)。在一些實施例中, 編碼該 crRNA、trRNA, 或 crRNA 及 trRNA (其可為 sgRNA) 之核苷酸序列包含引導序列側接來自天然存在之 CRISPR/Cas 系統之重複序列之所有或部分或由其構成。包含該 crRNA、trRNA, 或 crRNA 及 trRNA 或由其構成之核酸可進一步包含載體序列, 其中該載體序列包含連同該 crRNA、trRNA, 或 crRNA 及 trRNA 一起非天然發現之核酸或由其構成。

**【0191】** 在一些實施例中, 載體可為環狀。在其他實施例中, 該載體可為線性。在一些實施例中, 該載體可封閉於脂質奈米顆粒、脂質體、非脂質奈米顆粒或病毒殼體中。非限制性例示性載體包括質體、噬粒體、黏接質體、人工染色體、微型染色體、轉座子、病毒載體及表現載體。

**【0192】** 在一些實施例中, 載體可為病毒載體。在一些實施例中, 該病毒載體可自其野生型對應物進行基因修飾。例如, 該病毒載體可包含一或多種核苷酸之插入、缺失或取代以促進選殖或使得該載體之一或多種性質改變。此等性質可包括包裝能力、轉導效率、免疫原性、基因體整合、複製、轉錄及轉譯。在一些實施例中, 可刪除病毒基因體之一部分使得該病毒可包裝具有較大尺寸之外源性序列。在一些實施例中, 該病毒載

體可具有增強之轉導效率。在一些實施例中，可減少由該病毒誘導之免疫反應。在一些實施例中，促進將病毒序列整合於基因體內之病毒基因(諸如，例如，整合酶)可經突變使得該病毒變得非整合。在一些實施例中，該病毒載體可為複製缺陷。在一些實施例中，該病毒載體可包含外源性轉錄或轉譯控制序列以驅動編碼序列於該載體上之表現。在一些實施例中，該病毒可依賴於輔助病毒。例如，該病毒可需一或多種輔助病毒以供應將該等載體擴增及包裝成病毒顆粒所需之病毒組分(諸如，例如，病毒蛋白)。在此情況下，可沿本文描述之載體系統將一或多種輔助組分(包括一或多種編碼病毒組分之載體)引入細胞或細胞群體內。在其他實施例中，該病毒可不含輔助病毒。例如，該病毒可在無輔助病毒之情況下擴增並包裝該等載體。在一些實施例中，本文描述之載體系統亦可編碼病毒擴增及包裝所需之病毒組分。

**【0193】** 非限制性例示性病毒載體包括腺相關病毒(AAV)載體、慢病毒載體、腺病毒載體、輔助病毒依賴性腺病毒載體(HDA<sub>d</sub>)、單純疱疹病毒(HSV-1)載體、噬菌體T4、桿狀病毒載體及反轉錄病毒載體。在一些實施例中，該病毒載體可為AAV載體。在其他實施例中，該病毒載體可為慢病毒載體。

**【0194】** 在一些實施例中，「AAV」係指所有血清型、亞型及天然存在之AAV及重組AAV。「AAV」可用以係指病毒本身或其衍生物。術語「AAV」包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAVrh.64R1、AAVhu.37、AAVrh.8、AAVrh.32.33、AAV8、AAV9、AAV-DJ、AAV2/8、AAVrh10、AAVVK03、AV10、AAV11、AAV12、rh10、及其雜種、禽AAV、牛

AAV、犬AAV、馬AAV、靈長類動物AAV、非靈長類動物AAV及綿羊AAV。AAV之各種血清型之基因體序列，及天然末端重複序列(TR)、Rep蛋白及殼體次單元之序列為此項技術中已知。此等序列可於參考文獻中或公共資料庫(諸如基因庫)中發現。如本文使用之「AAV載體」係指包含非AAV來源之異源性序列之AAV載體(即，與AAV異源之核酸序列)，通常包含編碼受關注之異源性多肽之序列。構築體可包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAVrh.64R1、AAVhu.37、AAVrh.8、AAVrh.32.33、AAV8、AAV9、AAV-DJ、AAV2/8、AAVrh10、AAVVK03、AV10、AAV11、AAV12、rh10、及其雜種、禽AAV、牛AAV、犬AAV、馬AAV、靈長類動物AAV、非靈長類動物AAV及綿羊AAV殼體序列。一般而言，該異源性核酸序列(轉基因)側接至少一個，且通常兩個，AAV反向末端重複序列(ITR)。AAV載體可為單股(ssAAV)或自互補(scAAV)。

**【0195】** 在一些實施例中，慢病毒可為整合。在一些實施例中，該慢病毒可為非整合。在一些實施例中，病毒載體可為腺病毒載體。在一些實施例中，腺病毒可為高選殖能力或「無腸」腺病毒，其中自該病毒刪除5'及3'反向末端重複序列(ITR)及包裝信號('I')外之所有編碼病毒區域以增加其包裝能力。在又其他實施例中，病毒載體可為HSV-1載體。在一些實施例中，基於HSV-1之載體依賴於輔助病毒，及在其他實施例中，其獨立於輔助病毒。例如，保留僅包裝序列之擴增子載體需具有用於包裝之結構組分之輔助病毒，而移除非必需病毒功能之30kb刪除之HSV-1載體無需輔助病毒。在另外實施例中，該病毒載體可為噬菌體T4。在一些實施例中，當病毒之頭部清除時，該噬菌體T4可包裝任何線性或環狀DNA或

RNA分子。在其他實施例中，該病毒載體可為桿狀病毒載體。在又其他實施例中，該病毒載體可為反轉錄病毒載體。在使用具有較小選殖能力之AAV或其他載體之實施例中，可有必要使用超過一種載體以遞送如本文揭示之載體系統之所有組分。例如，一種AAV載體可含有編碼RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白(例如，Cas9)之序列，而第二AAV載體可含有一或多種引導序列。

**【0196】** 在一些實施例中，載體系統可驅動一或多種核酸酶組分於細胞中之表現。在一些實施例中，該載體不包含一經將其整合於細胞中即驅動一或多種編碼序列之表現之啟動子(例如，如本文例示，使用該細胞之內源性啟動子，諸如當於該細胞之特定基因體基因座處插入時)。適用於在不同類型之細胞(例如，CD4+ T細胞)中驅動表現之啟動子為此項技術中已知。在一些實施例中，該啟動子可為野生型。在其他實施例中，該啟動子可針對更高效或有效表現進行修飾。在又其他實施例中，該啟動子可經截短但仍保留其功能。例如，該啟動子可具有適用於將該載體適當包裝於病毒內之正常尺寸或減小之尺寸。

**【0197】** 在一些實施例中，載體可包含編碼RNA引導之DNA結合劑，諸如本文描述之Cas蛋白(例如，Cas9)之核苷酸序列。在一些實施例中，由該載體編碼之核酸酶可為Cas蛋白。在一些實施例中，載體系統可包含一個拷貝之編碼該核酸酶之核苷酸序列。在其他實施例中，該載體系統可包含超過一個拷貝之編碼該核酸酶之核苷酸序列。在一些實施例中，編碼該核酸酶之核苷酸序列可操作地連接至至少一種轉錄或轉譯控制序列。在一些實施例中，編碼該核酸酶之核苷酸序列可操作地連接至至少一個啟動子。

【0198】 在一些實施例中，如本文描述，載體可包含含有編碼調節T細胞促進分子(例如，IL10、CTLA4)；或靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)之序列之構築體中之任一者或多者。在一些實施例中，該調節T細胞促進分子(例如，IL10、CTLA4)；或靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)之序列可操作地連接至至少一種轉錄或轉譯控制序列。在一些實施例中，該調節T細胞促進分子(例如，IL10、CTLA4)；或靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)之序列可操作地連接至至少一個啟動子。在一些實施例中，該調節T細胞促進分子(例如，IL10、CTLA4)；或靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)之序列不連接至驅動異源性基因之表現之啟動子。

【0199】 在一些實施例中，啟動子可為組成型、誘導型或組織特異性的。在一些實施例中，該啟動子可為組成型啟動子。非限制性例示性組成型啟動子包括巨細胞病毒立即早期啟動子(CMV)、猴病毒(SV40)啟動子、腺病毒主要晚期(MLP)啟動子、勞斯肉瘤病毒(RSV)啟動子、小鼠乳腺腫瘤病毒(MMTV)啟動子、磷酸甘油酸激酶(PGK)啟動子、延長因子- $\alpha$  (EF1a)啟動子、泛素啟動子、肌動蛋白啟動子、微管蛋白啟動子、免疫球蛋白啟動子、其功能片段，或前述中任一者之組合。在一些實施例中，該啟動子可為CMV啟動子。在一些實施例中，該啟動子可為截短之CMV啟動子。在其他實施例中，該啟動子可為EF1a啟動子。在一些實施例中，該啟動子可為誘導型啟動子。非限制性例示性誘導型啟動子包括彼等可由熱休克、光、化學品、肽、金屬、類固醇、抗生素或醇誘導者。在一些實施例中，該誘導型啟動子可為具有低基礎(非誘導)表現量者，諸如，例如，Tet-On<sup>®</sup>啟動子(Clontech)。

【0200】 在一些實施例中，啟動子可為組織特異性啟動子，例如，對T細胞中之表現具特異性之啟動子。

【0201】 在一些實施例中，組合物包含載體系統。在一些實施例中，該載體系統可包含一個單一載體。在其他實施例中，該載體系統可包含兩個載體。在另外實施例中，該載體系統可包含三個載體。當使用不同之引導RNA進行多路複用時，或當使用多個拷貝之引導RNA時，該載體系統可包含超過三個載體。

【0202】 在一些實施例中，載體系統可包含誘導型啟動子以僅在將其遞送至靶細胞後開始表現。非限制性例示性誘導型啟動子包括彼等可由熱休克、光、化學品、肽、金屬、類固醇、抗生素或醇誘導者。在一些實施例中，該誘導型啟動子可為具有低基礎(非誘導)表現量者，諸如，例如，Tet-On<sup>®</sup>啟動子(Clontech)。

【0203】 在另外實施例中，載體系統可包含組織特異性啟動子。

【0204】 下文提供非限制性例示性病毒載體序列：

CTLA4慢病毒插入物(核苷酸序列)

```
ATGGCCTGCTTGGGCTTCCAAAGGCATAAAGCCCAGCTTAAT
CTTGCTACTCGCACGTGGCCCTGCACATTGCTCTTTTTTCCTCCTGTT
CATTCCCGTGTTTTTGCAAGGCGATGCATGTGGCACAACCTGCCGTC
GTTCTGGCATCATCAAGAGGTATTGCTAGCTTCGTTTGTGAGTACG
CCTCCCCTGGAAAAGCGACGGAGGTGCGCGTCACTGTATTGCGGC
AAGCCGACAGCCAAGTTACTGAAGTCTGCGCGGCAACGTATATGA
TGGGCAATGAGCTGACATTCCTTGACGATTCAATCTGCACGGGAA
CAAGTAGTGGTAACCAGGTGAATCTCACTATTCAAGGTCTGAGAG
```

CCATGGACACCGGCCTCTACATTTGTAAGGTGGAGCTGATGTATC  
 CTCCCCATATTATCTGGGGATCGGAAATGGGACACAGATATATG  
 TTATTGATCCCGAGCCATGTCCCGATAGTGACTTCCTCTTGTGGAT  
 ACTTGCCGCTGTGAGCAGTGGTTTGTTTTTTTTATTCATTCCTCCTTA  
 CGGCAGTATCACTTTCAAAAATGCTCAAGAAGCGAAGTCCTTTGA  
 CAACTGGCGTATATGTCAAAAATGCCACCAACAGAGCCCGAATGTG  
 AGAAACAGTTCCAGCCGTACTTTATTCCTATAAACTGA (SEQ ID  
 NO: 137)

## 【0205】

CTLA4慢病毒插入物(胺基酸序列)

MACLGFQRHKAQLNLATRTPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQP  
 AVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATY  
 MMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYP  
 PPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVS  
 LSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN\* (SEQ ID NO:  
 130)

## 【0206】

IL10慢病毒插入物(核苷酸序列)

ATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCCTCCTGACTG  
 GGGTGAGGGCCAGCCCAGGCCAGGGCACCCAGTCTGAGAACAGC  
 TGCACCCACTTCCCAGGCAACCTGCCTAACATGCTTCGAGATCTCC  
 GAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATC  
 AGCTGGACAACCTTGTTGTTAAAGGAGTCCTTGCTGGAGGACTTTA

AGGGTTACCTGGGTTGCCAAGCCTTGTCTGAGATGATCCAGTTTTA  
 CCTGGAGGAGGTGATGCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCAGACA  
 TCAAGGCGCATGTGAACTCCCTGGGGGAGAACCTGAAGACCCTCA  
 GGCTGAGGCTACGGCGCTGTCATCGATTTCTTCCCTGTGAAAACA  
 AGAGCAAGGCCGTGGAGCAGGTGAAGAATGCCTTTAATAAGCTCC  
 AAGAGAAAGGCATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCA  
 TCAACTACATAGAAGCCTACATGACAATGAAGATACGAAACTGA  
 (SEQ ID NO: 138)

## 【0207】

IL10慢病毒插入物(胺基酸序列)

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRD  
 LRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFY  
 LEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRCHRFLPCENKSK  
 AVEQVKNAFNKLQEKGIIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN\* (SEQ  
 ID NO: 124)

## 【0208】

FOXP3慢病毒插入物(核苷酸序列)

ATGCCCAACCCAGGCCTGGCAAGCCCTCGGCCCTTCCTTG  
 GCCCTTGGCCCATCCCCAGGAGCCTCGCCCAGCTGGAGGGGCTGCA  
 CCCAAAGCCTCAGACCTGCTGGGGGCCCCGGGGCCCAGGGGGAAC  
 CTTCAGGGCCGAGATCTTCGAGGCGGGGCCCATGCCTCCTCTTCT  
 TCCTTGAACCCCATGCCACCATCGCAGCTGCAGCTGCCACACTG  
 CCCCTAGTCATGGTGGCACCCCTCCGGGGGCACGGCTGGGGCCCCTTG

CCCCACTTACAGGCACTCCTCCAGGACAGGCCACATTTTCATGCAC  
CAGCTCTCAACGGTGGATGCCACGCCCCGGACCCCTGTGCTGCAG  
GTGCACCCCCTGGAGAGCCCAGCCATGATCAGCCTCACACCACCC  
ACCACCGCCACTGGGGTCTTCTCCCTCAAGGCCCGGCCTGGCCTCC  
CACCTGGGATCAACGTGGCCAGCCTGGAATGGGTGTCCAGGGAGC  
CGGCACTGCTCTGCACCTTCCCAAATCCCAGTGCACCCAGGAAGG  
ACAGCACCCCTTTCGGCTGTGCCCCAGAGCTCCTACCCACTGCTGGC  
AAATGGTGTCTGCAAGTGGCCCCGGATGTGAGAAGGTCTTCGAAGA  
GCCAGAGGACTTCCTCAAGCACTGCCAGGCGGACCATCTTCTGGA  
TGAGAAGGGCAGGGCACAATGTCTCCTCCAGAGAGAGATGGTAC  
AGTCTCTGGAGCAGCAGCTGGTGCTGGAGAAGGAGAAGCTGAGT  
GCCATGCAGGCCACCTGGCTGGGAAAATGGCACTGACCAAGGCT  
TCATCTGTGGCATCATCCGACAAGGGCTCCTGCTGCATCGTAGCTG  
CTGGCAGCCAAGGCCCTGTCGTCCCAGCCTGGTCTGGCCCCCGGG  
AGGCCCTGACAGCCTGTTTGCTGTCCGGAGGCACCTGTGGGGTA  
GCCATGGAAACAGCACATTCCCAGAGTTCCTCCACAACATGGACT  
ACTTCAAGTTCCACAACATGCGACCCCCTTTTCACCTACGCCACGCT  
CATCCGCTGGGCCATCCTGGAGGCTCCAGAGAAGCAGCGGACACT  
CAATGAGATCTACCACTGGTTCACACGCATGTTTGCCTTCTTCAGA  
AACCATCCTGCCACCTGGAAGAACGCCATCCGCCACAACCTGAGT  
CTGCACAAGTGCTTTGTGCGGGTGGAGAGCGAGAAGGGGGCTGTG  
TGGACCGTGGATGAGCTGGAGTTCGCAAGAAACGGAGCCAGAG  
GCCAGCAGGTGTTCCAACCCTACACCTGGCCCCTGATAA (SEQ

ID NO: 139)

**【0209】**

FOXP3慢病毒插入物(胺基酸序列)

MPNPRPGKPSAPSLALGSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGT  
 FQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPH  
 LQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTAT  
 GVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAV  
 PQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEDFLKHCQADHLLDEKGRAQC  
 LLQREMVQSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDK  
 GSCCIVAAGSQGPVVPAAWSGPREAPDSLFAVRRHLWGSNGNSTFPEF  
 LHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMF  
 AFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGA VWTVDELEFRKKR  
 SQRPSRCSNPTPGP\*\* (SEQ ID NO: 140)

**【0210】**

空慢病毒載體

ACGCGTGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATG  
 GTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCA  
 CCGTGCATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTT  
 ATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCA  
 CTGAATTGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCG  
 ATACATAAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGA  
 GCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAG  
 CTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGAC

TCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAA  
ATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGG  
AAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCG  
CGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGGCGACTGGTGAGTACGCCAAA  
AATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGA  
GCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAA  
ATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAACA  
TATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCC  
TGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACA  
GCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGA ACTTAGATCATT  
ATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGA  
GATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGC  
AAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCACTGATCTTC  
AGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATT  
ATATAAATATAAAGTAGTAAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACC  
CACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAG  
TGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAA  
GCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGAC  
AATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGG  
CTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCA  
TCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAA  
AGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAA ACTCA  
TTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAATC

TCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAG  
AGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGA  
ATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAAT  
TAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATT  
GGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGG  
TAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGT  
TAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACC  
CCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGG  
AGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCTCG  
ACGGTATCGATGGCCGCCCCCTTCACCGAGGGCCTATTTCCCATG  
ATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATA  
ATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAAT  
ACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAA  
AATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAA  
GTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAAC  
ACCGGAGTCTTCTTTTTTGAAGACACTTCGGACTGTAGA ACTCTGA  
ACCTCGAGCAATTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGT  
GCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAAC  
TAAAGAATTACAAAACAAATTACAAAATTCAAATTTCTGCGT  
TGTTGTCGGTGCTCGTTCTCTGCTCTTCACGCTACTGAATTCATCA  
CCGGTTCTTCGAAGGCCTCCGCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGG  
GCGCCCCCTCCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGC  
GCAGCGAGCGTCCTGATCCTTCCGCCCCGGACGCTCAGGACAGCGG

CCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAGAACCCCAGTATCAGCAGA  
AGGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTCTAGGGCACTGGTTT  
TCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCTCG  
GCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTGAACGCCGATGAT  
TATATAAGGACGCGCCGGGTGTGGCACAGCTAGTTCCGTGCGCAGC  
CGGGATTTGGGTGCGGGTTCCTTGTGGTGGATCGCTGTGATCGTCA  
CTTGGTCTAGACGCCACCATGAGCGGGGGCGAGGAGCTGTTCGCC  
GGCATCGTGCCCGTGCTGATCGAGCTGGACGGCGACGTGCACGGC  
CACAAGTTCAGCGTGCGCGGGCGAGGGCGAGGGCGACGCCGACTA  
CGGCAAGCTGGAGATCAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCC  
CGTGCCCTGGCCCACCCTGGTGACCACCCTCTGCTACGGCATCCA  
GTGCTTCGCCCCTACCCCGAGCACATGAAGATGAACGACTTCTT  
CAAGAGCGCCATGCCCAGGGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCCA  
GTTCCAGGACGACGGCAAGTACAAGACCCGCGGGCGAGGTGAAGT  
TCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCAAG  
GACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCCACAAGCTGGAGTAC  
AGCTTCAACAGCCACAACGTGTACATCCGCCCCGACAAGGCCAAC  
AACGGCCTGGAGGCTAACTTCAAGACCCGCCACAACATCGAGGGC  
GGCGGGCGTGCAGCTGGCCGACCCTACCAGACCAACGTGCCCTG  
GGCGACGGCCCCGTGCTGATCCCCATCAACCACTACCTGAGCACT  
CAGACCAAGATCAGCAAGGACCGCAACGAGGCCCGCGACCACAT  
GGTGCTCCTGGAGTCCTTCAGCGCCTGCTGCCACACCCACGGCAT  
GGACGAGCTGTACAGGGGATCCGAGGGCAGAGGAAGCCTTCTAA

CATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTTCCGGGATGACCG  
AGTACAAGCCCACGGTGCGCCTCGCCACCCGCGACGACGTCCCCA  
GGGCCGTACGCACCCTCGCCGCCGCGTTCGCCGACTACCCCGCCA  
CGCGCCACACCGTCGATCCGGACCGCCACATCGAGCGGGTCACCG  
AGCTGCAAGAACTCTTCCTCACGCGCGTTCGGGCTCGACATCGGCA  
AGGTGTGGGTCGCGGACGACGGCGCCGCGGTGGCGGTCTGGACCA  
CGCCGGAGAGCGTTCGAAGCGGGGGCGGTGTTTCGCCGAGATCGGC  
CCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCAA  
CAGATGGAAGGCCTCCTGGCGCCGCACCCGGCCCAAGGAGCCCGCG  
TGGTTCCTGGCCACCGTCGGCGTCTCGCCCGACCACCAGGGCAAG  
GGTCTGGGCAGCGCCGTCGTGCTCCCCGGAGTGGAGGGCGGCCGAG  
CGCGCCGGGGTGCCCGCCTTCCTGGAGACCTCCGCGCCCCGCAAC  
CTCCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTCACCGTCACCGCCGACGTCG  
AGGTGCCCGAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGACCCGCAAGCCCG  
GTGCCTGAATCTAGGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTT  
GTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA ACTATGTTGCTCCTTTTACGCT  
ATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCC  
CGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTC  
TCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGT  
GTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCC  
ACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTA  
TTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGA  
CAGGGGCTCGGCTGTTGGGC ACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGG

GGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTG  
GATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAAT  
CCAGCGGACCTTCCTTCCC GCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTC  
TTCCGCGTCTCCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCTCTTTG  
GGCCGCCTCCCCGCCTGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGG  
CAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGG  
AAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGATAAGATCTGCTTTTTTGCTTG  
TACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCT  
GGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCT  
TGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTA  
ACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTA  
GCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTATTATTCAGTATTTATAACTTGC  
AAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGAACTTGTTTATTGCAGC  
TTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAA  
TAAAGCATTTTTTTTCCTGCACTTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTC  
ATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCCTAAC  
TCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCG  
CCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTATGCAGAGGCCGAGGCCG  
CCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGG  
AGGCCTAGACTTTTGCAGAGACCAAATTCGTAATCATGTCATAGC  
TGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACAT  
ACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT  
GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAG

TCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGC  
GCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCG  
CTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGGCGAGCGGTA  
TCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGG  
GATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGC  
CAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCT  
CCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAG  
GTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCC  
TGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACC  
GGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTC  
ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTC  
CAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTG  
CGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACA  
CGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAG  
AGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCC  
TAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCT  
GCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATC  
CGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGGCAA  
GCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT  
GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACG  
TTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTA  
GATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA  
TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAG

GCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCT  
GACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT  
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGG  
CTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGC  
GCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAA  
TTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTT  
GCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACAGCTC  
GTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGG  
CGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCC  
TTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTAT  
CACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCC  
ATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCA  
TTCTGAGAATAGTGTATGCGGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCCGGCG  
TCAATACGGGATAAATACCGCGCCACATAGCAGA ACTTTAAAAGTG  
CTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAA ACTCTCAAGGATC  
TTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCA  
ACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGC  
AAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGA  
CACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTTCAATATTATTG  
AAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA  
TGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCC  
CGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACA  
TTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCG

CGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCCG  
GAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAA  
GCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGG  
CTTA ACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTA CTGAGAGTGCACCAT  
ATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCG  
CATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGG  
GCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGG  
GGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTTC  
CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTG (SEQ  
ID NO: 141)

【0211】

空慢病毒載體

GCGATCGCAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCC  
ATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCC  
TGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGAC  
GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA  
ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA  
AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGG  
TAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGA  
CTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACC  
ATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGG  
TTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATG  
GGAGTTTGT TTTGGCACCAAAAATCAACGGGACTTTCCA AAAATGTC

GTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGGCGGTAGGCGTGTAC  
GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGGGTC  
TCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTA  
GGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTT  
CAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGAT  
CCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCG  
CCCGAACAGGGACCTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGCTCTCTC  
GACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGGCGAG  
GGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAATTTTGACTAGCGGAGGC  
TAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGG  
GAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGG  
GAAAGAAAAAATATAAATTA AAAACATATAGTATGGGCAAGCAGG  
GAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCA  
GAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAG  
ACAGGATCAGAAGA ACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACC  
CTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAA  
GCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAAACAAAAGTAAGACCAC  
CGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATA  
TGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAA  
AAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGA  
GTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTT  
CCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCCTC  
AATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGT

GCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCA  
TCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAG  
AATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGG  
GATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTCATTTGCACCACTGCTGTGCCT  
TGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAAT  
CACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACAC  
AAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAAACCAGCAAGA  
AAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTT  
GTGGAATTGGTTTAAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATT  
ATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTT  
GCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCA  
TTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGG  
CCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAG  
ATCCATTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTAACTTTT  
AAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAAT  
AGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAA  
AACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTGGCTCCCGATCGTTGCGTT  
ACACACACAATTACTGCTGATCGAGTGTAGCCTTCGAATGAAAGA  
CCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGATAGCTGCAGTAACGCCATTTTG  
CAAGGCATGGAAAAATACCAAACCAAGAATAGAGAAGTTCAGAT  
CAAGGGCGGGTACATGAAAATAGCTAACGTTGGGCCAAACAGGA  
TATCTGCGGTGAGCAGTTTCGGCCCCGGCCCCGGGGCCAAGAACAG  
ATGGTCACCGCAGTTTCGGCCCCGGCCCCGAGGCCAAGAACAGATG

GTCCCCAGATATGGCCCAACCCTCAGCAGTTTCTTAAGACCCATC  
AGATGTTTCCAGGCTCCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGCGCCT  
TATTTGAATTAACCAATCAGCCTGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGC  
TTCTGCTTCCCGAGCTCTATAAAAGAGCTCACAACCCCTCACTCGG  
CGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCTGATCATTGTCGATC  
CTACCATCCACTCGACACACCCGCCAGGGCCCTGCCAAGCTTCCG  
AGCTCTCGATATCAAAGGAGGTACCCAACATGGTCAGCAAGGGCG  
AGGAACTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACG  
GCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAG  
GGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGTACC  
ACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTG  
ACCTACGGCGTGCAATGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG  
CAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAG  
GAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGC  
GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAG  
CTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC  
AAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCC  
GACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCA  
CAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAACTCGCCGACCACTACCAGCA  
GAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCA  
CTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAA  
GCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGAT  
CACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGAAGTTGTCTCCTCC

TGCACTGACTGACTGATACAATCGATTTCTGGATCCGCAGGCCTCT  
GCTAGAAGTTGTCTCCTCCTGCACTGACTGACTGATACAATCGATT  
TCTGGATCCGCAGGCCTCTGCTAGCTTGACTGACTGAGTCGACAA  
TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTT  
AACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGC  
CTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCC  
TTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCG  
TTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAA  
CCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGG  
GACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCC  
GCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACT  
GACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGG  
CTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCT  
GCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGG  
CCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCT  
CAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAATTC  
GAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGA  
TCTTAGCCACTTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAAT  
TCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTTGCTTGTACTGGGTCT  
CTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTA  
GGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTT  
CAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGAT  
CCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTCCTGG

CCAACGTGAGCACCGTGCTGACCTCCAAATATCGTTAAGCTGGAG  
CCTGGGAGCCGGCCTGGCCCTCCGCCCCCCCCACCCCCGCAGCCC  
ACCCCTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGAGTGGCCGACAGTGCC  
CGTGGAGTTCTCGTGACCTGAGGTGCAGGGCCGGCGCTAGGGACA  
CGTCCGTGCACGTGCCGAGGCCCCCTGTGCAGCTGCAAGGGACAG  
GCCTAGCCCTGCAGGCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCG  
CCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCTCATGGCTGACTAATTTTTTTTAT  
TTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAA  
GTAGTGAGGACGCTTTTTTTGGAGGCCGAGGCTTTTGC AAAGATCG  
ACAAGAGACAGGACCTGCAGGTTAATTAATTTAAATCATGTGA  
GCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT  
GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAA  
AAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTAT  
AAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCC  
TGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCT  
TCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCA  
GTTCCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC  
CCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCT  
TGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC  
CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTAC  
AGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAAC  
AGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAA  
AGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGC

GGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAA  
GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTC  
AGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTAT  
CAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAAATGAAGTT  
TTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTT  
ACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATT  
TCGTTTCATCCATAGTTGCATTTAAATGGCCGGCCTGGCGCGCCGTT  
TAAACCTAGATATTGATAGTCTGATCGGTCAACGTATAATCGAGT  
CCTAGCTTTTGCAAACATCTATCAAGAGACAGGATCAGCAGGAGG  
CTTTCGCATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTT  
TTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGT  
GAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCGCGAGTGGGTTA  
CATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCG  
CCCCGAAGAACGCTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA  
TGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTC  
GGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTATTCAC  
CAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAT  
TATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACT  
TACTTCTGACAACGATTGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTT  
TGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAAC  
CGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACG  
ATGCCTGTAGCAATGGCAACAACCTTGCGTAAACTATTA ACTGGC  
GAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAGTTGATAGACTGGATG

GAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCG  
GCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGG  
TCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC  
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGAT  
GAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAG  
CATTGGTAACCGATTCTAGGTGCATTGGCGCAGAAAAAATGCCT  
GATGCGACGCTGCGCGTCTTATACTCCCACATATGCCAGATTCAG  
CAACGGATACGGCTTCCCCAACTTGCCCCACTTCCATACGTGTCCTC  
CTTACCAGAAATTTATCCTTAAGATCCCGAATCGTTTAAAC (SEQ  
ID NO: 142)

**【0212】** 包含引導RNA、RNA結合之DNA結合劑或包含編碼調節T細胞促進分子(例如，IL10、CTLA4)；或靶向受體(例如，CAR)之序列之供體構築體個別或以任何組合之載體可由脂質體、奈米顆粒、胞外體或微囊泡遞送。該載體亦可由脂質奈米顆粒(LNP)遞送。一或多種引導RNA、RNA結合之DNA結合劑(例如，mRNA)或包含編碼異源性蛋白之序列之供體構築體(個別或以任何組合)可由LNP、脂質體、奈米顆粒、胞外體或微囊泡遞送。一或多種引導RNA、RNA結合之DNA結合劑(例如，mRNA)或包含編碼異源性蛋白之序列之供體構築體(個別或以任何組合)可由LNP遞送。在一些實施例中，一或多種引導RNA及RNA引導之DNA結合劑(例如，mRNA)係由LNP遞送。供體構築體可由病毒載體遞送。

**【0213】** 脂質奈米顆粒(LNP)係眾所周知用於遞送核苷酸及蛋白貨物之方式，且可用於遞送引導RNA、RNA引導之DNA結合劑或本文揭示之供體構築體中之任一者。

**【0214】** 如本文使用，脂質奈米顆粒(LNP)係指包含複數個(即，超過一個)由分子間力彼此物理結合之脂質分子的顆粒。該等LNP可為(例如)微球(包括單層及多層囊泡，例如，「脂質體」-層狀相脂質雙層，在一些實施例中，其等係大體上球形，且在更特定之實施例中，可包含水核，例如，包含大部分之RNA分子)、乳液中之分散相、膠束或懸浮液中之內相(參見，例如，WO2017173054，該案之內容係以全文引用之方式併入本文中)。可利用熟習此項技術者已知可將核苷酸遞送至個體之任何LNP。

**【0215】** 在一些實施例中，本文提供一種用於將如本文描述之引導RNA或本文揭示之供體構築體中之任一者(單獨或以組合)遞送至細胞或細胞群體或個體之方法，其中該等組分中之任一者或多者係與LNP締合。在一些實施例中，該方法進一步包括RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas9或編碼Cas9之序列)。

**【0216】** 在一些實施例中，本文提供一種包含如本文描述之引導RNA或本文揭示之供體構築體中之任一者(單獨或以組合)及LNP之組合物。在一些實施例中，該組合物進一步包含RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas9或編碼Cas9之序列)。

**【0217】** 在一些實施例中，LNP包含陽離子脂質。在一些實施例中，該等LNP包含十八-9,12-二烯酸(9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-(((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯，亦稱為(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯酸3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-(((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯)或另一可電離脂質。參見例如WO2019/067992、WO2017/173054、WO2015/095340及WO2014/136086，及其中提供之參考文獻之脂質。在一些實施例中，該等LNP包

含約4.5、5.0、5.5、6.0或6.5之陽離子脂質胺對RNA磷酸酯之莫耳比(N:P)。在一些實施例中，術語陽離子性及可電離於LNP脂質之內文中可互換，例如，其中可電離脂質係取決於pH之陽離子性。

**【0218】** 在一些實施例中，與本文揭示之構築體締合之LNP用於製備用以抑制免疫反應之基於細胞之藥劑。用於製備基於細胞之治療劑之方法及用於基於細胞之治療劑中之試劑為此項技術中已知。

**【0219】** 在一些實施例中，本文描述之引導RNA、RNA引導之DNA結合劑或本文揭示之供體構築體中之任一者，單獨或組合，無論裸的或作為載體之部分，係調配於脂質奈米顆粒中或經由脂質奈米顆粒投與；參見例如WO2019/067992或WO2017/173054，其等內容係以全文引用之方式併入本文中。

**【0220】** 在一些實施例中，包含含有以下之LNP組合物：RNA組分及脂質組分，其中該脂質組分包含胺脂質，諸如可生物降解、可電離脂質。在某些情況下，該脂質組分包含可生物降解、可電離脂質、膽固醇、DSPC及PEG-DMG。在某些實施例中，該脂質核酸組裝含有可電離脂質A(十八-9,12-二烯酸((9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-(((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯，亦稱為(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯酸3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-(((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯)、膽固醇、DSPC及PEG2k-DMG。在某些實施例中，該等組分分別以50:38:9:3莫耳比存在。該等脂質核酸組裝可以約6之脂質胺對RNA磷酸酯(N:P)莫耳比，及以重量計2:1、1:1或1:2之gRNA對mRNA之比率調配。

**【0221】** 應知曉，引導RNA、RNA引導之DNA結合劑(例如Cas核

酸酶或編碼Cas核酸酶之核酸)，及包含編碼調節T細胞促進分子(例如IL10)或靶向受體(例如CAR)之序列之供體構築體可使用相同或不同之系統遞送。例如，該引導RNA、Cas核酸酶及構築體可由相同之載體(例如AAV)運送。或者，該Cas核酸酶(呈蛋白質或mRNA)或gRNA可由質體或LNP運送，而該供體構築體可由載體(諸如AAV)運送。

【0222】不同之遞送系統可同時或以任何循序順序遞送。在一些實施例中，該供體構築體、引導RNA及Cas核酸酶可同時，例如，以一個載體、兩個載體、個別載體、一個LNP、兩個LNP、個別LNP，或其組合遞送。在一些實施例中，在引導RNA或Cas核酸酶單獨或一起呈載體或與LNP締合或呈核糖核蛋白(RNP)遞送之前(例如約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多天)，該供體構築體可呈載體或與LNP締合遞送。作為另一實例，在該構築體呈載體或與LNP締合遞送之前(例如約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多天)，該引導RNA及Cas核酸酶可單獨或一起呈載體或與LNP締合或呈核糖核蛋白(RNP)遞送。

【0223】

#### IV. 工程化T細胞之方法

本發明提供工程化T細胞以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼調節T細胞促進分子之異源性序列插入細胞內之方法。本發明提供工程化T細胞以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼IL10之異源性序列插入細胞內之方法。本發

明提供工程化T細胞以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼CTLA4之異源性序列插入細胞內之方法。本發明提供工程化T細胞以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將各在啟動子序列之控制下編碼IL10及CTLA4之異源性序列插入細胞內之方法。

**【0224】** 在一些實施例中，該等方法包括工程化T細胞以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、將編碼調節T細胞促進分子(例如，IL10或CTLA4)之異源性序列插入細胞內，且進一步包括TCR序列之修飾(例如，減弱)。

**【0225】** 在一些實施例中，該等方法包括工程化T細胞以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、將編碼調節T細胞促進分子(例如，IL10或CTLA4)之異源性序列插入細胞內，且進一步包括將編碼靶向受體(例如，CAR)之異源性序列插入細胞內。

**【0226】** 在一些實施例中，該等方法包括工程化T細胞以包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、將編碼調節T細胞促進分子(例如，IL10或CTLA4)之異源性序列插入細胞內、TCR序列之修飾(例如，減弱)，及將編碼靶向受體(例如，CAR)之異源性序列插入細胞內。

**【0227】** 在一些實施例中，編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、將編碼調

節T細胞促進分子之異源性序列插入細胞內、TCR基因之任選減弱及將靶向受體(例如，CAR)任選插入細胞內係使用本文揭示之CRISPR/Cas系統及引導RNA工程化。

**【0228】** 在此等實施例中，待插入之調節T細胞促進分子可經由供體構築體提供。經由供體構築體提供之調節T細胞促進分子可選自IL10、CTLA4、TGFB1、IDO1、ENTPD1、NT5E、IL22、AREG、IL35、GARP、CD274、FOXP3、IKZF2、EOS、IRF4、LEF1及BACH2，及TCR基因序列之修飾(例如，減弱)。

**【0229】** 在此等實施例中，待插入之靶向受體可經由供體構築體提供。在一些實施例中，該靶向受體可為嵌合抗原受體(CAR)、T細胞受體(TCR)，或通過內部傳訊域中之至少一個跨膜域可操作地連接之細胞表面分子之受體，內部傳訊域在一經結合細胞外受體部分即可活化T細胞。在一些實施例中，該靶向受體可為存在於細胞(例如，T細胞)之表面上以允許該細胞結合至靶位點(例如，有機體中之特定細胞或組織)之受體。在此等實施例中，該靶向受體係可靶向MAdCAM-1之CAR。

**【0230】** 適用於工程化T細胞以包含插入及修飾(例如，減弱)之基因編輯系統係經本文揭示且為此項技術中已知。在一些實施例中，該等基因編輯系統包括(但不限於) CRISPR/Cas系統；鋅指核酸酶(ZFN)系統；轉錄活化因子樣效應物核酸酶(TALEN)系統。一般而言，該等基因編輯系統涉及使用工程化之裂解系統以於靶DNA序列中誘導雙股斷裂(DSB)或切口(nick)(例如，單股斷裂或SSB)。裂解或切割(nicking)可通過使用特定之核酸酶(諸如工程化之ZFN、TALEN)或使用具有工程化之引導RNA以引導靶DNA序列之特定裂解或切割之CRISPR/Cas系統(諸如

CRISPR/Cas9系統)發生。此外，靶向核酸酶係基於Argonaute系統(例如，來自極端嗜熱菌(*T. thermophilus*))，稱為「TtAgo」，參見Swarts等人，(2014) *Nature* 507(7491): 258-261)開發，其亦可具有用於基因體編輯及基因療法中之潛力。

**【0231】** 轉錄活化因子樣效應物核酸酶(TALEN)係限制酶，其等可經工程化以切割DNA之特定序列。其等藉由將TAL效應物DNA結合域融合至DNA裂解域(切割DNA股之核酸酶)製造。轉錄活化因子樣效應物(TALE)可經工程化以結合至所需DNA序列，以於特定位置處促進DNA裂解(參見，例如，Boch, TALEs of genome targeting *Nature Biotech.* 29:135-136 (2011))。可將該等限制酶引入細胞內，用於基因編輯或用於原位基因體編輯中，一種稱為使用工程化之核酸酶基因體編輯之技術。此等方法及其中使用之組合物為此項技術中已知。參見，例如，WO2019147805、WO2014040370、WO2018073393，其等內容係以全文引用之方式併入本文中。

**【0232】** 鋅指核酸酶(ZFN)係藉由將鋅指DNA結合域融合至DNA-裂解域而產生之人工限制酶。鋅指域可經工程化以靶向特定所需DNA序列使得鋅指核酸酶可靶向複合物基因體內之獨特序列。來自II型限制核酸內切酶FokI之非特異性裂解域通常用作ZFN中之裂解域。裂解由內源性DNA修復體系修復，容許ZFN精確改變更高級有機體之基因體。此等方法及其中使用之組合物為此項技術中已知。參見，例如，WO2011091324，該案內容係以全文引用之方式併入本文中。

**【0233】** RNA干擾(RNAi)係一種生物過程，其中RNA分子藉由中和靶向mRNA分子抑制基因表現或轉譯。小干擾RNA (siRNA)係RNA干

擾之核心。RNA係基因之直接產物，且此等小RNA（通常各股為19至23個核苷酸長度，形成19至21個核苷酸之雙螺旋）可引導該RNA誘導之沉默（RISC）複合物以降解信使RNA（mRNA）分子且因此藉由防止轉譯，經由轉錄後基因沉默降低其等活性。短髮夾RNA（shRNA）係為單一RNA股之siRNA，其中形成雙螺旋區之股具有髮夾結構，通常藉由自表現載體轉錄產生。RNAi亦可由稱為Dicer受質分子之較長RNA雙螺旋結構進行，Dicer受質分子由酶Dicer裂解，然後裝載於RISC內以促進靶mRNA裂解。此等方法及使用之組合物為此項技術中已知。在本文提供之組合物及方法中，較佳地，促進RNA干擾之RNA分子作為持久性表現載體提供，參見，例如，WO2018208837，該案之內容係以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，RNAi係與表現載體一起使用。

**【0234】** 應知曉本發明審慎考慮在有或無本文揭示之引導RNA之情況下進行之插入方法（例如，使用ZFN系統以於靶DNA序列中引起斷裂，產生用於插入構築體之位點）。針對使用本文揭示之引導RNA之方法，該等方法包括使用CRISPR/Cas系統以修飾（例如，減弱）編碼TNFA、IFNG或TCR之核酸序列。亦應知曉本發明審慎考慮修飾（例如，減弱）TNFA、IFNG或TCR之方法，其等可在無本文揭示之引導RNA之情況下進行（例如，使用ZFN系統以於靶DNA序列中引起斷裂，產生用於插入該構築體之位點）。

**【0235】** 在一些實施例中，包含用於插入之序列（例如，編碼IL10或CTLA4之序列）之供體構築體係於靶向修飾（例如，減弱）之序列之基因體基因座（例如，TCR基因）處插入。

**【0236】** 在一些實施例中，CRISPR/Cas系統（例如，引導RNA及

RNA引導之DNA結合劑)可用以於基因體內所需基因座處產生插入位點，於該插入位點處，可插入本文揭示的包含編碼IL10、CTLA4，或靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)之序列之供體構築體以表現IL10、CTLA4，或CAR，例如，MAdCAM-1 CAR。如本文描述，該靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)、IL10或CTLA4關於其插入位點或基因座，例如其中未正常表現IL10、CTLA4或靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)之安全港基因座或TCR基因座可為異源性。在一些實施例中，本文描述之引導RNA可根據本發明方法與RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas核酸酶)一起使用以產生插入位點，於該插入位點處，可插入包含編碼IL10、CTLA4或靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)之序列之供體構築體以表現IL10、CTLA4或CAR (例如，MAdCAM-1 CAR)。用於將IL10、CTLA4或靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)插入特定基因體基因座內之引導RNA係經本文例示並描述。

**【0237】** 在一些實施例中，CD4+ T細胞係藉由轉導(例如，使用病毒或非病毒遞送)以gRNA (例如，用於減弱之靶向IFNG、TNFA或TCR之gRNA)、RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas核酸酶)、供體構築體工程化。在一些實施例中，該等工程化之T細胞係：1)用靶向編碼促發炎細胞介素(例如，IFNG或TNFA)之核酸序列之gRNA、RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas核酸酶)轉導，及2)用包含編碼調節T細胞促進分子(例如，IL10或CTLA4)，及靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)之核酸序列之供體構築體轉導。在某些實施例中，該等工程化之細胞係經選擇用於表現該靶向受體。

**【0238】** 在一些實施例中，CD4+ T細胞係藉由用gRNA (例如，用於減弱之靶向IFNG、TNFA或TCR之gRNA)、RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas核酸酶)及供體構築體轉導工程化。在一些實施例中，該等工程化之T細胞係：1)用包含編碼調節T細胞促進分子(例如，IL10或CTLA4)，及靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)之核酸序列之供體構築體轉導，及2)用靶向編碼促發炎細胞介素(例如，IFNG或TNFA)之核酸序列之gRNA、RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas核酸酶)轉導。在某些實施例中，該等工程化之細胞係經選擇用於表現該靶向受體。

**【0239】** 在一些實施例中，CD4+ T細胞係藉由用gRNA (例如，用於減弱之靶向IFNG、TNFA或TCR之gRNA)、RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas核酸酶)、供體構築體轉導工程化。在一些實施例中，該等工程化之T細胞係：1)用包含編碼調節T細胞促進分子(例如，IL10或CTLA4)，及靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)之核酸序列之供體構築體轉導，及2)用靶向編碼促發炎細胞介素(例如，IFNG或TNFA)、RNA引導之DNA結合劑(例如，Cas核酸酶)之核酸序列之gRNA轉導。

**【0240】** 如本文描述，包含編碼IL10、CTLA4，或靶向受體(例如，CAR)、引導RNA (例如，用於減弱之靶向IFNG、TNFA或TCR之gRNA)及RNA引導之DNA結合劑之序列之供體構築體可使用此項技術中已知的任何合適之遞送系統及方法遞送。在一些實施例中，該引導RNA及Cas核酸酶係與LNP締合並遞送至細胞或細胞群體，然後遞送包含編碼IL10、CTLA4或靶向受體(例如，CAR)之序列之供體構築體。在一些實施例中，該引導RNA及Cas核酸酶係與LNP締合並在遞送包含編碼IL10、CTLA4，或靶向受體(例如，CAR)之序列之供體構築體之後，遞送至細胞

或細胞群體。

【0241】 在一些實施例中，對天然存在之T細胞投與本文描述之gRNA、供體構築體及RNA引導之DNA結合劑可將該天然存在之T細胞(例如，CD4+ T細胞)轉化為顯示調節T細胞之特性(例如，免疫反應抑制特性)之細胞。

【0242】 可將用於修飾(例如，減弱) IFNG、TNFA或TCR基因表現或插入編碼IL10、CTLA4，或靶向受體(例如，CAR，例如，MAdCAM-1 CAR)之序列之gRNA、供體構築體及RNA引導之DNA結合劑引至習知T細胞或習知T細胞群體以產生本文描述之工程化之T細胞或T細胞群體。

【0243】 使用各種RNA引導之DNA結合劑(例如，核酸酶，諸如Cas核酸酶，例如，Cas9)之方法亦為此項技術中熟知。儘管本文例示CRISPR/Cas系統之用途，但應知曉亦可使用對該系統之合適改變。應知曉，取決於內文，該RNA引導之DNA結合劑可呈核酸(例如，DNA或mRNA)，諸如編碼上文提供之RNA引導之DNA結合劑之mRNA，或呈蛋白質提供。在一些實施例中，本發明方法可於已包含或表現RNA引導之DNA結合劑之細胞中實踐。

【0244】 在一些實施例中，RNA引導之DNA結合劑(諸如Cas9核酸酶)具有裂解酶活性，其亦可稱為雙股核酸內切酶活性。在一些實施例中，該RNA引導之DNA結合劑(諸如Cas9核酸酶)具有切口酶活性，其亦可稱為單股核酸內切酶活性。在一些實施例中，該RNA引導之DNA結合劑包含Cas核酸酶。Cas核酸酶之實例包括化膿性鏈球菌、金黃色葡萄球菌(*S.aureus*)及其他原核生物(參見，例如，下一段中之清單)之II型CRISPR系統之Cas核酸酶，及其變體或突變體(例如，工程化、非天然存

在、天然存在或其他變體)形式。參見，例如，US2016/0312198 A1；US 2016/0312199 A1。

【0245】 Cas核酸酶可來源之非限制性例示性物種包括化膿性鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*)、嗜熱鏈球菌(*Streptococcus thermophilus*)、鏈球菌屬(*Streptococcus sp.*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、無害李斯特菌(*Listeria innocua*)、格氏乳桿菌(*Lactobacillus gasseri*)、新法蘭西斯菌(*Francisella novicida*)、琥珀色沃裡氏菌(*Wolinella succinogenes*)、瓦茲沃思沙特氏菌(*Sutterella wadsworthensis*)、 $\gamma$ 變形桿菌(*Gammaproteobacterium*)、腦膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、空腸彎曲桿菌(*Campylobacter jejuni*)、多殺巴氏桿菌(*Pasteurella multocida*)、琥珀酸纖維桿菌(*Fibrobacter succinogene*)、紅色紅螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)、達松維爾諾卡氏菌(*Nocardiopsis dassonvillei*)、原始螺旋鏈黴菌(*Streptomyces pristinaespiralis*)、綠色發色鏈黴菌(*Streptomyces viridochromogenes*)、綠色發色鏈黴菌(*Streptomyces viridochromogenes*)、玫瑰鏈孢子菌(*Streptosporangium roseum*)、玫瑰鏈孢子菌(*Streptosporangium roseum*)、酸熱脂環酸桿菌(*Alicyclobacillus acidocaldarius*)、假蕈狀芽孢桿菌(*Bacillus pseudomycooides*)、硒還原芽孢桿菌(*Bacillus selenitireducens*)、西伯利亞微小桿菌(*Exiguobacterium sibiricum*)、德氏乳桿菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、唾液乳桿菌(*Lactobacillus salivarius*)、布氏乳桿菌(*Lactobacillus buchneri*)、齒密螺旋體(*Treponema denticola*)、微顫菌屬(*Microscilla marina*)、伯克霍爾德氏菌(*Burkholderiales bacterium*)、食萘極化單胞菌(*Polaromonas*

*naphthalenivorans*)、極化單胞菌屬(*Polaromonas sp.*)、瓦氏鱷螺(*Crocospaera watsonii*)、藍藻屬(*Cyanothece sp.*)、銅綠微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、聚球藻屬(*Synechococcus sp.*)、阿拉伯醋鹵桿菌(*Acetohalobium arabaticum*)、脫胺胺蝶呤(*Ammonifex degensii*)、貝氏鈣纖維素(*Caldicelulosiruptor becscii*)、脫硫假絲酵母(*Candidatus Desulforudis*)、肉毒桿菌(*Clostridium botulinum*)、艱難梭菌(*Clostridium difficile*)、大芬戈爾德菌(*Fingoldia magna*)、嗜熱鹽鹼厭氧菌(*Natronaerobius thermophilus*)、嗜熱丙酸厭氧腸狀菌(*Pelotomaculum thermopropionicum*)、喜溫嗜酸硫桿菌(*Acidithiobacillus caldus*)、氧化亞鐵嗜酸硫桿菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、長春花異色菌(*Allochromatium vinosum*)、海桿菌屬(*Marinobacter sp.*)、嗜鹽亞硝化球菌(*Nitrosococcus halophilus*)、瓦氏亞硝化球菌(*Nitrosococcus watsoni*)、遊海假交替單胞菌(*pseudoalteromonas haloplanktis*)、消旋克特頓桿菌(*Ktedonobacter racemifer*)、甲烷鹵蟲(*Methanohalobium evestigatum*)、多變魚腥藻(*Anabaena variabilis*)、泡沫結節藻(*Nodularia spumigena*)、念珠菌屬(*Nostoc sp.*)、最大節螺旋體(*Arthrospira maxima*)、扁平節螺旋體(*Arthrospira platensis*)、節旋藻屬(*Arthrospira sp.*)、藍細菌屬(*Lyngbya sp.*)、原型微鞘藻(*Microcoleus chthonoplastes*)、顫藍菌屬(*Oscillatoria sp.*)、運動石袍菌(*Petrotoga mobilis*)、非洲棲熱腔菌(*Thermosipho africanus*)、巴氏鏈球菌(*Streptococcus pasteurianus*)、灰黴病奈瑟菌(*Neisseria cinerea*)、拉裡彎曲桿菌(*Campylobacter lari*)、食清潔劑細小棒菌(*Parvibaculum lavamentivorans*)、白喉棒狀桿菌(*Corynebacterium*

*diphtheria*)、酸胺基球菌屬 (*Acidaminococcus sp.*)、毛螺菌科細菌 ND2006 (*Lachnospiraceae bacterium ND2006*) 及深海單細胞藍藻 (*Acaryochloris marina*)。

【0246】 在一些實施例中，Cas核酸酶係來自化膿性鏈球菌之Cas9核酸酶。在一些實施例中，該Cas核酸酶係來自嗜熱鏈球菌之Cas9核酸酶。在一些實施例中，該Cas核酸酶係來自腦膜炎奈瑟菌之Cas9核酸酶。在一些實施例中，該Cas核酸酶係來自金黃色葡萄球菌之Cas9核酸酶。在一些實施例中，該Cas核酸酶係來自新法蘭西斯菌之Cpf1核酸酶。在一些實施例中，該Cas核酸酶係來自酸胺基球菌屬之Cpf1核酸酶。在一些實施例中，該Cas核酸酶係來自毛螺菌科細菌ND2006之Cpf1核酸酶。在其他實施例中，該Cas核酸酶係來自土拉法蘭西斯菌(*Francisella tularensis*)、毛螺菌科細菌、蛋白酪蛋白弧菌(*Butyrivibrio proteoclasticus*)、異域菌門(*Peregrinibacteria bacterium*)、儉菌超門(*Parcubacteria bacterium*)、史密斯氏菌屬(*Smithella*)、酸胺基球菌(*Acidaminococcus*)、候選白蟻甲烷支原體(*Candidatus Methanoplasma termitum*)、挑剔真桿菌(*Eubacterium eligens*)、牛眼莫拉氏菌(*Moraxella bovoculi*)、稻田鉤端螺旋體(*Leptospira inadai*)、卟啉單胞菌(*Porphyromonas crevioricanis*)、普雷沃菌屬(*Prevotella disiens*)或食蟹猴卟啉單胞菌(*Porphyromonas macacae*)之Cpf1核酸酶。在某些實施例中，該Cas核酸酶係來自酸胺基球菌或毛螺菌科之Cpf1核酸酶。

【0247】 在一些實施例中，gRNA連同RNA引導之DNA結合劑一起稱為核糖核蛋白複合物(RNP)。在一些實施例中，該RNA引導之DNA結合劑係Cas核酸酶。在一些實施例中，該gRNA連同Cas核酸酶一起稱為

Cas RNP。在一些實施例中，該RNP包含I型、II型或III型組分。在一些實施例中，該Cas核酸酶係來自II型CRISPR/Cas系統之Cas9蛋白。在一些實施例中，該gRNA連同Cas9一起稱為Cas9 RNP。

**【0248】** 野生型Cas9具有兩個核酸酶域：RuvC及HNH。該RuvC域裂解非靶DNA股，及該HNH域裂解DNA之靶股。在一些實施例中，該Cas9蛋白包含超過一個RuvC域或超過一個HNH域。在一些實施例中，該Cas9蛋白係野生型Cas9。在組合物、用途及方法實施例之各者中，該Cas於靶DNA中誘導雙股斷裂。

**【0249】** 在一些實施例中，使用嵌合Cas核酸酶，其中該蛋白質之一個域或區域係經不同蛋白質之一部分置換。在一些實施例中，Cas核酸酶域可經來自不同核酸酶(諸如Fok1)之域置換。在一些實施例中，Cas核酸酶可為經修飾之核酸酶。

**【0250】** 在其他實施例中，Cas核酸酶可來自I型CRISPR/Cas系統。在一些實施例中，該Cas核酸酶可為I型CRISPR/Cas系統之級聯複合物之組分。在一些實施例中，該Cas核酸酶可為Cas3蛋白。在一些實施例中，該Cas核酸酶可來自III型CRISPR/Cas系統。在一些實施例中，該Cas核酸酶可具有RNA裂解活性。

**【0251】** 在一些實施例中，RNA引導之DNA結合劑具有單股切口酶活性，即，可切割一個DNA股以產生單股斷裂，亦稱為「切口」。在一些實施例中，該RNA引導之DNA結合劑包含Cas切口酶。切口酶係於dsDNA中產生切口之酶，即，切割一個股但不切割該DNA雙螺旋之另一股。在一些實施例中，Cas切口酶係其中(例如)由催化域中之一或多種改變(例如，點突變)不活化核酸內切活性位點之Cas核酸酶形式(例如，上文

討論之Cas核酸酶)。針對Cas切口酶及例示性催化域改變之討論，參見，例如，美國專利第8,889,356號。在一些實施例中，Cas切口酶(諸如Cas9切口酶)具有不活化之RuvC或HNH域。

**【0252】** 在一些實施例中，RNA引導之DNA結合劑係經修飾以含有僅一個功能核酸酶域。例如，該藥劑蛋白質可經修飾使得該等核酸酶域中之一者係經突變或完全或部分刪除以降低其核酸裂解活性。在一些實施例中，使用具有活性降低之RuvC域之切口酶。在一些實施例中，使用具有非活性RuvC域之切口酶。在一些實施例中，使用具有活性降低之HNH域之切口酶。在一些實施例中，使用具有非活性HNH域之切口酶。

**【0253】** 在一些實施例中，Cas蛋白核酸酶域內之保守胺基酸係經取代以降低或改變核酸酶活性。在一些實施例中，Cas核酸酶可包含RuvC或RuvC樣核酸酶域中之胺基酸取代。該RuvC或RuvC樣核酸酶域中之例示性胺基酸取代包括D10A (基於化膿性鏈球菌Cas9蛋白)。參見，例如，Zetsche等人，(2015) Cell Oct 22:163(3): 759-771。在一些實施例中，該Cas核酸酶可包含HNH或HNH樣核酸酶域中之胺基酸取代。該HNH或HNH樣核酸酶域中之例示性胺基酸取代包括E762A、H840A、N863A、H983A及D986A (基於化膿性鏈球菌Cas9蛋白)。參見，例如，Zetsche等人，(2015)。其他例示性胺基酸取代包括D917A、E1006A及D1255A (基於新法蘭西斯菌 U112 Cpf1 (FnCpf1) 序列 (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1\_FRATN)))。

**【0254】** 在一些實施例中，切口酶與一對分別與靶序列之有義及反義股互補之引導RNA組合提供。在此實施例中，該等引導RNA將該切口酶引導至靶序列並藉由於該靶序列之相對股上產生切口(即，雙重切割)引

入DSB。在一些實施例中，切口酶與靶向DNA之相對股之兩個各別引導RNA一起使用以於靶DNA中產生雙重切口。在一些實施例中，切口酶與兩個各別引導RNA一起使用，該等引導RNA係經選擇以靠近於該靶DNA中產生雙重切口。

**【0255】** 在一些實施例中，RNA引導之DNA結合劑包含一或多個異源性功能域(例如，其係或包含融合多肽)。

**【0256】** 在一些實施例中，異源性功能域可促進將RNA引導之DNA結合劑運輸至細胞之細胞核。例如，該異源性功能域可為核定位信號(NLS)。在一些實施例中，該RNA引導之DNA結合劑可與1-10 NLS融合。在一些實施例中，該RNA引導之DNA結合劑可與1-5 NLS融合。在一些實施例中，該RNA引導之DNA結合劑可與一個NLS融合。在使用一個NLS之情況下，該NLS可於該RNA引導之DNA結合劑序列之N末端或C末端處連接。其亦可插入該RNA引導之DNA結合劑序列內。在其他實施例中，該RNA引導之DNA結合劑可與超過一個NLS融合。在一些實施例中，該RNA引導之DNA結合劑可與2、3、4或5個NLS融合。在一些實施例中，該RNA引導之DNA結合劑可與兩個NLS融合。在某些情況下，該等兩個NLS可相同(例如，兩個SV40 NLS)或不同。在一些實施例中，該RNA引導之DNA結合劑係融合至於羧基末端處連接之兩個SV40 NLS序列。在一些實施例中，該RNA引導之DNA結合劑可與兩個NLS融合，一個於N末端處連接及一個於C末端處連接。在一些實施例中，該RNA引導之DNA結合劑可與3個NLS融合。在一些實施例中，該RNA引導之DNA結合劑可不與NLS融合。在一些實施例中，該NLS可為單分序列，諸如，例如，SV40 NLS，PKKKRKV (SEQ ID NO: 143)或PKKKRRV (SEQ ID

NO: 144)。在一些實施例中，該NLS可為雙分序列，諸如核質蛋白之NLS，KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 145)。在一特定實施例中，單一PKKKRKV (SEQ ID NO: 143) NLS可於該RNA引導之DNA結合劑之C末端處連接。一或多個連接子視需要包括於融合位點處。

### 【0257】

#### V. 治療方法

本發明提供用於抑制個體中免疫反應之方法，其等包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼調節T細胞促進分子之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞。本發明提供用於抑制個體中免疫反應之方法，其等包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼IL10之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞。本發明提供用於抑制個體中免疫反應之方法，其等包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼CTLA4之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞。本發明提供用於抑制個體中免疫反應之方法，其等包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將編碼IL10及CTLA4之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞。

【0258】 本發明提供用於治療個體中自體免疫疾患之方法，其等包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA

之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼調節T細胞促進分子之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞。本發明提供用於治療個體中自體免疫疾患之方法，其等包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼IL10之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞。本發明提供用於治療個體中自體免疫疾患之方法，其等包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼CTLA4之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞。本發明提供用於治療個體中自體免疫疾患之方法，其等包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將各在啟動子序列之控制下編碼IL10及CTLA4之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞。

**【0259】** 本發明提供用於治療個體中GvHD之方法，其等包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼調節T細胞促進分子之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞。本發明提供用於治療個體中GvHD之方法，其等包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼IL10之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞。本發明提供用於治療個體中GvHD之方法，其等包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將在啟動子序列之控制下編碼CTLA4

之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞。本發明提供用於治療個體中GvHD之方法，其等包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)，及將各在啟動子序列之控制下編碼IL10及CTLA4之異源性序列插入細胞內之工程化之T細胞。

**【0260】** 在一些實施例中，方法包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼調節T細胞促進分子之序列之插入，且進一步包含TCR序列之修飾(例如，減弱)之工程化之T細胞。

**【0261】** 在一些實施例中，方法包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼調節T細胞促進分子之序列之插入，且進一步包含編碼靶向受體(例如，CAR)之序列之插入之工程化之T細胞。

**【0262】** 在一些實施例中，靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至胃腸道系統，例如，該靶向受體係靶向MAdCAM-1之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如發炎腸疾、潰瘍性結腸炎或克羅恩氏病)中之免疫反應(包括發炎)。在一些實施例中，該靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至包含內皮細胞之組織，例如，該靶向受體係靶向VCAM-1之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如克羅恩氏病及多發性硬化症)中之免疫反應(包括發炎)。在一些實施例中，該靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至內皮細胞，例如，該靶向受體係靶向CEACAM6之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如克羅恩氏病)中之免疫反應。在一些實施例中，該靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至B細胞，例

如，該靶向受體係靶向CD19之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如多發性硬化症及全身性紅斑狼瘡)中之免疫反應。在一些實施例中，該靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至B細胞，例如，該靶向受體係靶向CD20之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如多發性硬化症及全身性紅斑狼瘡)中之免疫反應。在一些實施例中，該靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至發炎組織，例如，該靶向受體係靶向TNFA之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如發炎腸疾、潰瘍性結腸炎或克羅恩氏病)中之免疫反應。在一些實施例中，該靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至神經組織，例如，該靶向受體係靶向MBP、MOG或PLP之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如多發性硬化症)中之免疫反應。在一些實施例中，該靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至包含成熟B淋巴細胞之組織，例如，該靶向受體係靶向TNFRSF17之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如全身性紅斑狼瘡)中之免疫反應。在一些實施例中，該靶向受體(例如，CAR)可將工程化之T細胞靶向至滑膜組織，例如，該靶向受體係靶向瓜胺酸化波形蛋白之CAR，例如，用於抑制疾患(諸如類風濕性關節炎)中之免疫反應。

**【0263】** 在一些實施例中，該靶向受體係靶向DPP6、SCL2A2、麩胺酸脫羧酶(GAD2)、橋粒芯蛋白3 (DSG3)，及MHC I類HLA-A (HLA-A\*02)之CAR。

**【0264】** 在一些實施例中，該等方法包括投與包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾(例如，減弱)、編碼調節T細胞促進分子之序列之插入、編碼靶向受體(例如，CAR)之序列之插入，且進一步包含TCR序列之修飾(例如，減弱)之

工程化之T細胞。

【0265】 在一些實施例中，將待插入之序列插入待修飾(例如，減弱)之序列內，例如，將CAR序列插入TNFA基因體序列內，藉此修飾(例如，減弱) TNFA序列。

【0266】 在一些實施例中，該等方法包括投與包含如上文描述工程化之T細胞之T細胞群體。在一些實施例中，例如，該T細胞群體中至少40%、45%，較佳至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%T細胞係經工程化，如藉由測序(例如，NGS)評估。

【0267】 在一些實施例中，自體免疫疾患係選自潰瘍性結腸炎、克羅恩氏病、類風濕性關節炎、牛皮癬、多發性硬化症、全身性紅斑狼瘡、1型糖尿病，及移植物抗宿主疾病(GvHD)。在一些實施例中，該等工程化之T細胞具有自體或同種異體用途。

【0268】 在一些實施例中，使用上文描述之工程化之T細胞治療之有效性可於移植物抗宿主疾病之動物模型(例如，小鼠模型)中，藉由在投與該工程化之T細胞後，量測動物之體重或存活(其中在損失大部分體重，例如，起始體重之20%後，處死該等動物)中評估。在一些實施例中，有效治療導致如相較於合適對照(例如，經PBMC治療之動物)存活率統計學顯著增加。

### 【0269】

#### 實例

提供下列實例以闡述某些揭示之實施例且不應解釋為以任何方式限制本發明之範圍。

**【0270】****實例1：一般方法****1.1. 脂質奈米顆粒之製備**

**【0271】** 一般而言，以各種莫耳比將脂質組分溶解於100%乙醇中。將RNA貨物(例如，Cas9 mRNA及sgRNA)溶解於25 mM檸檬酸鹽緩衝液、100 mM NaCl，pH 5.0中，導致大約0.45 mg/mL之RNA貨物之濃度。

**【0272】** 除非另有規定，否則脂質核酸組裝含有可電離脂質A (十八-9,12-二烯酸((9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-(((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯，亦稱為分別以50:38.5:10:1.5莫耳比之(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯酸3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-(((3-(二乙基胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯)、膽固醇、DSPC及PEG2k-DMG。除非另有規定，否則該等脂質核酸組裝以約6之脂質胺對RNA磷酸酯(N:P)莫耳比，及以重量計1:1之gRNA對mRNA之比率調配。

**【0273】** 使用交叉流技術製備LNP，該技術利用乙醇中之脂質與兩體積之RNA溶液及一體機之水之撞擊式噴射混合。乙醇中之脂質通過與兩體積之RNA溶液混合交叉進行混合。第四股水流與通過直列式三通與交叉之出口水流混合(參見WO2016010840圖2)。該等LNP在室溫下保持1小時，並用水(大約1:1 v/v)進一步稀釋。LNP使用切向流過濾於平片匣(Sartorius, 100kD MWCO)上濃縮及使用PD-10脫鹽柱(GE)緩衝液交換至50 mM Tris、45 mM NaCl、5% (w/v)蔗糖，pH 7.5 (TSS)內。或者，該等LNP視需要使用100 kDa Amicon自旋過濾器濃縮並使用PD-10 脫鹽柱(GE)緩衝液交換至TSS內。然後使用0.2 μm無菌過濾器過濾所得混合物。

最終LNP儲存在4°C或-80°C下直至進一步使用。

## 【0274】

### 1.2. mRNA之活體外轉錄(「IVT」)

藉由活體外轉錄使用線性化質體DNA模板及T7 RNA聚合酶，產生含有N1-甲基假-U之加帽及聚腺苷酸化mRNA。含有T7啟動子、轉錄序列及聚腺苷酸化區域之質體DNA藉由在37°C下與XbaI以下列條件培養2小時線性化：200 ng/μL質體、2 U/μL XbaI (NEB)及1x反應緩衝液。該XbaI藉由在65°C下將該反應加熱20 min不活化。該線性化質體自酶及緩衝鹽純化。產生經修飾之mRNA之IVT反應藉由在37°C下以下列條件培養1.5至4小時進行：50 ng/μL線性化質體；2至5 mM各GTP、ATP、CTP及N1-甲基假-UTP (Trilink)；10至25 mM ARCA (Trilink)；5 U/μL T7 RNA聚合酶(NEB)；1 U/μL鼠科核糖核酸酶抑制劑(NEB)；0.004 U/μL無機大腸桿菌焦磷酸酶(NEB)；及1x反應緩衝液。將TURBO脫氧核糖核酸酶(ThermoFisher)添加至0.01 U/μL之最終濃度，並將該反應培養另外30分鐘以移除DNA模板。該mRNA使用MegaClear轉錄清潔套組(ThermoFisher)或RNeasy Maxi套組(Qiagen)遵循製造商之方案純化。或者，該mRNA通過沈澱方案純化，在某些情況下，該沈澱方案後接著進行基於HPLC之純化。簡而言之，在脫氧核糖核酸酶消化後，mRNA使用LiCl沈澱、乙酸銨沈澱及乙酸鈉沈澱純化。針對經HPLC純化之mRNA，在LiCl沈澱及重構後，該mRNA藉由RP-IP HPLC純化(參見，例如，Kariko等人，Nucleic Acids Research, 2011，第39卷，編號21 e142)。將選擇用於合併之溶離份組合並藉由如上文描述之乙酸鈉/乙醇沈澱脫鹽。在另一替代方法中，mRNA用LiCl沈澱方法純化，接著藉由切向流過濾進

一步純化。RNA濃度藉由量測於260 nm下之吸光度(Nanodrop)測定，及轉錄本藉由毛細管電泳由生物分析儀(Agilent)分析。

**【0275】** 化膿性鏈球菌(「Spy」) Cas9 mRNA自編碼根據本文描述之核酸序列之開放閱讀框的質體DNA產生。針對下文mRNA核酸序列，應瞭解T應經U (其等係如上文描述之N1-甲基假尿苷)置換。實例中使用之信使RNA包括5'帽及3'聚A尾，例如，多達100個nts (SEQ ID NO: 146)。

**【0276】**

### 1.3. 用於中靶編輯效率之下一代測序(「NGS」)及分析

使用QuickExtract™ DNA提取溶液(Lucigen，貨號QE09050)根據製造商之方案提取基因體DNA。

**【0277】** 為定量確定基因體中靶位置處編輯之效率，利用深度測序以鑑別藉由基因編輯引入之插入及缺失之存在。於受關注基因(例如，TRAC)內之靶位點周圍設計PCR引子並擴增受關注之基因體區域。引子序列設計按照本領域中之標準進行。

**【0278】** 根據製造商之方案(Illumina)進行另外PCR以添加用於測序之化學物質。於Illumina MiSeq儀器上測序擴增子。在消除彼等具有低品質評分者後，將讀段與人類參考基因體(例如，hg38)比對。將含有該等讀段之所得檔案映射至參考基因體(BAM檔案)，其中選擇與受關注靶區重疊之讀段並計算野生型讀段之數量與含有插入缺失之讀段之數量。編輯百分比(例如，「編輯效率」或「編輯百分比」或「插入缺失百分比」)定義為具有插入缺失之序列讀段總數量與序列讀段(包括野生型)之總數量的比。

**【0279】**

### 實例2. 過表現Treg相關因子之T細胞之抑制能力

轉導CD3+CD4+ T細胞以過表現Treg相關轉錄因子Foxp3、具有IL10之Foxp3、IL10、CTLA4及具有CTLA4之IL10，並分析其等抑制發炎免疫反應之能力。

## 【0280】

### 2.1 T細胞製備

自新鮮白細胞單采術(StemCell Technologies，供體編號RG1953)內部製備人類CD3+CD4+T細胞。針對內部製備，藉由陰性選擇使用人類CD4+ T細胞分離套組(Miltenyi；貨號130-096-533)遵循製造商之方案分離CD3+CD4+ T細胞。將該等經分離之CD3+CD4+ T細胞冷凍於Cryostor CS10冷凍培養基(貨號07930)中直至進一步使用。在活化當天，使用37°C水浴解凍經冷凍之CD3+CD4+ T細胞。以 $1 \times 10^6$ 個細胞/mL之密度將經解凍之CD3+CD4+ T細胞接種於總計5 ml由含有10% (v/v)胎牛血清(Gibco；貨號A31605-01)、1x Glutamax (Gibco；貨號35050-061)、50  $\mu$ M 2-巰基乙醇(Gibco；31350-010)、1x 非必需胺基酸(Corning，貨號25-0250-CI)、1 mM 丙酮酸鈉(Corning；貨號25-000-CI)、10 mM HEPES緩衝液(Gibco；貨號15630-080)、具有添加之細胞介素100 U/mL重組人類介白素-2 (StemCell Technologies；貨號78036.1)之1x青黴素-鏈黴素(Gibco；貨號15140-122)、5 ng/ml重組人類介白素7 (StemCell Technologies，貨號78053.1)及5 ng/ml重組人類介白素15 (StemCell Technologies，貨號78031.1)之RPMI 1640 (Corning；貨號10-040-CV)構成之T細胞RPMI培養基中。細胞藉由添加25 uL/mL ImmunoCult人類CD3/CD28/CD2 T細胞活化劑(StemCell Technologies，貨號10990)活化並在慢病毒轉導前在37°C下培養48小時。

## 【0281】

## 2.2 T細胞轉導及細胞分選

為過表現IL10、CTLA4及FOX3P，經活化之CD3+CD4+ T細胞用慢病毒構築體，個別或一起轉導。活化後四十八小時，CD3+CD4+ T細胞係經獲取，清洗並以 $1 \times 10^6$ 個細胞/100  $\mu$ L T細胞RPMI培養基之密度重懸浮。將100  $\mu$ L濃縮之病毒上清液添加至該等CD3+CD4+ T細胞並以1000xg在37°C下離心60 min。轉導後，將該等CD3+CD4+ T細胞重懸浮於細胞/病毒上清液混合物中並轉移至含有20 mL用500 U/mL IL-2、5 ng/mL IL-7及5 ng/mL IL-17補充之T細胞RPMI培養基之6孔G-rex (Wilson Wolf；貨號80240M)之單個孔。將該等經轉導之CD3+CD4+ T細胞培養4至6天並使用BD FACS Aria™融合細胞分選器(BD Biosciences)分選以分離表現受關注標靶之細胞。分選後，該等CD3+CD4+ T細胞於具有20 mL含有如2.1中提及之組分並用500 U/mL IL-2、5 ng/mL IL7及5 ng/mL IL17進一步補充之T細胞RPMI培養基之6孔Grex盤中培養，直至第25天。

【0282】 使用此項技術中已知的方法製備自然調節T細胞(nTreg)。簡而言之，自體PBMC係經解凍並處理以使用CD4+ T細胞陰性選擇套組(Miltenyi，貨號130-096-533)根據製造商之說明書分離CD4+ T細胞。以 $1 \times 10^7$ 個細胞/mL將CD3+CD4+ T細胞重懸浮於FACS緩衝液中並用BV421抗CD4 (Biolegend，貨號300532)、APC抗CD25 (Biolegend，貨號302610)及PE-Cy7抗CD127 (Biolegend，貨號351320)在4°C下染色30 min。來自CD4+CD127群體之前3至5%最高表現CD25+細胞藉由FACS分選至含有50%胎牛血清之T細胞RPMI培養基內。將經分選之

CD3+CD4+CD25+CD127- nTreg接種於含有20 mL用如實例2.1中提及之組分補充並用500 U/mL IL-2 (StemCell Technologies, 貨號78036.1)、100 nM雷帕黴素(Millipore Sigma, 貨號553211)及25  $\mu$ l/mL抗CD3/28/2 Immunocult T細胞活化劑(StemCell Technologies, 貨號10990)進一步補充之T細胞RPMI培養基之6孔Greiner中。每隔一天歷時7天添加IL-2 (StemCell Technologies, 貨號78036.1)及雷帕黴素(Millipore Sigma, 貨號553211), 在該時間點下, 每隔一天添加僅500 U/ml IL-2 (StemCell Technologies, 貨號78036.1)。在第12天, nTreg係經獲取, 清洗並接種於6孔Greiner盤的用如A.1中提及之組分、500 U/mL IL-2 (StemCell Technologies, 貨號78036.1)補充之T細胞RPMI培養基中直至注射當天。

## 【0283】

### 2.3 驗證靶表現

靶表現藉由流式細胞分析技術證實。五十萬個經轉導之CD3+CD4+T細胞用FoxP3/轉錄因子染色緩衝液組(eBioscience貨號00-5523-00), 根據製造商之說明書透化。透化後, 該等經轉導之CD3+CD4+ T細胞用一組由以下構成之抗體培養:(1) PerCP/Cy 5.5抗FoxP3 (BD Biosciences, 貨號561493)、eFluor660抗Eos (Invitrogen, 貨號50-5758-80)、太平洋藍抗Helios (Biolegend, 貨號137220)或(2) BV421抗IL-10 (Biolegend, 貨號501422)及APC抗CTLA4 (Biolegend, 貨號369612)。將經染色經轉導之CD3+CD4+ T細胞於Cytotflex流式細胞儀(Beckman Coulter)上處理並使用FlowJo軟體包分析。在定量抗體組中之標靶之前, 基於尺寸、形狀門控經轉導之CD3+CD4+ T細胞。表徵標靶相對於轉導對照之過表現。給定標靶所需之表現量等於或大於nTreg (表4及圖1A至E)。nTreg樣本表現高

程度之Foxp3、Helios及Eos，此與高純度及抑制表型相關。

**表4：慢病毒轉導後CD3+CD4+ T細胞中蛋白質表現之平均螢光強度**

樣本	CTLA4	IL10	Foxp3	Helios	Eos	n
轉導對照	2203	1285	3948	1521	877	1
IL10	2291	2448	3945	1396	871	1
CTLA4	47928	1296	3936	1334	939	1
IL10 + CTLA4	49948	1802	4372	1304	803	1
FOXP3	3551	1347	10127	1670	1704	1
FOXP3 + IL10	3952	2050	7339	1525	2796	1
nTreg	9324	1282	10047	5018	2016	1

【0284】

## 2.4 GvHD模型中免疫抑制之活體內評估

使用移植物抗宿主疾病小鼠模型評估經分選經轉導之CD3+CD4+ T細胞之活體內抑制功能。

【0285】 用於活體內注射之經分選之CD3+CD4+ T細胞係經獲取並用死細胞移除套組(Miltenyi，貨號130-090-101)根據製造商之說明書處理。自體PBMC係如上文於實例中描述解凍。以1:1比率將PBMC添加至各分析群體並將細胞重懸浮於PBS中至 $6 \times 10^6/150 \mu\text{L}$ 。僅PBMC組以 $3 \times 10^6/150 \mu\text{L}$ 重懸浮。

【0286】 在注射前一天使用X射線(RS-2000輻射器；Rad Source Technologies)藉由亞致死輻射(200雷得)處理雌性NOG小鼠(NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Sug</sup>/JicTac；Taconic，貨號NOG-F)以供細胞移植。對經輻射之NOG小鼠定群靜脈內注射 $150 \mu\text{L}$ 各測試細胞群體。五隻經輻射之小鼠未注射並用作僅輻射對照。每天監測體重。一經損失20%重量，即處死小鼠並評估其等脾之細胞組成。繪製存活率以瞭解各測試組中小鼠之存活率。如表5及圖2A中顯示，經IL-10及CTLA4兩者轉導之僅T細胞將存活延長至與nTreg相似之程度。

表5：注射慢病毒轉導之CD3+CD4+細胞後之存活天數百分比

天數	FoxP3 (n=3)	FoxP3+ IL-10 (n=4)	IL10 (n=5)	IL10+ CTLA4 (n=5)	CTLA4 (n=5)	nTreg (n=3)	轉導對照 (n=5)	僅 PBMC (n=4)	僅輻射 (n=5)
12	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
13	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	75%	100%
14	100%	100%	100%	100%	100%	100%	60%	75%	100%
16	100%	100%	100%	100%	100%	100%	20%	75%	100%
17	0%	75%	80%	100%	100%	100%	0%	50%	100%
18		75%	60%	100%	100%	100%		25%	100%
20		50%	40%	100%	40%	100%		25%	100%
21		25%	20%	100%	40%	100%		0%	100%
22		0%	0%	80%	40%	100%			100%
23				80%	20%	100%			100%
26				60%	0%	100%			100%
27				60%		67%			100%
30				0%		33%			100%
32						0%			100%

【0287】為證實人類白血球之植入，評估脾組合物。在安樂死時，將各動物之脾收集於含有PBS之gentleMACS C管(Miltenyi，貨號130-096-334)中。該等脾使用gentleMACS Octo離解機(Miltenyi, 130-095-937, 程式mSpleen01\_01)離解。使細胞懸浮液瀘過70微米細胞過濾網(Corning，貨號08-771-2)並使用Vi-CELL XR細胞存活率分析儀(Beckman Coulter)計數細胞。將大約一百萬個活脾細胞重懸浮於FACS緩衝液中並在4℃下用由抗人類CD3 (Alexa Fluor 488 (Biolegend，貨號317310或PerCP/花青5.5 (Biolegend，貨號300327)))、BV650抗人類CD19 (Biolegend，貨號302238)、APC抗人類CD45 (BD Pharmigen，貨號561864)、APC-Fire 750抗人類CD4 (Biolegend，貨號300560)及BV421抗小鼠Ter119 (Biolegend，貨號116234)構成之抗體組染色30 min。該等脾細胞用FACS緩衝液清洗，於Cytotflex流式細胞儀(Beckman

Coulter)上處理並使用FlowJo軟體包分析。CD4 T細胞定義為Ter119-CD45+CD19-CD3+CD4+。CD8 T細胞定義為Ter119-CD45+CD19-CD3+CD4-。B細胞定義為Ter119-CD45+CD19+CD3-。為測定個別群體之細胞數量，各群體之百分比應用於回收之脾細胞之總數量。小鼠用經慢病毒載體轉導之T細胞處理以誘導IL10及CTLA4兩者之過表現，且nTreg具有比未處理之PBMC小鼠更低之B細胞百分比及數量。資料顯示於表6及圖2B中。

**表6：小鼠脾中人類淋巴細胞之定量**

樣本	總人類淋巴細胞 (CD45+) x 10 <sup>5</sup>			人類CD4 T細胞 x 10 <sup>5</sup>		人類CD8 T細胞 x 10 <sup>5</sup>		人類B細胞x 10 <sup>5</sup>		n
	平均值	SEM	n	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	
僅PBMC	14.93	7.91	4	5.15	1.86	0.73	0.49	5.90	3.37	4
轉導對照	57.27	19.09	5	16.00	5.00	3.35	1.94	22.25	8.65	5
nTreg	14.80	5.96	4	2.82	0.74	2.44	0.29	0.01	0.01	4
IL10	35.90	16.23	5	10.69	4.05	5.64	5.39	9.30	3.59	5
CTLA4	34.08	12.90	5	22.83	9.83	0.86	0.62	7.23	3.61	5
IL10+ CTLA4	34.86	18.52	5	6.47	3.98	9.66	5.45	0.02	0.01	5
Foxp3	41.90	7.77	3	13.00	2.59	4.01	0.68	22.50	3.74	4
Foxp3 + IL10	21.57	11.06	4	7.87	5.81	1.32	0.51	8.56	5.11	4

【0288】

## 2.5 經轉導之CD3+CD4+ T細胞之細胞介素概況分析

刺激經分選經轉導之CD3+CD4+ T細胞以評估其等細胞介素概況。將經分選經轉導之CD3+CD4+ T細胞以1x10<sup>5</sup>個T細胞/孔接種於U底培養盤中的總計200 μL具有或不具有25 uL/mL ImmunoCult人類CD3/CD28/CD2 T細胞活化劑(Stemcell Technologies, 貨號10990)之T細胞RPMI培養基中並在37°C下培養48小時。培養48小時後，根據製造商之說明書，將培養盤離心，收集並冷凍上清液以使用定制U-PLEX生物標誌物套組(Meso Scale Diagnostics, 貨號K15067L-2)進行後續細胞介素定

量。具體言之，使用該U-PLEX生物標誌物套組以定量下列人類細胞介素：IFNG、TNFA、IL6、IL2、IL13及IL10。該等U-PLEX生物標誌物盤使用Meso Quickplex SQ120儀器(Meso Scale Discovery)讀數且資料用Discovery工作臺4.0軟體包(Meso Scale Discovery)分析。結果顯示於表7及圖3A至3F中。經具有編碼IL10之序列之慢病毒表現載體轉導之CD3+CD4+ T細胞在TCR刺激後分泌大量IL10。IL10之過表現亦增加IL6、IFNG及TNFA之分泌。相比之下，經具有編碼FoxP3之序列之慢病毒表現載體轉導之T細胞顯示所有定量細胞介素之表現降低。自然Treg亦顯示定量細胞介素之分泌減少，此係高純度及抑制nTreg之特性。

**表7：經轉導之細胞一經細胞刺激後之活體外細胞介素產生(pg/ml)**

樣本	IFNG		IL10		IL13		IL2		IL6		TNFA		n
	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	
未經轉導之CD3+CD4+ T細胞	110,200	431	42	3	1,997	61	41,741	1,053	21	1	5,092	143	3
轉導對照	49,896	2,310	29	2	2,279	64	27,081	1,060	6	1	3,383	139	3
Foxp3	57,997	5,483	5	0	463	27	4,978	550	7	2	1,306	123	3
IL10	152,243	1,803	66,549	698	1,564	26	35,979	747	24	1	7,279	123	3
CTLA4	61,526	3,636	34	0	2,008	53	24,469	629	5	1	3,679	179	3
IL10 + CTLA4	159,139	6,838	26,523	737	1,725	39	25,621	620	21	1	6,484	148	3
nTreg	5,805	229	24	3	1,198	33	384	7	3	1	297	5	3

## 【0289】

### 2.6抑制功能之混合淋巴細胞反應分析

使用混合淋巴細胞反應(MLR)以分析經分選經轉導之CD3+CD4+ T細胞之抑制功能。該MLR係由T細胞將另一供體之同種異體白血球識別為外源引起之發炎反應。Treg可抑制此發炎反應。因此，該MLR係評估Treg (包括工程化之Treg)之抑制能力之標準分析。若Treg係抑制性，則反應發炎T細胞之發炎細胞介素之增生及產生減少。

【0290】 MLR係於96孔U底盤中使用T細胞RPMI培養基進行。未經轉導之CD3+CD4+ T細胞用CellTrace Violet (CTV) (Thermofisher Scientific；貨號C34557)根據製造商之說明書標記並用作反應細胞。根據製造商之說明書，使用死細胞移除套組(Miltenyi；貨號130-090-101)處理來自同種異體供體之CD3耗盡之PBMC而非用於該等經轉導之T細胞。藉由組合每孔50,000個經CTV標記之T細胞、50,000個CD3耗盡之PBMC及大約50,000個(1比1)、16,666個(4比1)、5,555個(16比1)、1,851個(64比1)或617個(256比1)經分選經轉導之CD3+CD4+ T細胞製備培養物。在37°C下培養5天後，將培養盤離心，並獲取培養上清液用於細胞介素定量。將細胞集結粒重懸浮於含有APC/Fire 750抗CD4之FACS緩衝液中並在4°C下放置30 min。該等細胞隨後經清洗，於CytoFlex流式細胞儀(Beckman Coulter)上處理，並使用FlowJo軟體包分析。細胞首先藉由陽性CD4表現，接著CTV表現且最後於未稀釋之CTV群體上進行門控。使用下式計算CTV稀釋之抑制：

( CTV T 細胞之  $\log_2(y)$

– 具有Treg之 CTV T細胞之  $\log_2(y)$  ) / CTV T細胞之  $\log_2(y)$  \* 100

其中y = 整個經CTV標記之群體之平均螢光強度 / 經CTV標記之群體之未稀釋部分之平均螢光強度。資料顯示於表8及圖4中。

表8：如藉由CTV稀釋量測之經轉導之T細胞對細胞增生之抑制百分比

樣本	1比1		4比1		16比1		64比1		256比1	
	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM
轉導對照	32.52	0.19	14.88	4.30	17.02	7.56	6.84	7.30	12.99	4.36
Foxp3	80.34	1.10	51.50	8.41	19.91	5.59	-1.95	10.75	5.24	3.50
IL10	32.73	0.97	27.57	11.08	-9.69	6.50	-19.10	9.28	-9.67	2.66
CTLA4	77.81	2.54	75.03	4.61	52.11	7.06	24.09	2.17	8.28	4.43
IL10/CTLA4	85.36	1.79	71.27	1.86	30.72	6.94	-1.98	2.68	-7.75	2.27
nTreg	74.68	0.76	74.89	1.84	53.10	1.84	2.01	6.18	-0.87	3.07

## 【0291】

**實例3：工程化之T細胞之抑制能力**

由於經慢病毒載體轉導以促進IL-10及CTLA-4之過表現之CD3+CD4+ T細胞證實IFNG及TNFA之產生增加，因此此等細胞係經進一步工程化以破壞編碼IFNG及TNFA之基因。此等細胞之抑制能力係經活體外及活體內評估。

## 【0292】

**3.1 T細胞工程化**

人類CD3+CD4+ T細胞係自白細胞單采術分離，活化，並用慢病毒構築體轉導以促進如實例2.2中描述之IL10及CTLA4之過表現。轉導後一天，經轉導之細胞使用Cas9工程化以破壞TNFA及IFNG基因。含有Cas9 mRNA 及 靶向 IFNG (G019753 ; IFNG 引導序列 CCAGAGCAUCCAAAAGAGUG (SEQ ID NO: 14)) 或 TNFA (G019757 ; TNFA 引導序列 AGAGCUCUUACCUACAACAUC (SEQ ID NO: 58))之sgRNA之LNP係如實例1中描述調配。

G019753 :

mC\*mC\*mA\*GAGCAUCCAAAAGAGUGGUUUUAGAmGmCmUm  
AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU  
CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA  
mGmUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU (SEQ ID NO: 119)

G019757 :

mA\*mG\*mA\*GCUCUUACCUACAACAUGUUUUAGAmGmCmUm  
AmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU

CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA  
mGmUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU (SEQ ID NO: 120)

【0293】 在37 °C 下將各LNP製劑於用10 ug/ml重組人類ApoE3 (Peptotech, 貨號350-02)補充之包括CTS OpTmizer T細胞擴增(Cell Expansion) SFM (Gibco, 貨號A3705001)、1%青黴素-鏈黴素、1X Glutamax、10 mM HEPES、2.5%人類AB血清(Gemini, 貨號100-512)、200 U/mL重組人類介白素-2、5 ng/ml重組人類介白素7及5 ng/ml重組人類介白素-15之OpTmizer基礎培養基中培養15分鐘。活化後四十八小時, 經轉導之T細胞係經清洗並懸浮於具有200 U/mL重組人類介白素-2、5 ng/ml重組人類介白素7及5 ng/ml重組人類介白素-15, 連同2.5%人類AB血清(Gemini, 貨號100-512)一起之OpTmizer基礎培養基中。將經預培養之LNP混合物添加至各15 mL管以產生5 ug/ml總RNA之最終濃度, 在雙重剔除組中, 最終濃度係10 ug/ml總RNA。用ApoE3補充之培養基用作媒介物對照。24小時後, 將T細胞收集, 清洗並培養於具有如實例2中描述之細胞介素之T細胞RPMI培養基中, 用於擴增直至注射當天(活化後第15天)。

【0294】

### 3.2 工程化之CD3+CD4+ T細胞中蛋白質表現之流式細胞分析技術分析

靶表現藉由如實例2中之流式細胞分析技術證實。資料顯示於表9及圖5A至5E中。

表9：T細胞工程化後CD3+CD4+細胞之平均螢光強度

樣本	IL10		CTLA4		Foxp3		Helios		Eos		n
	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	
未經轉導之CD3+ CD4+ T細胞	1613.5	2.5	8069.5	164.4	7650.0	94.0	1866.0	11.0	3559.5	13.5	2
MOCK KO	2868.0	57.0	71630.0	553.0	6134.5	0.5	1475.0	15.0	2666.5	100.5	2
IFNG KO	3073.5	132.5	95616.0	3234.3	6468.5	39.5	1623.5	36.5	3145.0	118.0	2
TNF KO	2734.0	106.0	85600.5	1232.1	6363.5	393.5	1638.5	97.5	3344.0	409.0	2
IFNG KO, TNF KO	2190.5	75.5	48940.5	1751.9	5316.5	191.5	1321.5	61.5	2406.0	18.0	2
nTreg	1467.5	102.5	38990.0	1857.6	24685.0	866.0	8822.5	645.5	5494.5	48.5	2

【0295】

### 3.3 G<sub>v</sub>HD模型中發炎反應之活體內評估

使用如實例2中之移植物抗宿主疾病小鼠模型評估儘過表現IL10及CTLA4(Mock KO)，或與編輯組合以減弱IFNG、TNFA之表現或IFNG及TNFA之雙重減弱之工程化之CD3+CD4+ T細胞之活體內抑制功能。存活資料顯示於表10及圖6A中。人類白血球植入通過如實例2中之脾組合物評估。資料顯示於表11及圖6B中。

表10：注射工程化之CD3+CD4+細胞後之存活天數百分比

注射後天數	MOCK KO (n=7)	IFNG KO (n=8)	TNF KO (n=6)	IFNG KO TNF KO (n=10)	nTreg (n=10)	僅 PBMC (n=9)	僅輻射 (n=5)
相對於PBMC 的P值	0.5566	0.6053	0.7746	0.0312	0.0012		
6	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
8	100%	100%	100%	88%	100%	78%	100%
10	100%	75%	100%	88%	100%	78%	100%
12	58%	63%	67%	75%	100%	56%	100%
14	43%	63%	17%	50%	63%	34%	100%
16	29%	38%	0%	50%	63%	23%	100%
18	15%	25%		38%	50%	23%	100%
20	15%	25%		28%	50%	23%	100%
25	15%	0%		25%	50%	23%	100%
27	0%			25%	50%	0%	100%
33				13%	38%		100%
38				0%	25%		100%
41					13%		100%
50					0%		100%

表11：小鼠脾中人類淋巴細胞之定量

樣本	總人類淋巴細胞 (CD45+) x 10 <sup>5</sup>			人類CD4 T細胞 x 10 <sup>5</sup>		人類CD8 T細胞 x 10 <sup>5</sup>		人類B細胞x 10 <sup>5</sup>		
	平均值	SEM	n	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	n
僅PBMC	64.70	11.98	8	25.30	7.02	8.56	2.19	9.35	2.52	9
MOCK KO	41.72	18.66	6	9.48	3.57	7.10	2.77	14.49	12.88	6
IFNG KO	29.40	19.62	6	12.48	8.37	8.41	6.52	4.41	3.53	6
TNF KO	50.82	11.97	6	12.32	4.39	7.49	2.57	11.86	5.80	5
IFNG KO, TNF KO	76.40	46.06	8	35.00	21.81	29.62	24.24	5.08	2.91	8
nTreg	37.40	11.33	7	15.66	7.91	6.16	2.41	1.25	0.96	7

【0296】

### 3.4 CD3+CD4+工程化之細胞之細胞介素概況

刺激經分選經轉導之CD3+CD4+ T細胞以評估其等如實例2中一式三份之細胞介素概況。結果顯示於表12及圖7A至7F中。

表12：工程化之T細胞一經細胞刺激後之活體外細胞介素產生

(pg/ml)

樣本	未經轉導之 T細胞		未編輯		IFNG KO		TNF KO		IFNG KO TNF KO		nTreg	
	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM
IFNG	519,150	13,984	709,650	24,157	2,091	172	540,921	28,764	5,413	213	10,292	294
IL10	77	3	30,500	2,557	27,767	1,484	20,622	1,467	32,167	967	12	1
IL13	9,714	254	3,608	263	3,429	113	1,735	101	2,428	41	576	29
IL2	23,535	1,088	13,211	291	6,080	131	7,180	467	41,787	138	36	3
IL6	137	3	30	3	24	1	20	3	46	3	5	1
TNFA	4,433	326	5,810	473	2,900	229	138	6	248	3	232	8

【0297】

### 3.5 抑制功能之混合淋巴細胞反應分析

使用混合淋巴細胞反應以分析如實例2中之經轉導之細胞在表13中描述之經CTV標記之T細胞對工程化之T細胞之比率下的抑制功能。資料顯示於表13及圖8中。

表13：如藉由CTV稀釋量測之工程化之T細胞對細胞增生之抑制百分比

第 147 頁(發明說明書)

樣本	1比1		1比3		1比9	
	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM
未經轉導之T細胞	7.17	-4.32	-6.91	4.97	3.13	4.78
MOCK 編輯	49.60	-0.38	40.93	2.46	36.83	1.07
IFNG KO	43.27	-1.87	42.33	3.48	37.77	2.03
TNF KO	55.17	-9.52	43.53	1.96	31.87	1.30
IFNG KO、TNFA KO	38.07	-1.91	36.30	0.36	30.50	2.12
nTreg	50.57	-2.03	42.23	2.72	25.50	2.28

【0298】

#### 實例4. GvHD模型中發炎反應之活體內評估

除注射 $5 \times 10^6$ 個PBMC及Treg外，使用如實例2中之移植物抗宿主疾病小鼠模型評估過表現IL10及CTLA4之野生型或高親和力形式及編輯以減弱IFNG、TNFA之表現之工程化之CD3+CD4+ T細胞之活體內抑制功能。存活資料顯示於表14及圖9A中。人類白血球植入通過如實例2中之脾組合物評估。資料顯示於表15及圖9B中。

表14：注射工程化之CD3+CD4+細胞後之存活天數百分比

注射後天數	IL10 (wt)/ CTLA4 (wt) (n=7)	IL10 (wt)/ CTLA4 (HA) (n=3)	IL10 (HA)/ CTLA4 (HA) (n=7)	nTreg (n=7)	PBMC (n=8)	媒介物 (n=9)
相對於PBMC 的P值	<b>0.088</b>	<b>0.25</b>	<b>0.32</b>	<b>0.0008</b>		
8	100%	100%	86%	100%	100%	100%
15	100%	100%	86%	100%	88%	100%
16	100%	100%	86%	100%	75%	100%
18	100%	100%	86%	100%	50%	100%
20	100%	100%	86%	100%	38%	100%
21	100%	100%	71%	100%	38%	100%
28	85%	100%	57%	100%	25%	100%
29	85%	100%	42%	100%	25%	100%
30	85%	67%	42%	100%	25%	100%
32	71%	67%	42%	100%	25%	100%
33	42%	67%	42%	100%	25%	100%
34	42%	67%	29%	100%	25%	100%
36	29%	0%	29%	100%	25%	100%
37	29%		29%	100%	25%	100%
39	29%		14%	100%	13%	100%
40	0%		14%	100%	13%	100%

表15：小鼠脾中人類淋巴細胞之定量

樣本	總人類淋巴細胞 (CD45+) x 10 <sup>6</sup>			人類CD4 T細胞 x 10 <sup>6</sup>		人類CD8 T細胞 x 10 <sup>6</sup>		人類B細胞x 10 <sup>5</sup>	
	平均值	SEM	n	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM
IL10(重量)/CTLA4(重量)	16.8	10.1	6	7.5	3.7	5.6	4.1	0.3	0.1
IL10(重量)/CTLA4(HA)	6.3	5	3	3.5	2.9	1.7	1.4	0.5	0.5
IL10(HA)/CTLA4(HA)	12.9	4.4	6	5.4	2.2	5.7	2.3	1.4	0.7
nTreg	9.2	1.3	8	5.6	0.8	2.4	0.5	3	2.1
PBMC	7	1.8	7	3.2	1.1	1.6	0.6	8	4.2

## 【0299】

## 實例5. 工程化之T細胞曝露於發炎細胞介素後之抑制能力

Treg抑制表型於發炎環境中之穩定性係Treg療法之關鍵考量。因此，吾人將sTreg曝露於發炎細胞介素TNF- $\alpha$ 、IL-6及IL-1 $\beta$ ，並活體外評估其等抑制功能。

## 【0300】

## 5.1 T細胞工程化

人類CD3+CD4+ T細胞係自白細胞單采術分離，活化，並用慢病毒構築體轉導以促進如實例2.2中描述之IL10及CTLA4之過表現。轉導後一天，經轉導之細胞使用Cas9工程化以使用gRNA G019754 (INFG)及G019760 (TNFA)如實例3.1中描述破壞TNFA及IFNG基因。

【0301】經分選之工程化之CD3+ CD4+ T細胞之一部分係在發炎細胞介素、100 ng/mL各TNF- $\alpha$  (Miltenyi ; 130-094-014)、IL-1 $\beta$  (Miltenyi ; 130-093-898)及IL-6 (Miltenyi ; 130-095-365)之混合物之存在下培養。每兩天補充TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6歷時八天，在該時間點下，使用MLR抑制分析評估其等功能。

【0302】靶表現藉由如實例2中之流式細胞分析技術證實。資料顯示於表16中。

表16：T細胞工程化後CD3+CD4+細胞之平均螢光強度

樣本	CTLA4 (平均值)
未經轉導	3866
未編輯	114290
IFNG KO	114271
TNFA KO	112277
IFNG/TNFA KO	116005
未編輯，經預處理	78579
IFNG KO，經預處理	93574
TNFA KO，經預處理	82986
IFNG/TNFA KO，經預處理	85807

【0303】如實例2中，一式三份，刺激經分選經轉導之CD3+CD4+ T細胞以評估其等細胞介素概況。資料顯示於表17及18中。

表17：工程化之T細胞一經細胞刺激後之活體外細胞介素產生 (pg/ml)

樣本	未經轉導		未編輯		IFNG KO		TNF KO		IFNG KO TNF KO	
	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM
IFNG	73975.5	3610.3	114184	859.7	621.2	58.1	113817.1	3318.9	711.7	120.8
TNFA	676.8	57.7	1427.1	174	880	133.5	164.7	8.7	131.6	14.7
IL10	575.1	59.8	45237.9	2672.3	28551.8	2639.2	38242.1	2746.2	34482.1	3807.2
IL13	2791.1	109.5	1960.8	80	1487.8	137.9	1698.8	69	1703.5	91.7
IL2	62.9	2.1	254.2	27.6	120.2	15	251	20.7	172.9	17.5
IL6	16.7	1.6	444.2	108.4	30.2	4.7	45.9	3	33.7	5.4

表18：曝露於發炎細胞介素之工程化之T細胞一經細胞刺激後之活體外細胞介素產生 (pg/ml)

樣本	未編輯		IFNG KO		TNF KO		IFNG KO TNF KO	
	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM
IFNG	315882	7526.6	595	41.9	315422	1119.8	1033.2	29.5
TNFA	2284.5	115.9	1573.2	48.1	142.4	8.9	102.1	8.5
IL10	28998.4	1493.6	24158.7	1010.4	26235.9	523.5	21074	1190.8
IL13	3980.6	122.8	2731.7	97.6	2654.3	63.9	2523.7	87.3
IL2	1078.6	80.3	93.8	6.2	428	24.3	242.2	23.1
IL6	53.6	2.8	29.7	4.4	47.5	1.9	25.2	3.1

【0304】

## 5.2 抑制功能之混合淋巴細胞反應分析

在添加或不添加100 ng/mL各TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6之情況下，使用

混合淋巴細胞反應以分析如實例2中經轉導之細胞在經CTV標記之T細胞對工程化之T細胞之1:1比率下的抑制功能。資料顯示於表19及20中，及顯示於圖10A至B中。

**表19：在無發炎細胞介素之抑制分析中如藉由CTV稀釋量測之工程化之T細胞對細胞增生之抑制百分比**

樣本	未預處理		發炎預處理	
	平均值	SEM	平均值	SEM
未編輯	69.4	3.1	75.6	1.6
IFNG KO	74.6	4.3	78.5	2.6
TNF KO	75.6	0.5	81.1	0.9
TNF IFNG KO	70.2	2.6	85.8	1.4

**表20：在有及無發炎細胞介素之抑制分析中如藉由CTV稀釋量測之工程化之T細胞對細胞增生之抑制百分比**

樣本	對照		MLR中之發炎細胞介素		MLR中之預處理及發炎細胞介素	
	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM
未編輯	69.4	3.1	51.8	3.8	53.4	1.8
IFNG KO	74.6	4.3	52.7	7	57.6	4.9
TNF KO	75.6	0.5	55.7	3.4	52.	3.1
TNF IFNG KO	70.2	2.6	57.4	4.2	56.4	3.5

### 【0305】

#### 實例6. 發炎腸疾模型中工程化之T細胞之抑制能力

已知Treg在臨床前模型中抑制結腸炎之誘導。此外，已知IL-10中之突變係人類中發展結腸炎之風險因子。重要地，已知發炎之結腸表現高程度之MAdCAM-1（一種淋巴細胞黏附分子）。經編輯以破壞編碼IFNG及TNFA之基因並經進一步工程化以表現抗MAdCAM CAR之過表現IL10及CTLA4之T細胞用於在發炎腸疾(IBD)之人類化小鼠模型(參見，例如，Gottel等人，Low-Dose Interleukin-2 Ameliorates Colitis in a Preclinical

Humanized Mouse Model. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2019;8(2):193-195), 或用於IBD之CD45RB<sup>hi</sup>轉移模型(參見, 例如, Asseman等人, An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation. J Expt Med. 190(7):995-1003)中治療。

【0306】簡而言之, 藉由在第0天對NOG小鼠注射 $20 \times 10^6$ 個PBMC並投與具有懸浮於50%乙醇水溶液(X w/v)中之50  $\mu$ L 2,4-二硝基苯磺酸(DNBS) (Sigma-Aldrich, 貨號556971)之灌腸劑誘導人類化小鼠IBD模型。為評估預防性設定中之工程化之T細胞,  $20 \times 10^6$ 個本文提供之工程化之T細胞在第0天用來自相同供體之PBMC共轉移。在人類化模型之治療劑設定中, 在DNBS灌腸劑當天注射PBMC並在隨後不同天轉移來自與PBMC相同之供體之 $20 \times 10^6$ 個工程化之T細胞。體重減輕20%後, 或在彼等未損失至少20%體重之既定時間下, 將小鼠安樂死, 並收集其等結腸。使用已知方法分析小鼠之結腸炎之程度。例如, 結腸炎之程度由結腸之總長度及結腸長度對重量比率確定。固定於福爾馬林中之結腸藉由結腸上皮增厚之組織學分析。使用具有CTLA4及IL10之插入與IFNG及TNFA兩者之剔除之組合之工程化之T細胞對小鼠進行預防性及治療性治療顯著減少上皮細胞之增厚。在一些實施例中, 預防性及治療性治療包括投與具有CTLA4之插入及IFNG及TNFA兩者之剔除之工程化之T細胞並顯著減少上皮細胞之增厚。在一些實施例中, 預防性及治療性治療包括投與具有IL10之插入及IFNG及TNFA兩者之剔除之工程化之T細胞並顯著減少上皮細胞之增厚。

【0307】藉由將CD45RB<sup>hi</sup> CD3+CD4+CD25- T細胞自BALB/c

(Taconic ; BALB)轉移至免疫缺陷SCID小鼠(Taconic ; CB17SC)內誘導IBD之T輔助細胞1型介導/ CD45RB<sup>hi</sup>轉移模型。結腸炎由Th1反應之發展引起，因為極化Th1細胞存在於腸道病變中。互反之CD45RB<sup>low</sup> CD4+ T細胞子集連同正常致病性CD45RB<sup>high</sup>細胞一起之共轉移防止結腸炎之發展，指示來自正常小鼠之CD45RB<sup>low</sup> CD4+子集含有一群可於腸中控制發炎反應之調節T細胞(Powrid 等人，Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C.B-17 scid mice. Int. Immunol. 5:1461-1471)。使用已知方法分離細胞群體並準備用於腹膜內注射。工程化之Treg及nTreg係如上文於實例2中製備。體重減輕20%後，或於彼等未損失至少20%體重之既定時間，將小鼠安樂死，並收集其等結腸。針對結腸炎之程度使用已知方法(諸如彼等提供於IBD之人類化小鼠模型中者)分析小鼠。用具有CTLA4及IL10之插入與IFNG及TNFA兩者之剔除組合之工程化之T細胞治療小鼠顯著減少上皮細胞增厚50%以上。在一些實施例中，預防性及治療性治療包括投與具有CTLA4之插入及IFNG及TNFA兩者之剔除之工程化之T細胞並顯著減少上皮細胞增厚50%以上。在一些實施例中，預防性及治療性治療包括投與IL10之插入及IFNG及TNFA兩者之剔除之工程化之T細胞並顯著減少上皮細胞增厚大於50%以上。治療亦減少體重損失，延長生存力。

## 【序列表】

<110> 美商英特利亞醫療公司(INTELLIA THERAPEUTICS, INC.)

<120> 工程化之T細胞

<130> 12793.0030-00270

<140> TW 110149370

<141> 2021-12-29

<150> 63/131,987

<151> 2020-12-30

<160> 149

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 1

gcaggcagga caaccuuac

20

<210> 2

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 2

caggcaggac aaccuuacu

20

<210> 3

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 3

aggagucaga ugcuguuucg

20

<210> 4

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 4

cuaaaacagg gaagcgaaaa

20

<210> 5

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 5

cgcucccug uuuuagcugc

20

<210> 6

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 6

ugucgccagc agcuaaaaca

20

<210> 7

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 7

cugucgccag cagcuaaaac

20

<210> 8

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 8

gcgacaguuc agccaucacu

20

<210> 9

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 9

acaugaacuc auccaaguga

20

<210> 10

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 10

guucauguau ugcuuugcgu

20

<210> 11

<211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成  
 寡核苷酸

<400> 11  
 gacaucaug ucuuccuuga 20

<210> 12  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成  
 寡核苷酸

<400> 12  
 ugaugguc cacacuuu 20

<210> 13  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成  
 寡核苷酸

<400> 13  
 aaagagug gagaccau 20

<210> 14  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成  
 寡核苷酸

<400> 14  
 ccagagcau caaaagagug 20

<210> 15  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 15  
gauaauggaa cucuuuucu 20

<210> 16  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 16  
cauucagaug uagcggauaa 20

<210> 17  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 17  
ugcaggucan ucagauguag 20

<210> 18  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 18

cuucuuuuac auauugggucc 20

<210> 19

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 19

ugcaucguuu ugguucucu 20

<210> 20

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 20

uuucagcucu gcaucguuuu 20

<210> 21

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 21

uuuucagcuc ugcaucguuu 20

<210> 22

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 22  
ugagcacuga aagcaugauc 20

<210> 23  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 23  
ugaaagcaug auccgggacg 20

<210> 24  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 24  
caugauccgg gacguggagc 20

<210> 25  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 25  
cuucuugggg agcgccuccu 20

<210> 26  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 26

gagcgcucc ccaagaagac

20

<210> 27

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 27

aggcgcuccc caagaagaca

20

<210> 28

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 28

ggcgcucccc aagaagacag

20

<210> 29

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 29

gcgcucceca agaagacagg

20

<210> 30

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 30

caagaagaca ggggggcccc

20

<210> 31

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 31

ggggcccccc ugucuuuug

20

<210> 32

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 32

cuggggcccc ccugucuucu

20

<210> 33

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 33

aagcaccgcc uggagcccug

20

<210> 34

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 34

caagcaccgc cuggagccu

20

<210> 35

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 35

gcugaggaac aagcaccgcc

20

<210> 36

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 36

ccucuucc uuccugaucg

20

<210> 37

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 37

uucuccuucc ugaucguggc

20

<210> 38  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 38  
ggcgccugcc acgaucagga 20

<210> 39  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 39  
ugguggcgcc ugccacgauc 20

<210> 40  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 40  
cugcugcacu uuggagugau 20

<210> 41  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 41  
cgaucacucc aaagucagc 20

<210> 42  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 42  
uuggagugau cgccccccag 20

<210> 43  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 43  
uggagugauc ggcccccaga 20

<210> 44  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 44  
aggcacucac cucuuccuc 20

<210> 45  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 45 ugauuagaga gagguccug	20
<210> 46 <211> 20 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成 寡核苷酸	
<400> 46 cugauuagag agagguccu	20
<210> 47 <211> 20 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成 寡核苷酸	
<400> 47 gcugauuaga gagagucc	20
<210> 48 <211> 20 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成 寡核苷酸	
<400> 48 ccucucucua aucagcccuc	20
<210> 49 <211> 20 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成	

## 寡核苷酸

&lt;400&gt; 49

ccagagggcu gauuagagag

20

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

&lt;400&gt; 50

ucuaaucagc ccucuggccc

20

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

&lt;400&gt; 51

uacugacugc cugggccaga

20

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

&lt;400&gt; 52

uuacugacug ccugggccag

20

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 53

gagacacuua cugacugccu

20

<210> 54

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 54

ggagacacuu acugacugcc

20

<210> 55

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 55

gggcuacagg cuugucacuc

20

<210> 56

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 56

ugggcuacag gcuugucacu

20

<210> 57

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 57

uuaccuacaa caugggcuaac

20

<210> 58

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 58

agagcucuua ccuacaacau

20

<210> 59

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 59

cagagcucuu accuacaaca

20

<210> 60

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 60

uccagcaaac ccucaagcug

20

<210> 61

<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 61  
cagcaaacc ucaagcugag 20

<210> 62  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 62  
ggagcugccc cucagcuuga 20

<210> 63  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 63  
uggagcugcc ccucagcuug 20

<210> 64  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 64  
agcuccagug gcugaaccgc 20

<210> 65  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 65  
gcuccagugg cugaaccgcc 20

<210> 66  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 66  
uggcccggcg guucagccac 20

<210> 67  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 67  
ccgccgggcc aaugcccucc 20

<210> 68  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 68

ccaggagggc auuggcccgg

20

<210> 69

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 69

gccaaugccc uccuggccaa

20

<210> 70

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 70

gccauuggcc aggaggcga

20

<210> 71

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 71

ugcccuccug gccaauggcg

20

<210> 72

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 72  
gcuccacgcc auuggccagg 20

<210> 73  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 73  
ucagcuccac gccauuggcc 20

<210> 74  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 74  
aucucucagc uccacgccau 20

<210> 75  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 75  
ggagcugaga gauaaccagc 20

<210> 76  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 76

gcugagagau aaccagcugg

20

<210> 77

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 77

ccagcuggug gugccaucag

20

<210> 78

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 78

cagcuggugg ugccaucaga

20

<210> 79

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 79

augagguaca ggcccucuga

20

<210> 80

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 80

ccugggagua gaugagguac

20

<210> 81

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 81

uacucccagg uccucucaa

20

<210> 82

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 82

cuuggccuu gaagaggacc

20

<210> 83

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 83

ggcgaugcgg cugauggugu

20

<210> 84

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 84

cggcgaugcg gcugauggug

20

<210> 85

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 85

ggagacggcg augcggcuga

20

<210> 86

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 86

ucugguagga gacggcgaug

20

<210> 87

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 87

cgccgucucc uaccagacca

20

<210> 88  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 88  
gagguugacc uuggucuggu 20

<210> 89  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 89  
ggcagagagg agguugaccu 20

<210> 90  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 90  
ccaUCAAGAG cccCUGCCAG 20

<210> 91  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 91  
caUCAAGAG cccCUGCCAGA 20

<210> 92  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 92  
cuggggucuc ccucuggcag 20

<210> 93  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 93  
ucuggggucu cccucuggca 20

<210> 94  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 94  
gaugggcuca uaccaggcgu 20

<210> 95  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 95  
cugguaugag cccaucuauc 20

<210> 96  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 96  
agauagaugg gcucuaacca 20

<210> 97  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 97  
ugguaugagc ccaucuaucu 20

<210> 98  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 98  
cagauagaug ggcucuaacc 20

<210> 99  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成

## 寡核苷酸

&lt;400&gt; 99

augagcccau cuaucuggga

20

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

&lt;400&gt; 100

ugagcccauc uaucugggag

20

&lt;210&gt; 101

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

&lt;400&gt; 101

aagaccccuc ccagauagau

20

&lt;210&gt; 102

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

&lt;400&gt; 102

gucggucacc cuuccaccgc

20

&lt;210&gt; 103

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 103

gacucagcgc ugagaucaau

20

<210> 104

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 104

gauugaucuc agcgcugagu

20

<210> 105

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 105

ucggcaaagu cgagauaguc

20

<210> 106

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 106

cucggcaaag ucgagauagu

20

<210> 107

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 107

uauucugacu uugccgaguc

20

<210> 108

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 108

aucucgacuu ugccgagucu

20

<210> 109

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 109

cgacuuugcc gagucugggc

20

<210> 110

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 110

gagucugggc aggucuacuu

20

<210> 111

<211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成  
 寡核苷酸

<400> 111  
 agucugggca ggucuacuuu 20

<210> 112  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成  
 寡核苷酸

<400> 112  
 aaaguagacc ugcccagacu 20

<210> 113  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成  
 寡核苷酸

<400> 113  
 gganguucgu ccuccucaca 20

<210> 114  
 <211> 4140  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成  
 聚核苷酸

<400> 114  
 auggacaaga aguacuccau cggccuggac aucggcacca acuccguggg cugggccgug 60

aucaccgacg aguacaaggu gccuccaag aaguucaagg ugcugggcaa caccgaccgg	120
cacuccauca agaagaaccu gaucggcgcc cugcuguucg acuccggcga gaccgccgag	180
gccacccggc ugaagcggac cgcccggcgg cgguacaccc ggcggaagaa ccggaucugc	240
uaccugcagg agaucuucuc caacgagaug gccaaaggug acgacuuccu cuuccaccgg	300
cuggaggagu ccuuccuggu ggaggaggac aagaagcacg agcggcacc caucuucggc	360
aacaucgugg acgagguggc cuaccacgag aaguacccca ccaucuacca ccugcggaag	420
aagcuggugg acuccaccga caaggccgac cugcggcuga ucuaccuggc ccuggcccac	480
augaucaagu uccggggcca cuuccugauc gaggggcacc ugaaccccg caacuccgac	540
guggacaagc uguucaucca gcuggugcag accuacaacc agcuguucga ggagaacccc	600
aucaacgccu ccggcgugga cgccaaggcc auccuguccg cccggcuguc caagucccgg	660
cggcuggaga accugaucgc ccagcugccc ggcgagaaga agaaccggccu guucggcaac	720
cugaucgccc ugucccuggg ccugaccccc aacuucaagu ccaacuucga ccuggccgag	780
gacccaagc ugcagcuguc caaggacacc uacgacgacg accuggacaa ccugcuggcc	840
cagaucggcg accaguacgc cgaccuguuc cuggcccgca agaaccuguc cgacgccauc	900
cugcuguccg acauccugcg ggugaacacc gagaucacca aggccccccu guccgccucc	960
augaucaagc gguacgacga gcaccaccag gaccugaccc ugcugaaggc ccuggugcgg	1020
cagcagcugc ccgagaagua caaggagauc uucuuacgacc aguccaagaa cggcuacgcc	1080
ggcuacaucg acggcggcgc cucccaggag gaguucuaca aguucauca gcccauccug	1140
gagaagaugg acggcaccga ggagcugcug gugaagcuga accgggaggga ccugcugcgg	1200
aagcagcggga ccuucgacaa cggcucauc cccaccaga uccaccuggg cgagcugcac	1260
gccauccugc ggcggcaggga ggacuucuac cccuuccuga aggacaaccg ggagaagauc	1320
gagaagaucg ugaccuuccg gaucccuac uacgugggcc cccuggcccg gggcaacucc	1380
cgguucgccu ggaugacccg gaaguccgag gagaccauca ccccuuggaa cuucgaggag	1440
gugguggaca agggcgccuc cgcccagucc uucaucgagc ggaugaccaa cuucgacaag	1500
aaccugccca acgagaaggu gcugcccaag cacucccugc uguacgagua cuucaccgug	1560

uacaacgagc ugaccaaggu gaaguacgug accgaggga ugcggaagcc cgccuuccug	1620
uccggcgagc agaagaaggc caucguggac cugcuguuca agaccaaccg gaaggugacc	1680
gugaagcagc ugaaggagga cuacuucaag aagaucgagu gcuucgacuc cguggagauc	1740
uccggcgugg aggaccgguu caacgccucc cugggcaccu accacgaccu gcugaagauc	1800
aucaaggaca aggacuuccu ggacaacgag gagaacgagg acauccugga ggacaucgug	1860
cugaccuga cccuguuca ggaccgggag augaucgagg agcggcugaa gaccuacgcc	1920
caccuguucg acgacaaggu gaugaagcag cugaagcggc ggcgguacac cggcuggggc	1980
cggcuguccc ggaagcugau caacggcauc cgggacaagc aguccggcaa gaccauccug	2040
gacuuccuga aguccgacgg cuucgccaac cggaaucuca ugcagcugau ccacgacgac	2100
ucccugaccu ucaaggagga cauccagaag gcccaggugu ccggccaggg cgacucccug	2160
cacgagcaca ucgccaaccu ggccggcucc cccgccauca agaagggcua ccugcagacc	2220
gugaaggugg uggacgagcu ggugaaggug augggcccgc acaagcccga gaacaucgug	2280
aucgagaugg cccgggagaa ccagaccacc cagaagggcc agaagaacuc ccgggagcgg	2340
augaagcggga ucgaggaggg caucaaggag cugggcuccc agauccugaa ggagcaccac	2400
guggagaaca cccagcugca gaacgagaag cuguaccugu acuaccugca gaacggccgg	2460
gacauguacg uggaccagga gcuggacauc aaccggcugu ccgacuacga cguggaccac	2520
aucgugccc aguccuuccu gaaggacgac uccaucgaca acaaggugcu gaccggucc	2580
gacaagaacc ggggcaaguc cgacaacgug cccuccgagg agguggugaa gaagaugaag	2640
aacuacuggc ggcagcugcu gaacgccaag cugaucacc agcgggaaguu cgacaaccug	2700
accaaggccg agcggggcgg ccuguccgag cuggacaagg ccggcuucau caagcggcag	2760
cugguggaga cccggcagau caccaagcac guggcccaga uccuggacuc ccggaugaac	2820
accaaguacg acgagaacga caagcugauc cgggagguga aggugaucac ccugaagucc	2880
aagcuggugu ccgacuuccg gaaggacuuc caguucuaca aggugcggga gaucaacaac	2940
uaccaccagc cccacgacgc cuaccugaac gccguggugg gcaccgccu gaucaagaag	3000
uacccaagc uggaguccga guucguguac ggcgacuaca agguuacga cgugcggag	3060

augaucgcca aguccgagca ggagaucggc aagggccaccg ccaaguacuu cuucacucc 3120  
 aacaucauga acuucuuaa gaccgagauc acccuggcca acggcgagau ccggaagcgg 3180  
 cccucgaucg agaccaacgg cgagaccggc gagaucgugu gggacaaggg ccgggacuuc 3240  
 gccaccgugc ggaaggugcu guccaugccc caggugaaca ucgugaaga gaccgaggug 3300  
 cagaccggcg gcuucuccaa ggaguccauc cugcccaagc ggaacuccga caagcugauc 3360  
 gcccgggaaga aggacuggga ccccaagaag uacggcggc ucgacucucc caccugggcc 3420  
 uacuccgugc uggugguggc caagguggag aagggaagu ccaagaagcu gaaguccgug 3480  
 aaggagcugc ugggcaucac caucauggag cgguccuccu ucgagaaga ccccaucgac 3540  
 uuccuggagg ccaagggcua caaggaggug aagaaggacc ugaucauca gcugcccaag 3600  
 uacucccugu ucgagcugga gaacggccgg aagcggaugc uggccuccgc cggcgagcug 3660  
 cagaagggca acgagcuggc ccugccucc aaguacguga acuuccugua ccugccucc 3720  
 cacuacgaga agcugaaggc cucccccag gacaacgagc agaagcagcu guucguggag 3780  
 cagcacaagc acuaccugga cgagaucauc gagcagaucu ccgaguucuc caagcgggug 3840  
 auccuggccg acgccaaccu ggacaaggug cuguccgccu acaacaagca ccgggacaag 3900  
 cccauccggg agcaggccga gaacaucauc caccuguuca ccugacca cugggcgcc 3960  
 cccgccgccu ucaaguacuu cgacaccacc aucgaccgga agcgguacac cuccaccaag 4020  
 gaggugcugg acgccaccu gauccaccag uccaucaccg gccuguacga gaccgggauc 4080  
 gaccugucc agcuggggcg cgacggcggc ggcucuccca agaagaagc gaagguguga 4140

<210> 115

<211> 1379

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
多肽

<400> 115

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  
 145 150 155 160

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  
 225 230 235 240

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  
 305 310 315 320

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  
 385 390 395 400

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  
 465 470 475 480

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  
 545 550 555 560

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  
 625 630 635 640

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  
 705 710 715 720

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

1010	1015	1020
Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly	Lys Ala Thr Ala Lys	Tyr Phe Phe
1025	1030	1035
Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe	Phe Lys Thr Glu Ile	Thr Leu Ala
1040	1045	1050
Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg	Pro Leu Ile Glu Thr	Asn Gly Glu
1055	1060	1065
Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp	Lys Gly Arg Asp Phe	Ala Thr Val
1070	1075	1080
Arg Lys Val Leu Ser Met Pro	Gln Val Asn Ile Val	Lys Lys Thr
1085	1090	1095
Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe	Ser Lys Glu Ser Ile	Leu Pro Lys
1100	1105	1110
Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile	Ala Arg Lys Lys Asp	Trp Asp Pro
1115	1120	1125
Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp	Ser Pro Thr Val Ala	Tyr Ser Val
1130	1135	1140
Leu Val Val Ala Lys Val Glu	Lys Gly Lys Ser Lys	Lys Leu Lys
1145	1150	1155
Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly	Ile Thr Ile Met Glu	Arg Ser Ser
1160	1165	1170
Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp	Phe Leu Glu Ala Lys	Gly Tyr Lys
1175	1180	1185
Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile	Ile Lys Leu Pro Lys	Tyr Ser Leu
1190	1195	1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly  
 1205 1210 1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val  
 1220 1225 1230

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  
 1250 1255 1260

His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys  
 1265 1270 1275

Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala  
 1280 1285 1290

Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn  
 1295 1300 1305

Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala  
 1310 1315 1320

Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser  
 1325 1330 1335

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr  
 1340 1345 1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp  
 1355 1360 1365

Gly Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
 1370 1375

&lt;210&gt; 116

&lt;211&gt; 4140

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列之描述：合成

聚核苷酸

&lt;400&gt; 116

auggacaaga aguacagcau cggacuggac aucggaaca acagcgucgg augggcaguc	60
aucacagacg aauacaaggu cccgagcaag aaguucaagg uccugggaaa cacagacaga	120
cacagcauca agaagaaccu gaucggagca cugcuguucg acagcggaga aacagcagaa	180
gcaacaagac ugaagagaac agcaagaaga agauacaca gaagaaaga cagaaucugc	240
uaccugcagg aaauucucag caacgaaaug gcaaaggucg acgacagcuu cuuccacaga	300
cuggaagaaa gcuuccuggu cgaagaagac aagaagcacg aaagacacc gaucuucgga	360
aacaucgucg acgaagucgc auaccacgaa aaguaccgca caaucuacca ccugagaaag	420
aagcuggucg acagcacaga caaggcagac cugagacuga ucuaccuggc acuggcacac	480
augaucaagu ucagaggaca cuuccugauc gaaggagacc ugaaccgga caacagcgac	540
gucgacaagc uguucaucca gcugguccag acauacaacc agcuguucga agaaaaccg	600
aucaacgcaa gcggagucga cgcaaaggca auccugagcg caagacugag caagagcaga	660
agacuggaaa accugaucgc acagcugccg ggagaaaaga agaacggacu guucggaaac	720
cugaucgcac ugagccuggg acugacaccg aacucaaga gcaacuucga ccuggcagaa	780
gacgcaaagc ugcagcugag caaggacaca uacgacgacg accuggaaa ccugcuggca	840
cagaucggag accaguacgc agaccuguuc cuggcagcaa agaaccugag cgacgcaauc	900
cugcugagcg acauccugag agucaacaca gaaaucaca aggcaccgcu gagcgcgaagc	960
augaucaaga gauacgacga acaccaccag gaccugacac ugcugaaggc acuggucaga	1020
cagcagcugc cggaaaagua caaggaaauc uucucgacc agagcaagaa cggauacgca	1080
ggauacaucg acggaggagc aagccaggaa gaaucuaca aguucauca gccgauccug	1140
gaaaagaugg acggaacaga agaacugcug gucaagcuga acagagaaga ccugcugaga	1200
aagcagagaa cauucgaca cggaaagcauc ccgaccaga uccaccuggg agaacugcac	1260

gcaauccuga gaagacagga agacuucua cccuuccuga aggacaacag agaaaagauc	1320
gaaaagauc ugacauucag aaucuccuac uacgucggac cgcuggcaag aggaaacagc	1380
agauucgcau ggaugacaag aaagagcgaa gaaacaauca caccguggaa cuucgaagaa	1440
gucgucgaca agggagcaag cgcacagagc uucaucgaaa gaaugacaaa cuucgacaag	1500
aaccugccga acgaaaaggu ccugccgaag cacagccugc uguacgaaua cuucacaguc	1560
uacaacgaac ugacaaaggu caaguacguc acagaaggaa ugagaaagcc ggcauuccug	1620
agcggagaac agaagaaggc aaucgucgac cugcuguuca agacaaacag aaaggucaca	1680
gucaagcagc ugaaggaaga cuacuucaag aagaucgaa gcuucgacag cgucgaauc	1740
agcggagucg aagacagauu caacgcaagc cugggaacau accacgaccu gcugaagauc	1800
aucaaggaca aggacuuccu ggacaacgaa gaaaacgaag acauccugga agacaucguc	1860
cugacacuga cacuguucga agacagagaa augaucgaag aaagacugaa gacauacgca	1920
caccuguucg acgacaaggu caugaagcag cugaagagaa gaagauacac aggaugggga	1980
agacugagca gaaagcugau caacggaauc agagacaagc agagcggaaa gacaauccug	2040
gacuuccuga agagcgacgg auucgcaaac agaaacuua ugcagcugau ccacgacgac	2100
agccugacau ucaaggaaga cauccagaag gcacagguca gcggacaggg agacagccug	2160
cacgaacaca ucgcaaaccu ggaggaagc ccggcaauca agaagggaau ccugcagaca	2220
gucaaggucg ucgacgaacu ggucaagguc augggaagac acaagccgga aaacaucguc	2280
aucgaaaugg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag cagagaaaga	2340
augaagagaa ucgaagaagg aaucaaggaa cugggaagcc agauccugaa ggaacacccg	2400
gucgaaaaca cacagcugca gaacgaaaag cuguaccugu acuaccugca gaacggaaga	2460
gacauguacg ucgaccagga acuggacauc aacagacuga gcgacuacga cgucgaccac	2520
aucgucccg agagcuuccu gaaggacgac agcaucgaca acaagguccu gacaagaagc	2580
gacaagaaca gaggaagag cgacaacguc ccgagcgaag aagucgucaa gaagaugaag	2640
aacuacugga gacagcugcu gaacgcaag cugaucacac agagaaaguu cgacaaccug	2700
acaaaggcag agagaggagg acugagcgaa cuggacaagg caggauucau caagagacag	2760

cuggucgaaa caagacagau cacaaagcac gucgcacaga uccuggacag cagaauaac 2820  
acaaaguacg acgaaaacga caagcugauc agagaaguca aggucaucac acugaagagc 2880  
aagcugguca gcgacuucag aaaggacuuc caguucuaca aggucaagaga aaucacaac 2940  
uaccaccacg cacacgacgc auaccugaac gcagucgucg gaacagcacu gaucaagaag 3000  
uacccgaagc uggaaagcga auucgucuac ggagacuaca agguacuacga cgucagaaag 3060  
augaucgcaa agagcgaaca ggaaaucgga aaggcaacag caaaguacuu cuucuacagc 3120  
aacaucauga acuuuucaa gacagaaauc acacuggcaa acggagaaau cagaaagaga 3180  
ccgcugaucg aaacaaacgg agaaacagga gaaaucgucu gggacaaggg aagagacuuc 3240  
gcaacaguca gaaagguccu gagcaugccg caggucaaca ucgucaagaa gacagaaguc 3300  
cagacaggag gauucagcaa ggaaagcauc cugccgaaga gaaacagcga caagcugauc 3360  
gcaagaaaga aggacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgacagccc gacagucgca 3420  
uacagcgucc uggucgucg aaaggucgaa aagggaaaga gcaagaagcu gaagagcguc 3480  
aaggaaucg ugggaaucac aaucauggaa agaagcagcu ucgaaaagaa cccgaucgac 3540  
uuccuggaag caaagggaau caaggaaguc aagaaggacc ugaucauca gcuGCCgaag 3600  
uacagccugu ucgaacugga aaacggaaga aagagaauGC uggcaagcgc aggagaacug 3660  
cagaaggga acgaacuggc acugccgagc aaguacguca acuuccugua ccuggcaagc 3720  
cacuacgaaa agcugaaggg aagcccgga gacaacgaac agaagcagcu guucgucgaa 3780  
cagcacaagc acuaccugga cgaaaucauc gaacagauca gcgaaucag caagagaguc 3840  
auccuggcag acgcaaaccu ggacaagguc cugagcgcau acaacaagca cagagacaag 3900  
ccgaucagag aacaggcaga aaacaucauc caccuguuca cacugacaaa ccugggagca 3960  
ccgcagcau ucaaguacuu cgacacaaca aucgacagaa agagauacac aagcacaag 4020  
gaaguccug acgcaacacu gauccaccag agcaucacag gacuguacga aacaagauc 4080  
gaccugagcc agcugggagg agacggagga ggaagcccga agaagaagag aaaggucuag 4140

<210> 117

<211> 4197

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列之描述：合成

聚核苷酸

&lt;400&gt; 117

auggacaaga aguacuccau cggccuggac aucggcacca acuccguggg cugggccgug	60
aucaccgacg aguacaaggu gcccuccaag aaguucaagg ugcugggcaa caccgaccgg	120
cacuccauca agaagaaccu gaucggcgcc cugcuguucg acuccggcga gaccgccgag	180
gccacccggc ugaagcggac cgcccggcgg cgguacacc ggcygaaga ccggaucugc	240
uaccugcagg agaucuucuc caacgagaug gccaaaggugg acgacuccuu cuuccaccgg	300
cuggaggagu ccuuccuggu ggaggaggac aagaagcacg agcggcacc caucuucggc	360
aacaucgugg acgagguggc cuaccacgag aaguaccca ccaucuacca ccugcggaa	420
aagcuggugg acuccaccga caaggccgac cugcggcuga ucuaccuggc ccuggcccac	480
augaucaagu uccggggcca cuuccugauc gagggcgacc ugaaccccga caacuccgac	540
guggacaagc uguucaucca gcuggugcag accuacaacc agcuguucga ggagaacccc	600
aucaacgccu ccggcuguga cgccaaggcc auccuguccg cccggcuguc caagucccgg	660
cggcuggaga accugaucgc ccagcugccc ggcgagaaga agaacggccu guucggcaac	720
cugaucgccc ugucccuggg ccugaccccc aacucaagu ccaacuucga ccuggccgag	780
gacccaagc ugcagcuguc caaggacacc uacgacgacg accuggacaa ccugcuggcc	840
cagaucggcg accaguacgc cgaccuguuc cuggccgcca agaaccuguc cgacccauc	900
cugcuguccg acauccugcg ggugaacacc gagaucacca aggcccccu guccgccucc	960
augaucaagc gguacgacga gcaccaccag gaccugacc ugcugaaggc ccuggugcgg	1020
cagcagcugc ccgagaagua caaggagauc uucuuacgacc aguccaaga cggcuaacgc	1080
ggcuacaucg acggcggcgc cucccaggag gaguucuaca aguucauaa gcccauccug	1140
gagaagaugg acggcaccga ggagcugcug gugaagcuga accgggagga ccugcugcgg	1200
aagcagcga ccuucgaaa cggcucauc cccaccaga uccaccuggg cgagcugcac	1260

gccauccugc	ggcggcagga	ggacuucua	cccuuccuga	aggacaaccg	ggagaagauc	1320
gagaagaucc	ugaccuuccg	gaucuuuac	uacgugggcc	ccuuggccc	gggcaacucc	1380
cgguucgccu	ggauagccc	gaaguccgag	gagaccauca	ccccuggaa	cuucgaggag	1440
gugguggaca	agggcgccuc	cgcccagucc	uucaucgagc	ggauagccaa	cuucgacaag	1500
aaccugccca	acgagaaggu	gcugcccaag	cacucccugc	uguacgagua	cuucaccgug	1560
uacaacgagc	ugaccaaggu	gaaguacgug	accgagggca	ugcggaaagcc	cgccuuccug	1620
uccggcgagc	agaagaaggc	caucguggac	cugcuguuca	agaccaaccg	gaaggugacc	1680
gugaagcagc	ugaaggagga	cuacuuaag	aagaucgagu	gcuucgacuc	cguggagauc	1740
uccggcgugg	aggaccgguu	caacgccucc	cugggcaccu	accacgaccu	gcugaagauc	1800
aucaaggaca	aggacuuccu	ggacaacgag	gagaacgagg	acauccugga	ggacaucgug	1860
cugaccucga	cccuuuucga	ggaccgggag	augaucgagg	agcggcugaa	gaccuacgcc	1920
caccuguucg	acgacaaggu	gaugaagcag	cugaagcggc	ggcgguacac	cgucuggggc	1980
cggcuguccc	ggaagcugau	caacggcauc	cgggacaagc	aguccggcaa	gaccauccug	2040
gacuuccuga	aguccgacgg	cuucgccaac	cggaacuuca	ugcagcugau	ccacgacgac	2100
ucccugaccu	ucaaggagga	cauccagaag	gcccaggugu	ccggccaggg	cgacuuccug	2160
cacgagcaca	ucgccaaccu	ggccggcucc	cccgccauca	agaagggcac	ccugcagacc	2220
gugaaggugg	uggacgagcu	ggugaaggug	augggccggc	acaagcccga	gaacaucgug	2280
aucgagaugg	cccgggagaa	ccagaccacc	cagaagggcc	agaagaacuc	ccgggagcgg	2340
augaagcggga	ucgaggaggg	caucaaggag	cugggcuccc	agauccugaa	ggagcacccc	2400
guggagaaca	cccagcugca	gaacgagaag	cuguaccugu	acuaccugca	gaacggccgg	2460
gacauguacg	uggaccagga	gcuggacauc	aaccggcugu	ccgacuacga	cguggaccac	2520
aucgugcccc	aguccuuccu	gaaggacgac	uccaucgaca	acaaggugcu	gaccggucc	2580
gacaagaacc	ggggcaaguc	cgacaacgug	ccuuccgagg	agguiggugaa	gaagaugaag	2640
aacuacuggc	ggcagcugcu	gaacgccaa	cugaucaccc	agcggaaugu	cgacaaccug	2700
accaaggccc	agcggggcgg	ccuguccgag	cuggacaagg	ccggcuucau	caagcggcag	2760

cugguggaga cccgacagau caccaagcac guggcccaga uccuggacuc ccggaugaac	2820
accaaguacg acgagaacga caagcugauc cgggagguga agguaucac ccugaagucc	2880
aagcuggugu ccgacuuccg gaaggacuuc caguucuaca agguccggga gaucaacaac	2940
uaccaccacg cccacgacgc cuaccugaac gccguggugg gcaccgcccu gaucaagaag	3000
uacccaagc uggaguccga guucguuac ggcgacuaca agguuacga cguccggaag	3060
augaucgcca aguccgagca ggagaucggc aaggccaccg ccaaguacuu cuucuacucc	3120
aacaucauga acuuuucuaa gaccgagauc acccuggcca acggcagau ccggaagcgg	3180
ccccugaucg agaccaacgg cgagaccggc gagaucgugu gggacaaggg ccgggacuuc	3240
gccaccgugc ggaaggugcu guccaugccc caggugaaca ucgugaaga gaccgaggug	3300
cagaccggcg gcuucuccaa ggaguccauc cugcccaagc ggaacuccga caagcugauc	3360
gcccgggaaga aggacuggga cccaagaag uacggcggcu ucgacucucc caccugggcc	3420
uacuccgugc uggugguggc caagugggag aaggccaagu ccaagaagcu gaaguccgug	3480
aaggagcugc ugggcaucac caucauggag cgguccuccu ucgagaaga cccaucgac	3540
uuccuggagg ccaaggguca caaggaggug aagaaggacc ugaucauca gcucccgaag	3600
uacucccugu ucgagcugga gaacggccgg aagcggauc uggccuccg cggcagcug	3660
cagaagggca acgagcuggc ccugccucc aaguacguga acuuccugua ccugccucc	3720
cacuacgaga agcugaaggg cuccccgag gacaacgag agaagcagcu guucugggag	3780
cagcacaagc acuaccugga cgagaucauc gagcagaucu ccgaguucuc caagcgggug	3840
auccuggccg acgccaaccu ggacaaggug cuguccgccu acaacaagca ccgggacaag	3900
cccauccggg agcagggcga gaacaucauc caccuguuca ccugacca ccuaggcgc	3960
cccggcccu ucaaguacuu cgacaccacc aucgaccgga agcgguacac succaccaag	4020
gaggugcugg acgccaccu gauccaccag uccaucaccg gccuguacga gaccggauc	4080
gaccugucc agcuggggc cgacggcggc ggcucuccca agaagaagc gaaggugucc	4140
gaguccgcca cccccgaguc cguguccggc uggcggcugu ucaagaagau succuga	4197

&lt;210&gt; 118

&lt;211&gt; 1398

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列之描述：合成  
多肽

&lt;400&gt; 118

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val  
1 5 10 15Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe  
20 25 30Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile  
35 40 45Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu  
50 55 60Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys  
65 70 75 80Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser  
85 90 95Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys  
100 105 110His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr  
115 120 125His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp  
130 135 140Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His  
145 150 155 160

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  
 225 230 235 240

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  
 305 310 315 320

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  
385 390 395 400

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  
465 470 475 480

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  
545 550 555 560

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  
 625 630 635 640

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  
 705 710 715 720

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  
 1010 1015 1020

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe  
 1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala  
 1040 1045 1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu  
 1055 1060 1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val  
 1070 1075 1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr  
 1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys  
 1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro  
 1115 1120 1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val  
 1130 1135 1140

Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys  
 1145 1150 1155

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser  
1160 1165 1170

Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys  
1175 1180 1185

Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu  
1190 1195 1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly  
1205 1210 1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val  
1220 1225 1230

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  
1250 1255 1260

His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys  
1265 1270 1275

Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala  
1280 1285 1290

Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn  
1295 1300 1305

Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala  
1310 1315 1320

Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser  
1325 1330 1335

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr

1340

1345

1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp  
 1355 1360 1365

Gly Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser Glu Ser Ala  
 1370 1375 1380

Thr Pro Glu Ser Val Ser Gly Trp Arg Leu Phe Lys Lys Ile Ser  
 1385 1390 1395

&lt;210&gt; 119

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列之描述：合成  
 聚核苷酸

&lt;400&gt; 119

ccagagcauc caaaagagug guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

&lt;210&gt; 120

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列之描述：合成  
 聚核苷酸

&lt;400&gt; 120

agagcucuua ccuacaacau guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

&lt;210&gt; 121

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列之描述：合成  
聚核苷酸

&lt;400&gt; 121

gaucacgucg gccguuggcg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

&lt;210&gt; 122

&lt;211&gt; 534

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 122

atgcacagct cagcaactgct ctgttgctg gtctctctga ctggggtgag ggccagccca 60

ggccagggca cccagctctga gaacagctgc acccaacttc caggcaacct gcctaactg 120

cttcgagatc tccgagatgc cttcagcaga gtgaagactt tctttcaat gaaggatcag 180

ctggacaact tgtttgtaaa ggagtccttg ctggaggact ttaagggtta cctgggttgc 240

caagccttgt ctgagatgat ccagttttac ctggaggagg tgatgccccca agctgagaac 300

caagaccag acatcaaggc gcatgtgaac tccttggggg agaacctgaa gaccctcagg 360

ctgaggctac ggcgctgtca tcgatttctt cctctgtgaaa acaagagcaa ggccgtggag 420

caggtgaaga atgcctttaa taagctccaa gagaaaggca tctacaaagc catgagtgag 480

tttgacatct tcatcaacta catagaagcc tacatgacaa tgaagatacg aaac 534

&lt;210&gt; 123

&lt;211&gt; 534

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列之描述：合成  
聚核苷酸

&lt;400&gt; 123

atgcacagct cagcaactgct ctgttgctg gtctctctga ctggggtgag ggccagccca 60

ggccagggca cccagctctga gaacagctgc acccaacttc caggcatcct gcctaactg 120

cttcgagatc tccgagatgc cttcagcaga gtgaagactt tctttcaat gaaggatcag 180

ctggacaact tgttgtaaa ggagtccttg ctggaggact ttaagggtta cctgggttgc 240  
caagccttgt ctgagatgat ccagttttac ctggaggagg tgatgcccc a gctgagaac 300  
caagaccag acatcaaggc gcatgtgac tcctggggg agaacctgaa taccctcagg 360  
ctgaggctac ggcgctgtca tcgactcctt cctgtgaaa acaagagcaa ggccgtggag 420  
caggatgaaga atgcctttaa taagctccaa gagaaaggca tctacaaagc catgagtgag 480  
tttgacatct tcatcaacta catagaagcc tacatgacaa tgaagatacg aaac 534

<210> 124

<211> 178

<212> PRT

<213> 智人

<400> 124

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val  
1 5 10 15

Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His  
20 25 30

Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe  
35 40 45

Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu  
50 55 60

Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys  
65 70 75 80

Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro  
85 90 95

Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu  
100 105 110

Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg  
115 120 125

Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn  
 130 135 140

Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu  
 145 150 155 160

Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile  
 165 170 175

Arg Asn

<210> 125

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
 多肽

<400> 125

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val  
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His  
 20 25 30

Phe Pro Gly Ile Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe  
 35 40 45

Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu  
 50 55 60

Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys  
 65 70 75 80

Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro  
 85 90 95

Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Ile Ser Leu  
 100 105 110

Gly Glu Asn Leu Asn Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg  
 115 120 125

Leu Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn  
 130 135 140

Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu  
 145 150 155 160

Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile  
 165 170 175

Arg Asn

<210> 126  
 <211> 669  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 126  
 atggcctgct tgggcttcca aaggcataaa gccagctta atcttgctac tcgcacgtgg 60  
 ccctgcacat tgctcttttt cctcctgttc attcccgtgt ttgcaaggc gatgcatgtg 120  
 gcacaacctg ccgtcgttct ggcatcatca agaggattg ctagcttcgt ttgtgagtac 180  
 gcctcccctg gaaaagcgcac ggaggtgcmc gtcactgtat tgcggcaagc cgacagccaa 240  
 gttactgaag tctgcgcggc aacgtatatg atgggcaatg agctgacatt ccttgacgat 300  
 tcaatctgca cgggaacaag tagtggtaac caggtgaatc tcaactattca aggtctgaga 360  
 gccatggaca ccggcctcta catttgtaag gtggagctga tgtatcctcc cccatattat 420  
 ctggggatcg gaaatgggac acagatatat gtatttgatc ccgagccatg tcccgatagt 480  
 gacttctct tgtggatact tgccgctgtg agcagtggtt tgtttttta ttcattctc 540

cttacggcag tatacatttc aaaaatgctc aagaagcgaa gtcctttgac aactggcgta 600  
tatgtcaaaa tgccaccaac agagcccgaa tgtgagaaac agttccagcc gtactttatt 660  
cctataaac 669

<210> 127

<211> 669

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
聚核苷酸

<400> 127

atggcctgct tgggcttcca aaggcataaa gccagctta atcttgctac tcgcacgtgg 60  
ccctgcacat tgctcttttt cctcctgttc attcccgtgt ttgcaaggc gatgcatgtg 120  
gcacaacctg ccgtcgttct ggcatcatca agaggtattg ctagcttcgt ttgtgagtac 180  
gcctcccctg gaaaatacac ggaggtgctc gtcactgtat tgcggcaagc cgacagccaa 240  
gttactgaag tctgcgcggc aacgtatatg atgggcaatg agctgacatt ccttgacgat 300  
tcaatctgca cgggaacaag tagtggtaac caggtgaatc tcaactattca aggtctgaga 360  
gccatggaca ccggcctcta cttttgtaag gtggagctga tgtatcctcc cccatattat 420  
gaggggatcg gaaatgggac acagatatat gtatttgatc ccgagccatg tcccgatagt 480  
gacttctct tgtggatact tgccgctgtg agcagtggtt tgtttttta ttcattcctc 540  
cttacggcag tatacatttc aaaaatgctc aagaagcgaa gtcctttgac aactggcgta 600  
tatgtcaaaa tgccaccaac agagcccgaa tgtgagaaac agttccagcc gtactttatt 660  
cctataaac 669

<210> 128

<211> 669

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
聚核苷酸

<400> 128  
atggcctgct tgggcttcca aaggcataaa gccagccta atcttgctac tcgcacgtgg 60  
ccctgcacat tgctcttttt cctcctgttc attcccgtgt tttgcaaggc gatgcatgtg 120  
gcacaacctg ccgtcgttct ggcatcatca agaggtattg ctagcttcgt ttgtgagtac 180  
gcctcccctg gaaaacatac ggaggtgctc gtcactgtat tgcggcaagc cgacagccaa 240  
gttactgaag tctgcgcggc aacgtatatg atgggcaatg agctgacatt ccttgacgat 300  
tcaatctgca cgggaacaag tagtggtaac caggtgaatc tcaactattca aggtctgaga 360  
gccatggaca ccggcctcta catttgtaag gtggagctga tgtatcctcc cccatattat 420  
ctggggatcg gaaatgggac acagatatat gtattgatc ccgagccatg tcccgatagt 480  
gacttctct tgtggatact tgccgctgtg agcagtggtt tgtttttta ttcattctc 540  
cttacggcag tatcactttc aaaaatgctc aagaagcga gtcctttgac aactggcgta 600  
tatgtcaaaa tgccaccaac agagcccga tlgagaaac agttccagcc gtactttatt 660  
cctataaac 669

<210> 129

<211> 669

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
聚核苷酸

<400> 129  
atggcctgct tgggcttcca aaggcataaa gccagccta atcttgctac tcgcacgtgg 60  
ccctgcacat tgctcttttt cctcctgttc attcccgtgt tttgcaaggc gatgcatgtg 120  
gcacaacctg ccgtcgttct ggcatcatca agaggtattg ctagcttcgt ttgtgagtac 180  
gcctcccctg gacatcacac ggaggtgctc gtcactgtat tgcggcaagc cgacagccaa 240  
gttactgaag tctgcgcggc aacgtatatg atgggcaatg agctgacatt ccttgacgat 300  
tcaatctgca cgggaacaag tagtggtaac caggtgaatc tcaactattca aggtctgaga 360  
gccatggaca ccggcctcta catttgtaag gtggagctga tgtatcctcc cccatattat 420

ctggggatcg gaaatgggac acagatatat gtatttgatc ccgagccatg tcccgatagt 480  
gacttctct tgtggatact tgccgctgtg agcagtgggt tgtttttta ttcattctc 540  
cttacggcag tatcactttc aaaaatgctc aagaagcgaa gtcctttgac aactggcgta 600  
tatgtcaaaa tgccaccaac agagcccgaa tgtgagaaac agttccagcc gtactttatt 660  
cctataaac 669

<210> 130

<211> 223

<212> PRT

<213> 智人

<400> 130

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala  
1 5 10 15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro  
20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala  
35 40 45

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly  
50 55 60

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln  
65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr  
85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val  
100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile  
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly  
 130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser  
 145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe  
 165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys  
 180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu  
 195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn  
 210 215 220

<210> 131

<211> 223

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
 多肽

<400> 131

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala  
 1 5 10 15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro  
 20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala  
 35 40 45

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly  
 50 55 60

Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln  
65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr  
85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val  
100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile  
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly  
130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser  
145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe  
165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys  
180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu  
195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn  
210 215 220

<210> 132  
<211> 223  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成  
多肽

<400> 132

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala  
1 5 10 15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro  
20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala  
35 40 45

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly  
50 55 60

Lys His Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln  
65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr  
85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val  
100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile  
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly  
130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser  
145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe  
165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys  
180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu  
195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn  
 210 215 220

<210> 133

<211> 223

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
 多肽

<400> 133

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala  
 1 5 10 15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro  
 20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala  
 35 40 45

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly  
 50 55 60

His His Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln  
 65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr  
 85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val  
 100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile  
 115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly  
 130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser  
 145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe  
 165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys  
 180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu  
 195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn  
 210 215 220

<210> 134

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 134

guuuuagagc uaugcuguuu ug

22

<210> 135

<211> 80

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
寡核苷酸

<400> 135

guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguaaucaac uugaaaaagu

60

ggcaccgagu cggugcuuuu

80

<210> 136  
 <211> 76  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成  
 寡核苷酸

<400> 136  
 guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu 60  
 ggcaccgagu cggugc 76

<210> 137  
 <211> 672  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 137  
 atggcctgct tgggcttcca aaggcataaa gccagctta atcttgctac tcgcacgtgg 60  
 ccctgcacat tgctcttttt cctcctgttc attcccggtg tttgcaaggc gatgcatgtg 120  
 gcacaacctg ccgtcgttct ggcacatca agaggtattg ctagcttcgt ttgtgagtac 180  
 gcctcccctg gaaaagcgcac ggaggtgcgc gtcactgtat tgcggcaagc cgacagccaa 240  
 gttactgaag tctgcgcggc aacgtatatg atgggcaatg agctgacatt ccttgacgat 300  
 tcaatctgca cgggaacaag tagtggtaac cagggtgaatc tcaactattca aggtctgaga 360  
 gccatggaca ccggcctcta cttttgtaag gtggagctga tgtatectcc cccatattat 420  
 ctgggggatcg gaaatgggac acagatatat gtatttgatc ccgagccatg tcccgatagt 480  
 gacttctctt tgtggatact tgccgctgtg agcagtggtt tgttttttta ttcattctctc 540  
 cttacggcag tatacctttc aaaaatgctc aagaagcgaa gtcctttgac aactggcgta 600  
 tatgtcaaaa tgccaccaac agagcccgaat tlgagaaac agttccagcc gtactttatt 660  
 cctataaact ga 672

<210> 138  
 <211> 537  
 <212> DNA  
 <213> 智人

&lt;400&gt; 138

atgcacagct cagcaactgct ctgttgctg gtccctctga ctggggtgag ggccagccca 60  
ggccagggca cccagctctga gaacagctgc acccaacttc caggcaacct gcctaacatg 120  
cttcgagatc tccgagatgc cttcagcaga gtgaagactt tctttcaat gaaggatcag 180  
ctggacaact tgttgttaaa ggagtccttg ctggaggact ttaagggtta cctgggttgc 240  
caagccttgt ctgagatgat ccagttttac ctggaggagg tgatgcccc aagctgagaac 300  
caagaccag acatcaaggc gcatgtgaac tccttggggg agaacctgaa gaccctcagg 360  
ctgaggctac ggcgctgtca tcgatttctt cctctgtgaa acaagagcaa ggccgtggag 420  
caggtgaaga atgcccitaa taagctccaa gagaaaggca tctacaaagc catgagtgag 480  
tttgacatct tcatcaacta catagaagcc tacatgacaa tgaagatacg aaactga 537

&lt;210&gt; 139

&lt;211&gt; 1299

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 139

atgccaacc ccaggcctgg caagccctcg gccccttctt tggcccttgg cccatcccca 60  
ggagcctcgc ccagctggag ggctgcaccc aaagcctcag acctgctggg ggccccggggc 120  
ccagggggaa ccttccaggg ccgagatctt cgaggcgggg cccatgcctc ctcttcttcc 180  
ttgaaccca tgccaccatc gcagctgcag ctgcccacac tgcccctagt catggtggca 240  
ccctccgggg cacgctggg ccccttgccc cacttacagg cactcctcca ggacaggcca 300  
catttcatgc accagctctc aacggtggat gcccacgccc ggaccctgt gctgcaggtg 360  
cacccttgg agagcccagc catgatcagc ctacacacc ccaccaccg cactggggtc 420  
ttctccctea aggcccggcc tggcctccca cctgggatca acgtggccag cctggaatgg 480  
gtgtccaggg agccggcact gctctgcacc ttcccacac ccagtgacc caggaaggac 540  
agcaccctt cggtctgtcc ccagagctcc taccactgc tggcaaatgg tgtctgcaag 600  
tggcccggat gtgagaaggc cttcgaagag ccagaggact tctcaagca ctgccaggcg 660  
gaccatcttc tggatgagaa gggcagggca caatgtctcc tccagagaga gatggtacag 720

tctctggagc agcagctggt gctggagaag gagaagctga gtgccatgca ggcccacctg 780  
gctgggaaaa tggcaactgac caaggcttca tctgtggcat catccgacaa gggctcctgc 840  
tgcacgttag ctgctggcag ccaaggccct gtcgtcccag cctggtctgg cccccgggag 900  
gcccctgaca gcctgtttgc tgtccggagg cacctgtggg gtagccatgg aaacagcaca 960  
ttcccagagt tctccacaa catggactac ttcaagttcc acaacatgcg accccctttc 1020  
acctacgcca cgctcatccg ctgggccatc ctggaggctc cagagaagca gcggacactc 1080  
aatgagatct accactgggt cacacgcatg ttgccttct tcagaaacca tctgccacc 1140  
tggagaagc ccatccgcca caacctgagt ctgcacaagt gctttgtgcg ggtggagagc 1200  
gagaaggggg ctgtgtggac cgtggatgag ctggagtcc gcaagaaacg gagccagagg 1260  
cccagcaggt gttccaacc tacacctggc cctgataa 1299

<210> 140

<211> 431

<212> PRT

<213> 智人

<400> 140

Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu  
1 5 10 15

Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro Lys Ala  
20 25 30

Ser Asp Leu Leu Gly Ala Arg Gly Pro Gly Gly Thr Phe Gln Gly Arg  
35 40 45

Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn Pro Met  
50 55 60

Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val Ala  
65 70 75 80

Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu  
85 90 95

Gln Asp Arg Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala His  
 100 105 110

Ala Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu Glu Ser Pro Ala Met  
 115 120 125

Ile Ser Leu Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Gly Val Phe Ser Leu Lys  
 130 135 140

Ala Arg Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp  
 145 150 155 160

Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu Cys Thr Phe Pro Asn Pro Ser Ala  
 165 170 175

Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro  
 180 185 190

Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe  
 195 200 205

Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His Leu Leu  
 210 215 220

Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln  
 225 230 235 240

Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu Ser Ala Met  
 245 250 255

Gln Ala His Leu Ala Gly Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser Ser Val  
 260 265 270

Ala Ser Ser Asp Lys Gly Ser Cys Cys Ile Val Ala Ala Gly Ser Gln  
 275 280 285

Gly Pro Val Val Pro Ala Trp Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser  
 290 295 300

Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu Trp Gly Ser His Gly Asn Ser Thr  
 305 310 315 320

Phe Pro Glu Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Phe His Asn Met  
 325 330 335

Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu  
 340 345 350

Ala Pro Glu Lys Gln Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr  
 355 360 365

Arg Met Phe Ala Phe Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala  
 370 375 380

Ile Arg His Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val Glu Ser  
 385 390 395 400

Glu Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg Lys Lys  
 405 410 415

Arg Ser Gln Arg Pro Ser Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly Pro  
 420 425 430

<210> 141

<211> 8028

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
 聚核苷酸

<400> 141

acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca 60

acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcattgccga ttggtggaag taaggtgcta 120

cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga	180
attgccgcat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacataa acgggtctct	240
ctggttagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa	300
gccicaataa agcttgcctt gagtgcctca agtagtgtgt gcccgtctgt tgtgtgactc	360
tggtaactag agatccctca gaccctttta gtcagtgtgg aaaatctcta gcagtggcgc	420
ccgaacaggg acttgaaagc gaaagggaaa ccagaggagc tctctcgacg caggactcgg	480
cttctgaag cgcgcacggc aagaggcagc gggcggcgac tggtagtac gccaaaaatt	540
ttgactagcg gaggctagaa ggagagagat gggctcgaga gcgtcagtat taagcggggg	600
agaattagat cgcgatggga aaaaattcgg ttaagccag ggggaaagaa aaaatataaa	660
ttaaacata tagtatgggc aagcaggagc ctagaacgat tcgcagttaa tcttggcctg	720
ttagaaacat cagaaggctg tagacaaata ctgggacagc tacaaccatc ccttcagaca	780
ggatcagaag aacttagatc attatataat acagtagcaa ccctctattg tgtgcatcaa	840
aggatagaga taaaagacac caaggaagct ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa	900
agtaagacca ccgcacagca agcggccact gatcttcaga cctggaggag gagatatgag	960
ggacaattgg agaagtgaat tatataaata taaagtagta aaaattgaac cattaggagt	1020
agcaccacc aaggcaaaga gaagagtggc gcagagagaa aaaagagcag tgggaatagg	1080
agctttgttc cttgggttct tgggagcagc aggaagcact atgggcgcag cgtcaatgac	1140
gctgacggtc caggccagac aattattgtc tggtatagtg cagcagcaga acaatttct	1200
gagggctatt gaggcgcaac agcatctgtt gcaactcaca gtctggggca tcaagcagct	1260
ccaggcaaga atcctggctg tggaaagata cctaaaggat caacagctcc tggggatttg	1320
gggttctct ggaaaactca tttgcaccac tctgtgcct tggaatgcta gttggagtaa	1380
taaatctctg gaacagattt ggaatcacac gacctgatg gagtgggaca gagaaattaa	1440
caattacaca agcttaatac actccttaat tgaagaatcg caaaccagc aagaaaagaa	1500
tgaacaagaa ttattggaat tagataaatg ggcaagtttg tggatttgg ttaacataac	1560
aaattggctg tggatataa aattattcat aatgatagta ggaggcttgg taggtttaag	1620

aatagttttt gctgtacttt ctatagtgaa tagagttagg cagggatatt caccattatc	1680
gtttcagacc cacctcccaa ccccagggg acccgacagg cccgaaggaa tagaagaaga	1740
aggtaggagag agagacagag acagatccat tcgattagtg aacggatctc gacggtatcg	1800
atggccgccc ccttcaccga gggcctatth cccatgattc cttcatatth gcatatacga	1860
tacaaggctg ttagagagat aattggaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta	1920
caaaatacgt gacgtagaaa gtaataatth cttgggtagt ttgcagttth aaaattatgt	1980
tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta	2040
tatatcttgt ggaaaggacg aaacaccgga gtcttcttht ttgaagacac ttcggactgt	2100
agaactctga acctcgagca atttaaaaga aaagggggga ttgggggta cagtcaggg	2160
gaaagaatag tagacataat agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaaacaaatt	2220
acaaaaatc aaaatttctg cgttgttctc ggtgctcgtt ctctgctctt cacgctactg	2280
aattcatcac cgttctctc aagccctccg cgcgggtht ttggcctcc cgcgggcgcc	2340
cccctctca cggcagcgc tgccacgtca gacgaaggc gcagcagcgc tctgatcct	2400
tcccccga cgtcaggac agcggcccgc tctcataag actcggcctt agaacccag	2460
talcagcaga aggacattht aggacgggac ttgggtgact ctagggcact ggtthtctth	2520
ccagagagc gaacaggcga ggaaaagtag tcccttctc gcgattctgc ggagggatct	2580
ccgtggggcgt gtgaacgccg atgattatat aaggacgcgc cgggtgtggc acagctagtt	2640
ccgtcgcagc cgggatttgg gtcgcggtt ttttttgg atcgtgtga tctcacttg	2700
gtctagacgc caccatgagc gggggcgagg agctgttctc cggcatctg cccgtgctga	2760
tcgagctgga cggcagctg cacggccaca agttcagcgt gcgcggcgag ggcgagggcg	2820
acgccgacta cggcaagctg gagatcaagt tcatctgcac caccggcaag ctgccctgc	2880
cctggcccac cctggtgacc accctctgct acggcatcca gtgcttctcc cgtaccccg	2940
agcacatgaa gatgaacgac ttcttcaaga gcgccatgcc cgagggtac atccaggagc	3000
gcaccatcca gttccaggac gacggcaagt acaagaccgc cggcaggtg aagttcgagg	3060
gcgacacct ggtgaaccgc atcgagctga agggcaagg cttcaaggag gacggcaaca	3120

tcctgggcca caagctggag tacagcttca acagccacaa cgtgtacatc cgccccgaca 3180  
aggccaacaa cggcctggag gctaacttca agaccgccca caacatcgag ggcggcggcg 3240  
tgcagctggc cgaccactac cagaccaacg tccccctggg cgacggcccc gtgctgatcc 3300  
ccatcaacca ctacctgagc actcagacca agatcagcaa ggaccgcaac gagggcccgcg 3360  
accacatggt gctcctggag tccttcagcg cctgctgcca caccacggc atggacgagc 3420  
tgtacagggg atccgagggc agaggaagcc ttctaacatg cggtgacgtg gaggagaatc 3480  
ccggcccttc cgggatgacc gagtacaagc ccacggtgcg cctcgcacc cgcgacgacg 3540  
tccccagggc cgtacgcacc ctcgcccgcg cgttcgccga ctaccccgcc acgcgccaca 3600  
ccgtcgatcc ggaccgccac atcagcggg tcaccgagct gcaagaactc ttctcagc 3660  
gcgtcgggct cgacatcggc aagggtgtggg tcgcygacga cggcggccgcg gtggcggctt 3720  
ggaccacgcc ggagagcgtc gaagcggggg cgggtttcgc cgagatcggc ccgcgcatgg 3780  
ccgagttgag cggttcccgg ctggccgcgc agcaacagat ggaaggcctc ctggcggcgc 3840  
accggcccaa ggagcccgcg tggttcctgg ccaccgtcgg cgtctcggcc gaccaccagg 3900  
gcaagggtct gggcagcgcg gtcgtgctcc ccggagtggg ggcggccgag cgcgcccggg 3960  
tggccgctt cctggagacc tccgcgcccc gcaacctccc ctctacgag cggctcggct 4020  
tcaccgtcac cccgacgtc gaggtgcccc aaggaccgcg cacctggtgc atgaccgca 4080  
agcccggtgc ctgaatctag gtcgacaatc aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat 4140  
tgactggtat tcttaactat gttgctcctt ttacgctatg tggatacgt gctttaatgc 4200  
ctttgtatca tgctattgct tcccgtatgg ctttcatttt ctctccttg tataaatcct 4260  
ggttgctgtc tctttatgag gagttgtggc ccgttgctcag gcaacgtggc gtggtgtgca 4320  
ctgtgtttgc tgacgcaacc cccactggtt ggggcattgc caccacctgt cagctccttt 4380  
ccgggacttt cgctttcccc ctccctattg ccacggcggg actcatcgcc gcctgccttg 4440  
cccgtgctg gacaggggct cggctgttgg gactgacaa ttccgtggtg ttgtcgggga 4500  
aatcatcgtc ctttccttgg ctgctcgctt gtgttgccac ctggattctg cgcgggacgt 4560  
cctctgcta cgtcccttcg gccctcaatc cagcggacct tccttcccgc ggctgctgc 4620

cggtcttgcg gacctttccg cgtctccgcc ttccccctca gacgagtcgg atctctcttt	4680
gggccgcctc cccgectggt acctttaaga ccaatgactt acaaggcagc tgtagatctt	4740
agccactttt taaaagaaaa ggggggactg gaagggctaa ttcactccca acgaagataa	4800
gatctgcttt ttgcttgtac tgggtctctc tggttagacc agatctgagc ctgggagctc	4860
tctggctaac tagggaacct actgcttaag cctcaataaa gcttgccttg agtgcttcaa	4920
gtagtgtgtg cccgtctgtt gtgtgactct ggtaactaga gatccctcag accttttag	4980
tcagtgtgga aaatctctag cagtagtagt tcatgtcacc ttattattca gtatttataa	5040
cttgcaaaga aatgaatacc agagagtgag aggaacttgt ttattgcagc ttataatggt	5100
tacaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag catTTTTTTC actgcattct	5160
agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggctcta gctatcccgc	5220
ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc cggccagttc cggccattct ccgccccatg	5280
gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctcggcctct gagctattcc	5340
agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc tagacttttg cagagaccaa attcgtaatc	5400
atgtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt taccgctca caattccaca caacatacga	5460
gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gctaatgag tgagctaact cacattaatt	5520
gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga	5580
atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttctctgctc	5640
actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg cggcagcgg taccagctca ctcaaaggcg	5700
gtaatacggc tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc	5760
cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgcctg cgtttttcca taggctccgc	5820
ccccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga	5880
ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc	5940
ctgccctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat	6000
agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggtgtgtg	6060
cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagctc	6120

aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga 6180  
gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggccctaacta cggctacact 6240  
agaagaacag tatttgggat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt 6300  
ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggttttt tgtttgcaag 6360  
cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg 6420  
tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggcatgag attatcaaaa 6480  
aggatcttca cctagatcct tttaaatata aatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata 6540  
tatgagtaaa cttggctga cagttacca tcttaataca gtgaggcacc tatctcagcg 6600  
atctgtctat ttcggtcacc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata 6660  
cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc acgctaccg 6720  
gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct 6780  
gcaactttat ccgctccat ccagctctatt aattgttgc gggaaagctag agtaagtagt 6840  
tcgccagtta atagtttgc caacgttgt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc 6900  
tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga 6960  
tccccatgt tgtgaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt 7020  
aagtggccg cagtgttacc actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc 7080  
atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa 7140  
tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca 7200  
catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca 7260  
aggatcttac cgctgtttag atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct 7320  
tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtagcaaa aaacaggaag gcaaaatgcc 7380  
gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt ctttttcaa 7440  
tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt 7500  
tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc 7560  
taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggcccttt 7620

cgtctcgcgc gtttcggatga tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg 7680  
 gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg 7740  
 ggtgttggcg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga 7800  
 gtgcaccata tgcgggtgta aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg 7860  
 cgccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtcg ggcctcttcg 7920  
 ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc gattaagtgg ggtaaccca 7980  
 gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg ccaagctg 8028

<210> 142

<211> 7127

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
聚核苷酸

<400> 142

gcgatcgcag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt 60  
 tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac 120  
 gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg 180  
 ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagttacat caagtgtatc atatgccaag 240  
 tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggccccgc tggcattatg cccagtacat 300  
 gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattacat 360  
 ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt 420  
 tccaagtctc caccacattg acgtcaatgg gagtttgitt tggcaccaaa atcaacggga 480  
 ctttccaaaa tgtcgttaaca actccgcccc attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg 540  
 gtgggaggtc tataaagca gagctcgttt agtgaaccgg ggctctctg gtttagaccg 600  
 atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaaccac tgccttaagcc tcaataaagc 660  
 ttgccttgag tgcctcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg taactagaga 720  
 tcctcagac ccttttagtc agtgtggaaa atctctagca gtggcggccc aacagggacc 780

tgaaagcgaa agggaaacca gagctctctc gacgcaggac tcggcttgct gaagcgcgca 840  
cggcaagagg cgagggcgcg cgactgggtga gfacgcaaaa aatlttgact agcggaggct 900  
agaaggagag agatgggtgc gagagcgtca gtattaagcg ggggagaatt agatcgcgat 960  
gggaaaaaat tcggttaagg ccagggggaa agaaaaata taaattaaa catatagtat 1020  
gggcaagcag ggagctagaa cgattcgcag ttaatcctgg cctgttagaa acatcagaag 1080  
gctgtagaca aatactggga cagctacaac catccctca gacaggatca gaagaactta 1140  
gatcattata taatacagta gcaaccctct attgtgtgca tcaaaggata gagataaaag 1200  
acaccaagga agctttagac aagatagagg aagagcaaaa caaaagtaag accaccgcac 1260  
agcaagcggc cgctgatctt cagacctgga ggaggagata tgagggacaa ttggagaagt 1320  
gaattatata aatataaagt agtaaaaatt gaaccattag gagtagcacc caccaaggca 1380  
aagagaagag tgggtcagag agaaaaaga gcagtgggaa taggagcttt gttccttggg 1440  
ttcttgggag cagcaggaag cactatgggc gcagcctcaa tgacgtgac ggtacaggcc 1500  
agacaattat tgtctggtat agtgcagcag cagaacaatt tgctgagggc tattgaggcg 1560  
caacagcatc tgttgcaact cacagtctgg ggcacaaagc agctccaggc aagaatcctg 1620  
gctgtggaaa gatacctaaa ggatcaacag ctctgggga tttggggttg ctctgaaaa 1680  
ctcatttga ccactgctgt gccttggaaat gctagttaga gtaataaatc tctggaacag 1740  
atttggaaac acacgacctg gatggagtgg gacagagaaa ttaacaatta cacaagctta 1800  
atacactcct taattgaaga atcgcaaac cagcaagaaa agaataaaca agaattattg 1860  
gaattagata aatgggcaag tttgtggaat tggtttaaca taacaattg gctgtggtat 1920  
ataaaattat tcataatgat agtaggaggc ttggtaggtt taagaatagt ttttctgta 1980  
ctttctatag tgaatagagt taggcaggga tattcaccat tatcgtttca gaccacctc 2040  
ccaaccccga ggggacccga caggcccga ggaatagaag aagaaggtgg agagagagac 2100  
agagacagat ccattcgatt agtgaacgga tctcgacggt atcggttaac ttttaaaaga 2160  
aaagggggga ttggggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat agcaacagac 2220  
atacaacta aagaattaca aaaacaatt acaaaaattc aaaatlttg cteccgatcg 2280

ttgctttaca cacacaatta ctgctgatcg agtgtagcct tcgaatgaaa gacccacct 2340  
gtaggttttg caagatagct gcagtaacgc ctttttgcga ggcatggaaa aataccaaac 2400  
caagaataga gaagttcaga tcaaggcgcg gfacatgaaa atagctaacg ttgggcaaaa 2460  
caggatatct gcggtgagca gtttcggccc cggcccgggg ccaagaacag atggtcaccg 2520  
cagtttcggc cccggcccga ggccaagaac agatgggtccc cagatatggc ccaaccctca 2580  
gcagtttctt aagacccatc agatgtttcc aggtcctccc aaggacctga aatgacctg 2640  
cgccttattt gaattaaacca atcagcctgc ttctcgttc tgttcgcgcg cttctgcttc 2700  
ccgagctcta taaaagagct cacaaccct cactcggcgc gccagtcctc cgattgactg 2760  
agtcgcctg atcattgtcg atcctacat cactcgcaca cacccgccag ggccctgcc 2820  
agcttccgag ctctcgatat caaaggaggt acccaacatg gtcagcaagg gcgaggaact 2880  
gttcaccggg gtggtgccca tcctggtcga gctggacggc gacgtaaac gccacaagtt 2940  
cagcgtgtcc ggcgagggcg agggcgatgc cacctacggc aagctgacc tgaagttcat 3000  
ctglaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gccaccctc gtgaccacc tgacctacgg 3060  
cgtgcaatgc ttcagccgt accccgacca catgaagcag cacgacttct tcaagtcgc 3120  
catgcccga ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc aaggacgac gcaactaaa 3180  
gacccgcgcc gaggtgaagt tcgagggcga caccctggtg aaccgcatcg agctgaaggg 3240  
catcgacttc aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag 3300  
ccacaacgtc tataatcatgg ccgacaagca gaagaacggc atcaaggtga acttcaagat 3360  
ccgccacaac atcagggacg gcagcgtgca actcggcgc cactaccagc agaacacccc 3420  
catcggcgac ggccccgtgc tgctgcccga caaccactac ctgagcacc agtccgcct 3480  
gagcaaagac cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg ctggagttcg tgaccgccg 3540  
cgggatcact ctcgcatgg acgagctgta caagtagaag ttgtctctc ctgcactgac 3600  
tgactgatac aatcgatttc tggatccgca ggccctctgt agaagttgtc tctcctgca 3660  
ctgactgact gatacaatcg atttctggat ccgcaggcct ctgctagctt gactgactga 3720  
gtcgacaatc aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat tgactggtat tettaactat 3780

gttgcctcct ttacgctatg tggatacgt gctttaatgc ctttgcata tgctattgct 3840  
tcccgtatgg ctttcatttt ctctccttg tataaatcct gggtgctgc tctttatgag 3900  
gagttgtggc ccgttgcag gcaacgtggc gtgggtgca ctgtgtttgc tgacgcaacc 3960  
cccactgggt ggggcattgc caccacctgt cagctccttt ccgggacttt cgctttcccc 4020  
ctccctattg ccacggcgga actcatcgcc gcctgccttg cccgctgctg gacaggggct 4080  
cggctgtttg gcactgacaa ttccgtggtg ttgtcgggga agctgacgtc ctttccatgg 4140  
ctgctcgctt gtgttggcac ctggattctg cgcgggacgt ccttctgcta cgtcccttcg 4200  
gccctcaatc cagcggacct tcttccccg gcctgctgc cggctctgcy gcctcttccg 4260  
cgtcttcgcc ttccctca gacgagtcgg atctcccttt gggccgcctc cccgcctgga 4320  
attcgagctc ggtaccttta agaccaatga ctacaaggc agctgtagat cttagccact 4380  
ttttaaaaga aaagggggga ctggaagggc taattcactc ccaacgaaga caagatctgc 4440  
ttttgcttg tactgggtct ctctggttag accagatctg agcctgggag ctctctggct 4500  
aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc ttgagtgcct caagtagtgt 4560  
gtgcccgtct gttgtgtgac tctggttaact agagatccct cagacccttt tagtcagtgt 4620  
ggaaaatctc tagcagtcct ggccaacgtg agcacctgc tgacctcaa atatcgtaa 4680  
gctggagcct gggagccggc ctggccctcc gccccccca cccccgcagc ccaccctgg 4740  
tctttgaata aagtctgagt gagtggccga cagtgccctt ggagttctcg tgacctgagg 4800  
tgcagggccg gcgctaggga cacgtccgtg cacgtgccga ggccccctgt gcagctgcaa 4860  
gggacaggcc tagccctgca ggcctaactc cgccatccc gccctaact ccgccagtt 4920  
ccgccattc tccgctcat ggctgactaa tttttttat ttatgcagag gccgaggccg 4980  
cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggacgctt ttttggaggc cgaggctttt 5040  
gcaaagatcg aacaagagac aggacctgca ggttaattaa atttaaatca tgtgagcaaa 5100  
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa gcccgcgttg ctggcgtttt tccatagget 5160  
ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagagggtgc gaaacccgac 5220  
aggactataa agataaccagg cgtttcccc tggaaagctc ctcgtgcgt ctctgttcc 5280

gacctgccg cttaccgat acctgtccg ctttctcct tcgggaagcg tggcgctttc 5340  
tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg 5400  
tgtgcacgaa cccccgttc agccccaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga 5460  
gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag 5520  
cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gtctttgaag tggtagccta actacggcta 5580  
cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag 5640  
agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcggtaggt tttttgtttg 5700  
caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tctttctac 5760  
ggggtctgac gctcagtggg acgaaaactc acgttaaggg attttggcca tgagattatc 5820  
aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaa taaaaatga agttttaaat caatctaaag 5880  
tatatatgag taaacttggg ctgacagtta ccaatgccta atcagtgagg cacctatctc 5940  
agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt tgcatttaa tggccggcct ggcgcgccgt 6000  
ttaaacctag atattgatag tctgatcggg caacgtataa tcgagtccta gcttttgcaa 6060  
acatctatca agagacagga tcagcaggag gctttcgcct gagtattcaa catttccgtg 6120  
tcgcccttat tcccttttt gcggcatttt gccttctgt ttttgctcac ccagaaacgc 6180  
tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcgag agtgggttac atcgaactgg 6240  
atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgcttt ccaatgatga 6300  
gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc 6360  
aactcggctc ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtattca ccagtcacag 6420  
aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtctgcc ataaccatga 6480  
gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgattgg aggaccgaag gagctaaccg 6540  
cttttttga caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga 6600  
atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tntagcaatg gcaacaacct 6660  
tgcgtaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacag ttgatagact 6720  
ggatggagcg ggataaagt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt 6780

ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggatcatt gcagcactgg 6840  
ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta 6900  
tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac 6960  
cgattctagg tgcattggcg cagaaaaaaaa tgcctgatgc gacgctgcgc gtcttatact 7020  
cccacatatg ccagattcag caacggatac ggcttcccca acttgccac ttccatacgt 7080  
gtcctcetta ccagaaattt atccttaaga tcccgatcg tttaaac 7127

<210> 143

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
肽

<400> 143

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 144

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
肽

<400> 144

Pro Lys Lys Lys Arg Arg Val

1 5

<210> 145

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
肽

&lt;400&gt; 145

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys  
 1                    5                    10                    15

&lt;210&gt; 146

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列之描述：合成  
 聚核苷酸

&lt;220&gt;

<223> 關於取代及較佳實施例之詳細描述，請參見所申請的說明書

&lt;400&gt; 146

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa            60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa            100

&lt;210&gt; 147

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列之描述：合成  
 聚核苷酸

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(100)

<223> 此序列可包含20、30、40、50、60、70、80、90  
 或100個核苷酸

&lt;400&gt; 147

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa            60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa            100

&lt;210&gt; 148

&lt;211&gt; 300

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
聚核苷酸

<220>

<223>關於取代及較佳實施例之詳細描述，請參見所申請的說明書

<400> 148

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300

<210> 149

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成  
聚核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(100)

<223> 此序列可包含95至100個核苷酸

<400> 149

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 100

## 【發明申請專利範圍】

### 【請求項1】

一種工程化之T細胞，其包含：

i)編碼調節T細胞促進分子之異源性核酸，其在啟動子序列控制下；

ii)編碼干擾素 $\gamma$  (IFNG)之內源性核酸序列之修飾，其中該修飾減弱(knocks down)該IFNG之表現；及

iii)編碼腫瘤壞死因子 $\alpha$  (TNFA)之內源性核酸序列之修飾，其中該修飾減弱TNFA之表現。

### 【請求項2】

如請求項1之工程化之T細胞，其中該調節T細胞促進分子係選自介白素-10 (IL10)、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA4)、轉化生長因子 $\beta$ 1 (TGFB1)、吲哚胺2,3-二氧酶1 (IDO1)、外核苷三磷酸二磷酸水解酶1 (ENTPD1)、5'-外核苷酸酶(5'-nucleotidase ecto)(NT5E)、介白素-22 (IL-22)、雙調蛋白(amphiregulin)(AREG)、介白素-35 (IL35)、GARP、CD274分子(CD274)、叉頭盒P3 (FOXP3)、IKAROS家族鋅指2 (IKZF2)、家族性嗜酸性粒細胞增多症(eosinophilia familial)(EOS)、干擾素調節因子4 (IRF4)、淋巴增強結合因子1 (LEF1)，及BTB域及CNC同源物2 (BACH2)。

### 【請求項3】

如請求項1或2之工程化之T細胞，其中該調節T細胞促進分子係IL10。

### 【請求項4】

如請求項1至2之工程化之T細胞，其中該調節T細胞促進分子係CTLA4。

**【請求項5】**

如請求項1至4中任一項之工程化之T細胞，其中該調節T細胞促進分子係第一調節T細胞促進分子，且進一步包含編碼第二調節T細胞促進分子之異源性核酸，其在啟動子序列控制下。

**【請求項6】**

如請求項5之工程化之T細胞，其中該第一及該第二調節T細胞促進分子係IL10及CTLA4。

**【請求項7】**

如請求項1至6中任一項之工程化之T細胞，其進一步包含編碼介白素17A (IL17A)、介白素-2 (IL2)、介白素6 (IL6)、穿孔蛋白1 (PRF1)、顆粒酶A (GZMA)或顆粒酶B (GZMB)之內源性核酸序列之修飾，其中該修飾分別減弱該IL17A、該IL2、該IL6、該PRF1、該GZMA或該GZMB之表現。

**【請求項8】**

如請求項1至7中任一項之工程化之T細胞，其進一步包含編碼內源性T細胞受體(TCR)之內源性核酸序列之修飾，其中該修飾減弱該內源性TCR之表現。

**【請求項9】**

如請求項1至8中任一項之工程化之T細胞，其進一步包含靶向受體之異源性編碼序列，其在啟動子序列控制下。

**【請求項10】**

如請求項9之工程化之T細胞，其中該靶向受體靶向選自以下之配體：黏膜血管位址素(addressin)細胞黏附分子1 (MADCAM1)、腫瘤壞死因子 $\alpha$  (TNFA)、CEA細胞黏附分子6 (CEACAM6)、血管細胞黏附分子1 (VCAM1)、瓜胺酸化波形蛋白(vimentin)、髓鞘鹼性蛋白(MBP)、MOG (髓鞘寡樹突膠細胞醣蛋白)、蛋白脂蛋白1 (PLP1)、CD19分子(CD19)、CD20分子(CD20)、TNF受體超家族成員17 (TNFRSF17)、二肽基肽酶樣6 (DPP6)、溶質載體家族2成員2 (SCL2A2)、麩胺酸脫羧酶(GAD2)、橋粒芯蛋白(desmoglein) 3 (DSG3)，及MHC I類HLA-A (HLA-A\*02)。

**【請求項11】**

如請求項9或10之工程化之T細胞，其中該靶向受體包含嵌合抗原受體(CAR)或T細胞受體(TCR)。

**【請求項12】**

如請求項9至11中任一項之工程化之T細胞，其中編碼該靶向受體之異源性核酸係併入表現構築體內。

**【請求項13】**

如請求項9至12中任一項之工程化之T細胞，其中編碼靶向受體之異源性核酸係於不包含編碼調節T細胞促進分子之核酸之表現構築體中。

**【請求項14】**

如請求項5至13中任一項之工程化之T細胞，其中編碼該第一調節T細胞促進分子之異源性核酸係併入表現構築體內及編碼該第二調節T細胞促進分子之異源性核酸係併入表現構築體內。

**【請求項15】**

如請求項5至14中任一項之工程化之T細胞，其中編碼該第一調節T

細胞促進分子之異源性核酸及編碼該第二調節T細胞促進分子之異源性核酸係併入各別表現構築體內。

**【請求項16】**

如請求項13或14之工程化之T細胞，其中編碼該第一調節T細胞促進分子之異源性核酸及編碼該第二調節T細胞促進分子之異源性核酸係併入單一表現構築體內。

**【請求項17】**

如請求項12或14至16之工程化之T細胞，其中該表現構築體進一步包含編碼靶向受體之核酸。

**【請求項18】**

如請求項12至17中任一項之工程化之T細胞，其中至少一種異源性編碼序列係於游離基因體表現構築體中。

**【請求項19】**

如請求項1至17中任一項之工程化之T細胞，其中至少一種異源性編碼序列係插入基因體內。

**【請求項20】**

如請求項19之工程化之T細胞，其中該插入基因體內係非靶向插入。

**【請求項21】**

如請求項19之工程化之T細胞，其中該插入係靶向插入。

**【請求項22】**

如請求項21之工程化之T細胞，其中該靶向插入係於選自以下之位點內：TCR基因座、TNF基因座、IFNG基因座、IL17A基因座、IL6基因座、IL2基因座、腺相關病毒整合位點1 (AAVS1)基因座。

**【請求項23】**

如請求項22之工程化之T細胞，其中該TCR基因座係T細胞受體 $\alpha$ 恆定(TRAC)基因座。

**【請求項24】**

如請求項1至23中任一項之工程化之T細胞，其中減弱基因表現之修飾包含插入、缺失或取代中之一或多者。

**【請求項25】**

一種細胞群體，其包含如請求項1至24中任一項之工程化之T細胞。

**【請求項26】**

如請求項1至24中任一項之工程化之T細胞之群體，其中該群體之至少30%，較佳至少40%細胞包含編碼調節T細胞促進分子之異源性核酸序列，其在啟動子序列控制下；

該群體之至少50%，較佳至少70%細胞包含編碼IFNG之內源性核酸序列之修飾；及

該群體之至少50%，較佳至少70%細胞包含編碼TNFA之內源性核酸序列之修飾。

**【請求項27】**

如請求項26之工程化之T細胞之群體，其中包含插入或修飾之細胞之百分比係藉由下一代測序(NGS)之讀段百分比測定。

**【請求項28】**

如請求項26或27之工程化之T細胞之群體，其中該調節T細胞促進分子係選自介白素-10 (IL10)、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA4)、轉化生長因子 $\beta$ 1 (TGFB1)、吲哚胺2,3-二氧酶1 (IDO1)、外核苷三磷酸二磷

酸水解酶1 (ENTPD1)、5'-外核苷酸酶(NT5E)、介白素-22 (IL22)、雙調蛋白(AREG)、叉頭盒P3 (FOXP3)、IKAROS家族鋅指2 (IKZF2)、家族性嗜酸性粒細胞增多症(EOS)、干擾素調節因子4 (IRF4)、淋巴增強結合因子1 (LEF1)，及BTB域及CNC同源物2 (BACH2)。

**【請求項29】**

如請求項26至28中任一項之工程化之T細胞之群體，其中該調節T細胞促進分子係IL10。

**【請求項30】**

如請求項26至29中任一項之工程化之T細胞之群體，其中該調節T細胞促進分子係CTLA4。

**【請求項31】**

如請求項26至30中任一項之工程化之T細胞之群體，其中該調節T細胞促進分子係第一調節T細胞促進分子，且進一步包含編碼第二調節T細胞促進分子之異源性核酸，其在啟動子序列控制下。

**【請求項32】**

如請求項31之工程化之T細胞，其中該第一及該第二調節T細胞促進分子係IL10及CTLA4。

**【請求項33】**

如請求項26至32中任一項之工程化之T細胞之群體，其進一步包含至少一種編碼以下之內源性核酸序列之修飾：介白素17A (IL17A)、介白素6 (IL6)、介白素2 (IL2)、穿孔蛋白1 (PRF1)、顆粒酶A (GZMA)或顆粒酶B (GZMB)，其中該細胞群體包含分別在該IL17A、該IL6、該IL2、該PRF1、該GZMA或該GZMB中之至少一者中之修飾於該細胞群體之至少

70%，較佳該細胞群體之至少80%中，其中該修飾分別減弱該IL17A、該IL6、該IL2、該PRF1、該GZMA或該GZMB中之至少一者之表現。

**【請求項34】**

如請求項26至33中任一項之工程化之T細胞之群體，其中至少50%，較佳至少70%細胞包括TCR之減弱。

**【請求項35】**

如請求項26至34中任一項之工程化之T細胞之群體，其中至少30%，較佳至少40%細胞包括靶向受體之核酸編碼序列之插入。

**【請求項36】**

如請求項35之工程化之T細胞之群體，其中該靶向受體特異性結合至選自以下之配體：黏膜血管位址素細胞黏附分子1 (MADCAM1)、腫瘤壞死因子 $\alpha$  (TNFA)、CEA細胞黏附分子6 (CEACAM6)、血管細胞黏附分子1 (VCAM1)、瓜胺酸化波形蛋白、髓鞘鹼性蛋白(MBP)、MOG (髓鞘寡樹突膠細胞糖蛋白)、蛋白脂蛋白1 (PLP1)、CD19分子(CD19)、CD20分子(CD20)、TNF受體超家族成員17 (TNFRSF17)、二肽基肽酶樣6 (DPP6)、溶質載體家族2成員2 (SCL2A2)、麩胺酸脫羧酶(GAD2)、橋粒芯蛋白3 (DSG3)，及MHC I類HLA-A (HLA-A\*02)。

**【請求項37】**

如請求項35或36之工程化之T細胞之群體，其中該靶向受體包含嵌合抗原受體(CAR)或T細胞受體(TCR)。

**【請求項38】**

如請求項35至37中任一項之工程化之T細胞之群體，其中編碼該靶向受體之異源性核酸係併入表現構築體內。

**【請求項39】**

如請求項38之工程化之T細胞之群體，其中編碼靶向受體之異源性核酸係於不包含編碼調節T細胞促進分子之核酸之表現構築體中。

**【請求項40】**

如請求項26至39中任一項之工程化之T細胞之群體，其中編碼至少一種調節T細胞促進分子中之第一調節T細胞促進分子之異源性核酸係併入表現構築體內及編碼至少一種調節T細胞促進分子中之第二調節T細胞促進分子之異源性核酸係併入表現構築體內。

**【請求項41】**

如請求項40之工程化之T細胞之群體，其中編碼該第一調節T細胞促進分子之異源性核酸及編碼該第二調節T細胞促進分子之異源性核酸係併入各別表現構築體內。

**【請求項42】**

如請求項40之工程化之T細胞之群體，其中編碼該第一調節T細胞促進分子之異源性核酸及編碼該第二調節T細胞促進分子之異源性核酸係併入單一表現構築體內。

**【請求項43】**

如請求項38或40至42之工程化之T細胞之群體，其中表現構築體進一步包含編碼靶向受體之核酸。

**【請求項44】**

如請求項26至43中任一項之工程化之T細胞之群體，其中至少一種異源性編碼序列係於游離基因體表現構築體中。

**【請求項45】**

如請求項26至44中任一項之工程化之T細胞之群體，其中至少一種異源性編碼序列係插入基因體內。

**【請求項46】**

如請求項45之工程化之T細胞之群體，其中該插入基因體內係非靶向插入。

**【請求項47】**

如請求項45之工程化之T細胞之群體，其中該插入係靶向插入。

**【請求項48】**

如請求項47之工程化之T細胞之群體，其中該靶向插入係於選自以下之位點內：TCR基因座、TNF基因座、IL2基因座、IL6基因座、IL17A基因座、IFNG基因座、腺相關病毒整合位點1 (AAVS1)基因座。

**【請求項49】**

如請求項48之工程化之T細胞之群體，其中該TCR基因座係T細胞受體 $\alpha$ 恆定(TRAC)基因座。

**【請求項50】**

如請求項26至49之工程化之T細胞之群體，其中減弱基因表現之修飾包含插入、缺失或取代中之一或多者。

**【請求項51】**

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至24之工程化之T細胞或如請求項25至50之工程化之T細胞之群體中之任一者。

**【請求項52】**

一種對個體投與如請求項1至24中任一項之細胞或如請求項25至50中任一項之細胞群體或如請求項51之醫藥組合物之方法或用途。

**【請求項53】**

如請求項52之方法或用途，其中該個體需免疫抑制。

**【請求項54】**

如請求項52或53之方法或用途，其用於治療免疫疾病。

**【請求項55】**

如請求項52至54中任一項之方法或用途，其用於治療自體免疫疾病。

**【請求項56】**

如請求項55之方法或用途，其中該自體免疫疾病係選自潰瘍性結腸炎、克羅恩氏病(Crohn's disease)、類風濕性關節炎、牛皮癬、多發性硬化症、全身性紅斑狼瘡，及1型糖尿病。

**【請求項57】**

如請求項52至54中任一項之方法或用途，其用於治療移植抗宿主疾病(GvHD)。

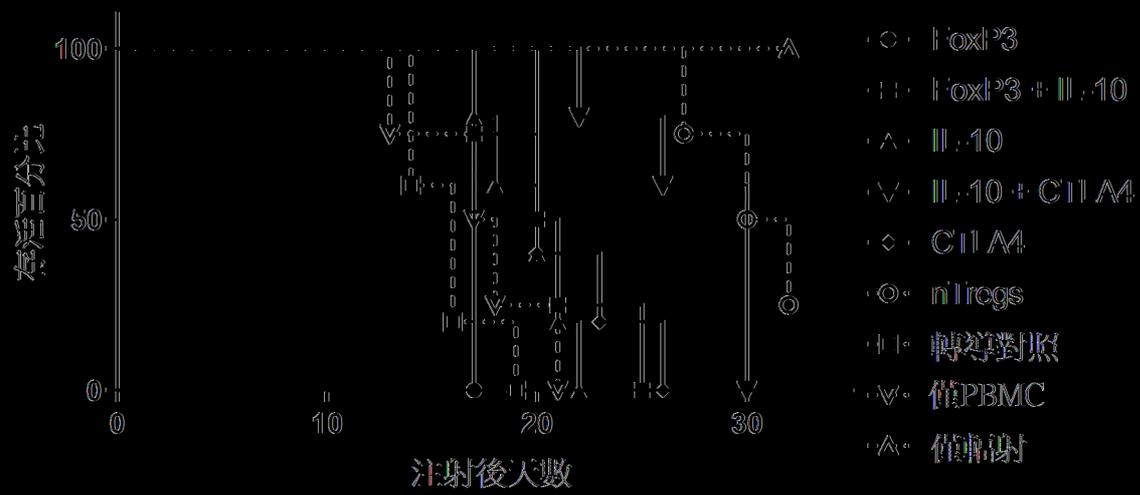




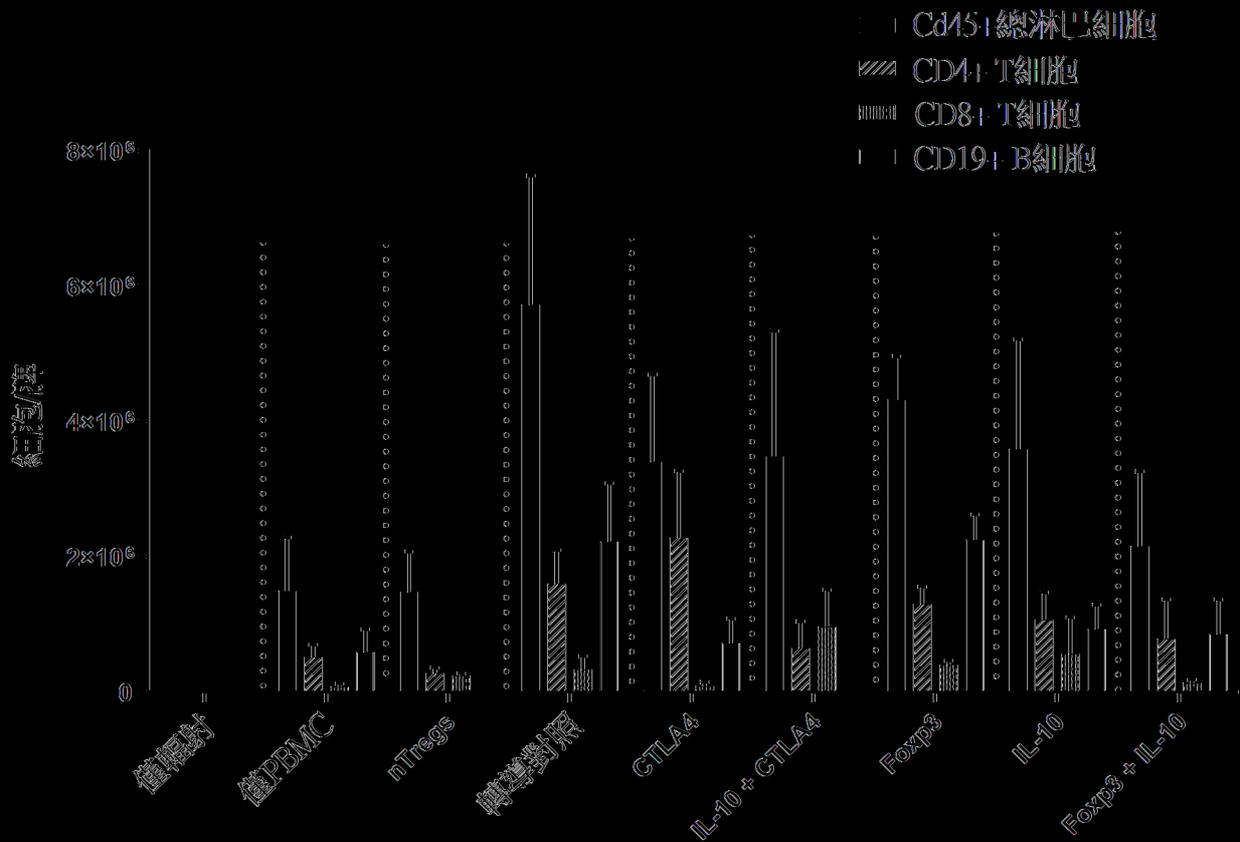




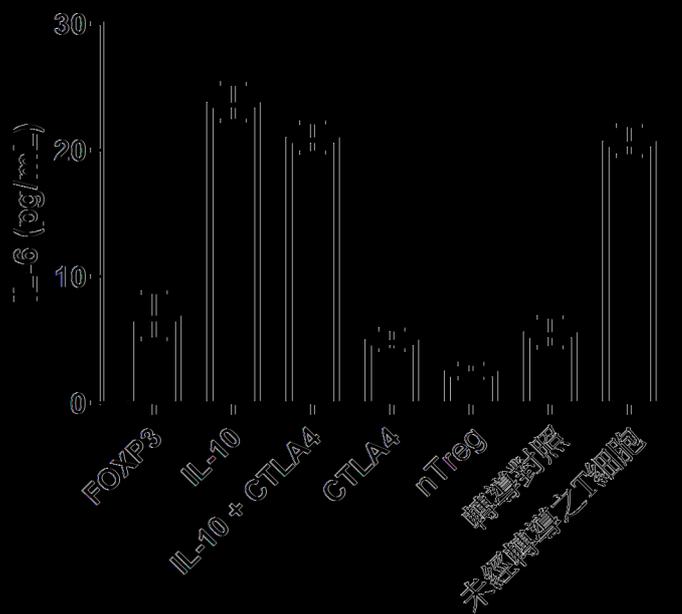




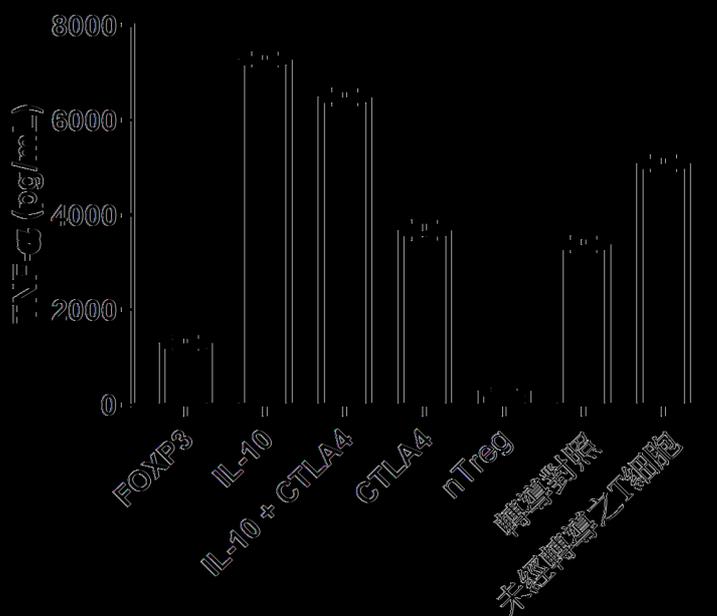
(圖2A)



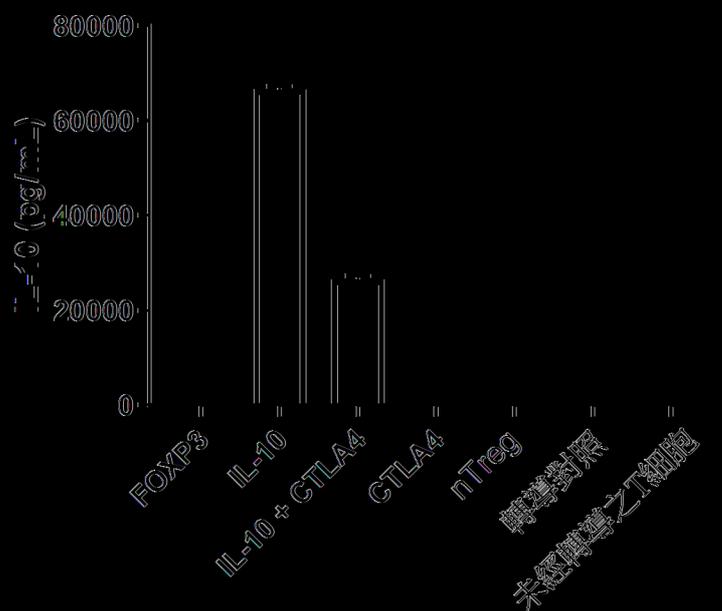
(圖2B)



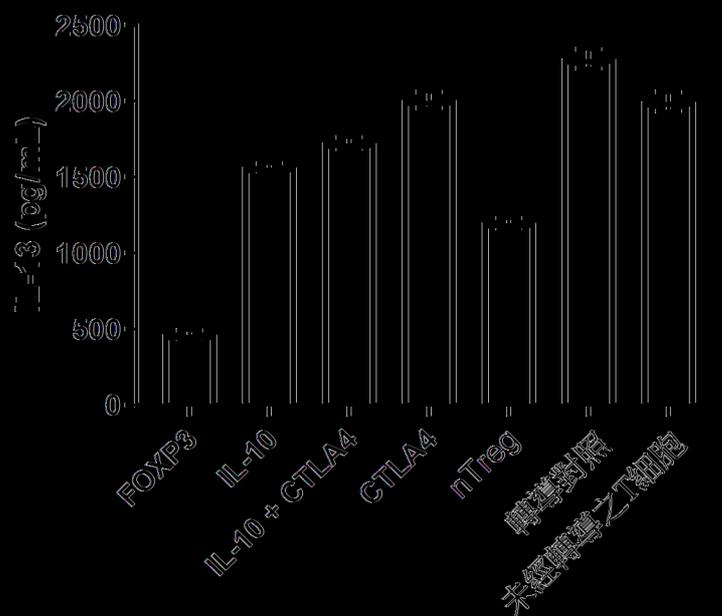
(圖3A)



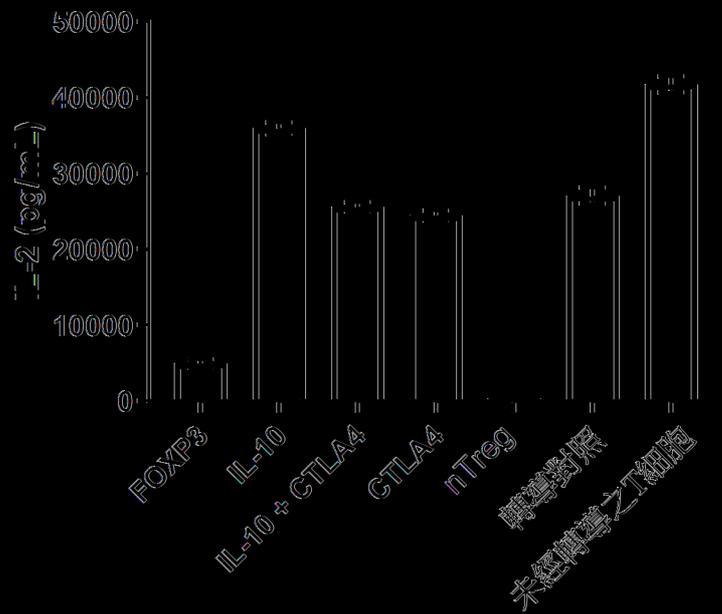
(圖3B)



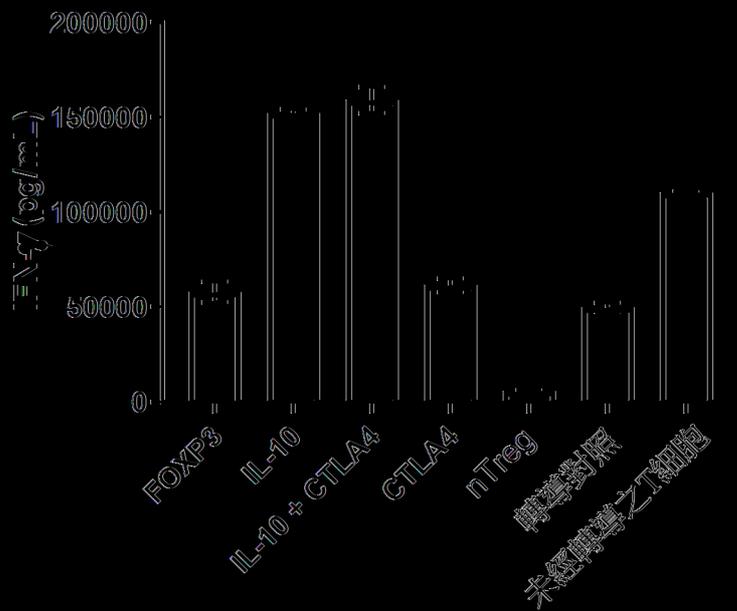
(圖3C)



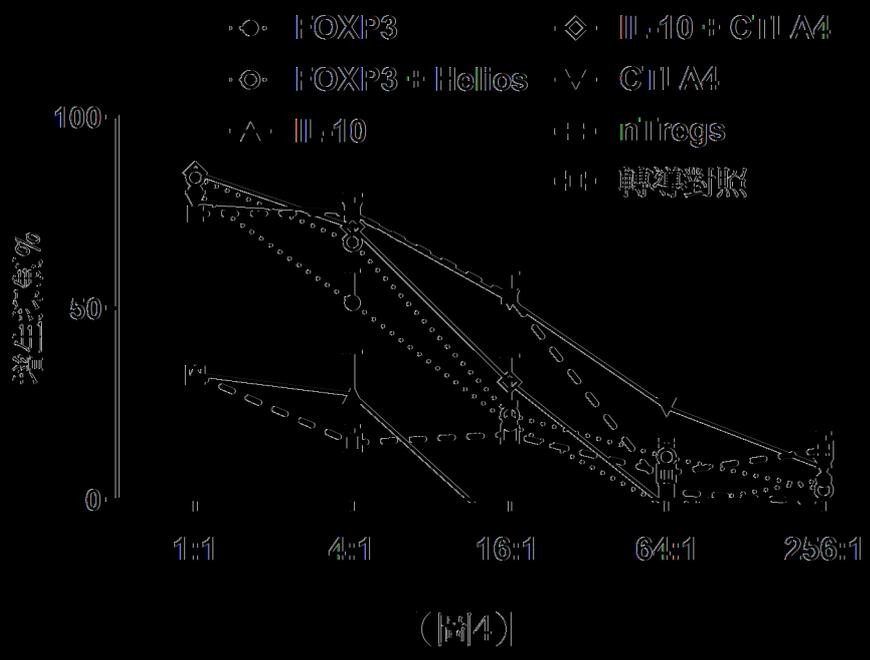
(圖3D)



(E)31E

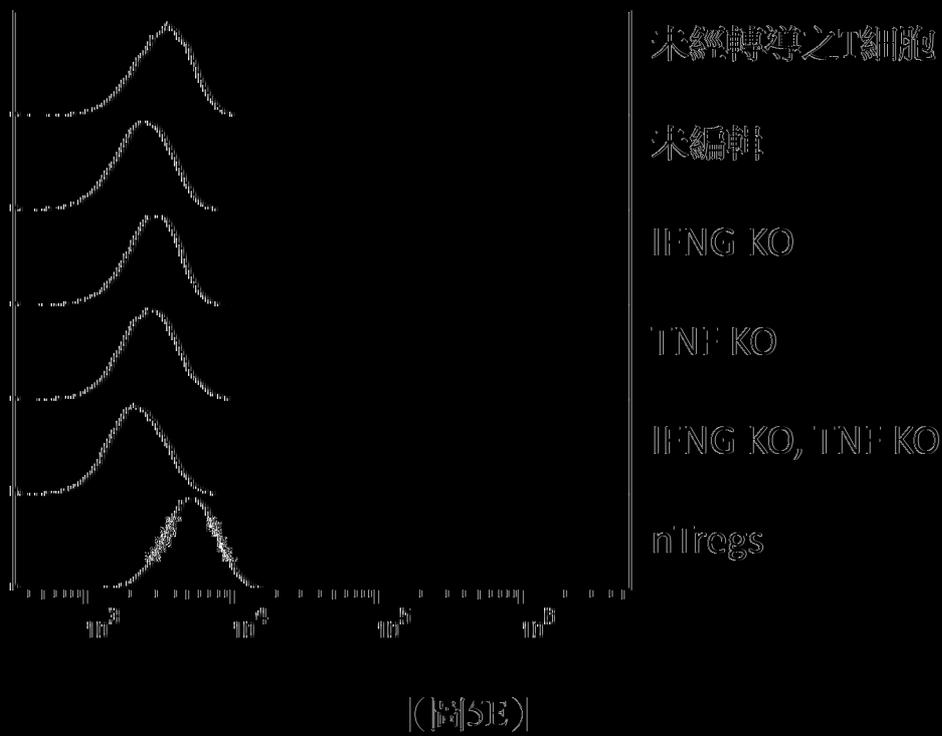


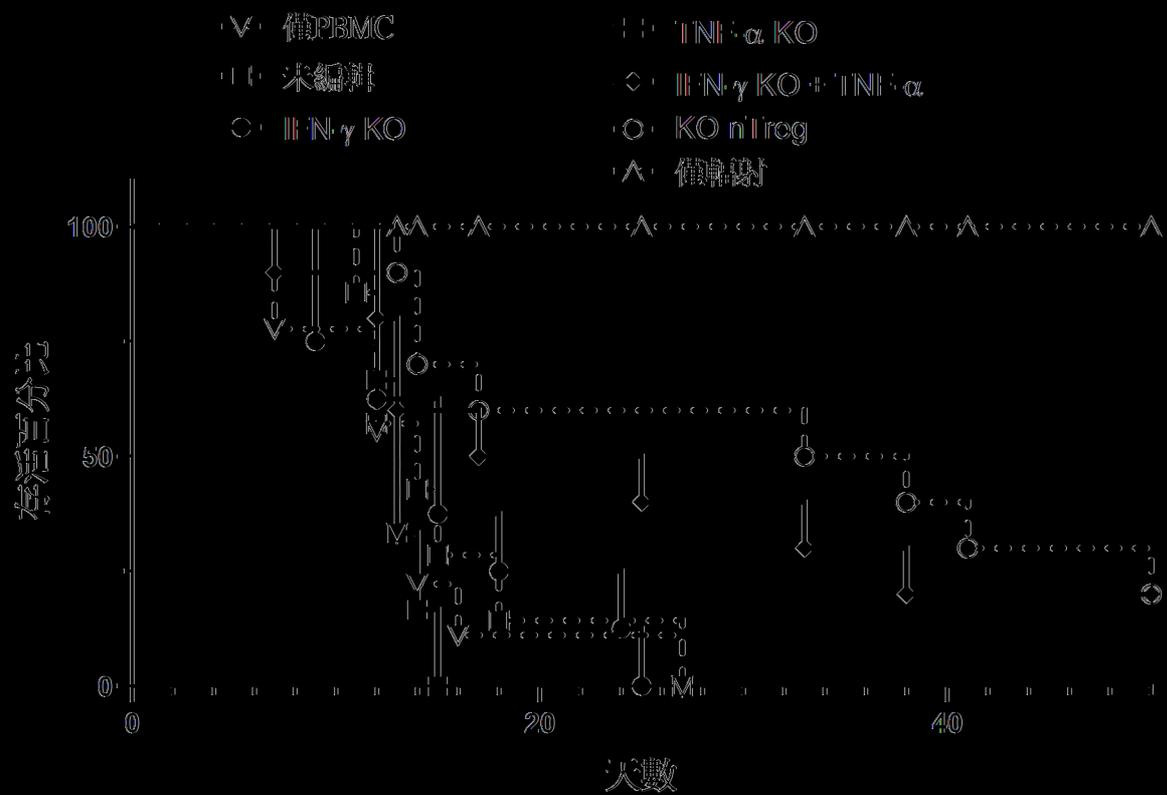
(F)31F



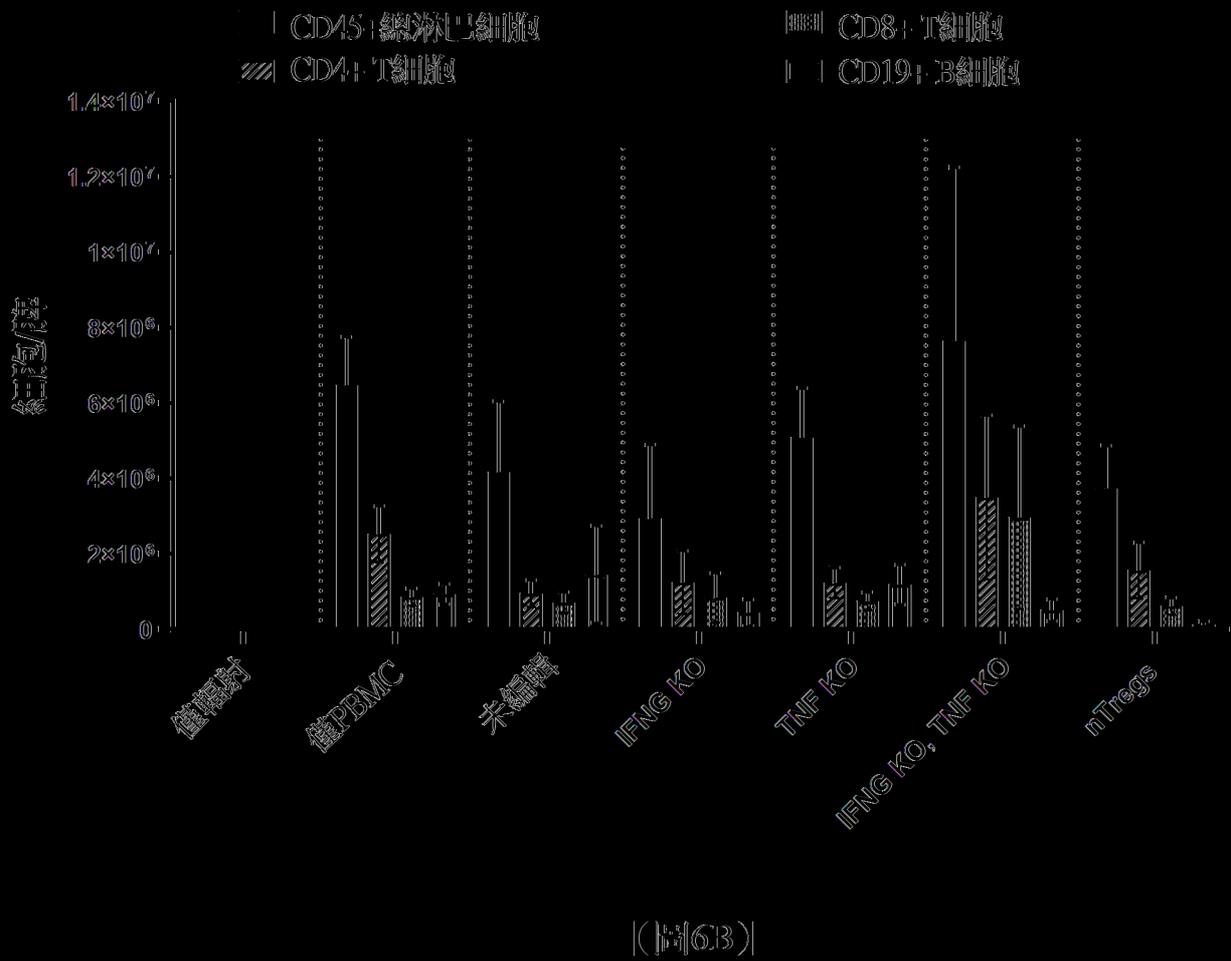


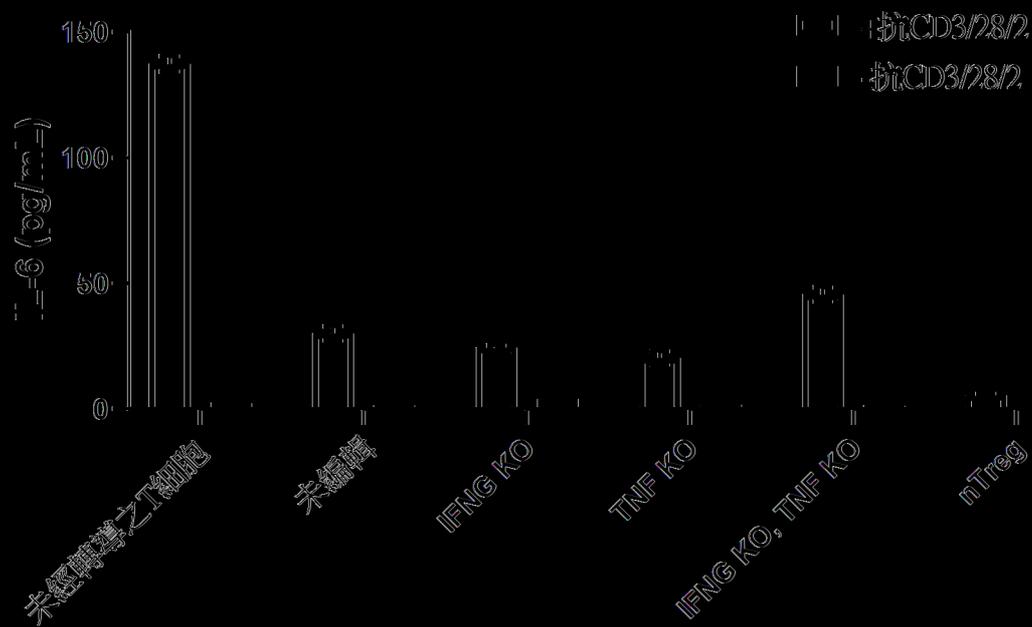




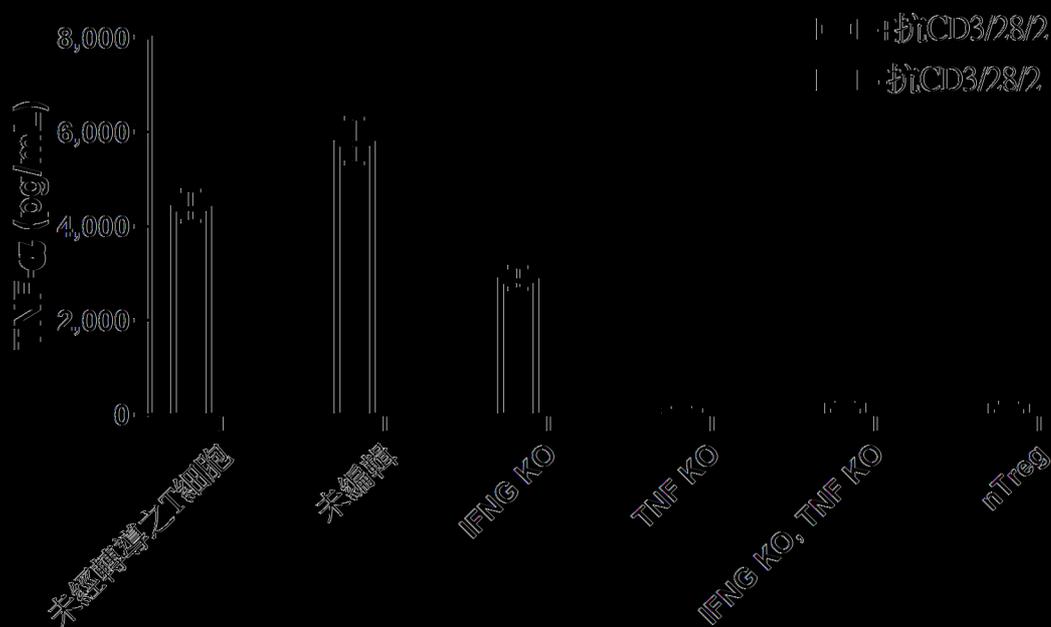


(圖6A)

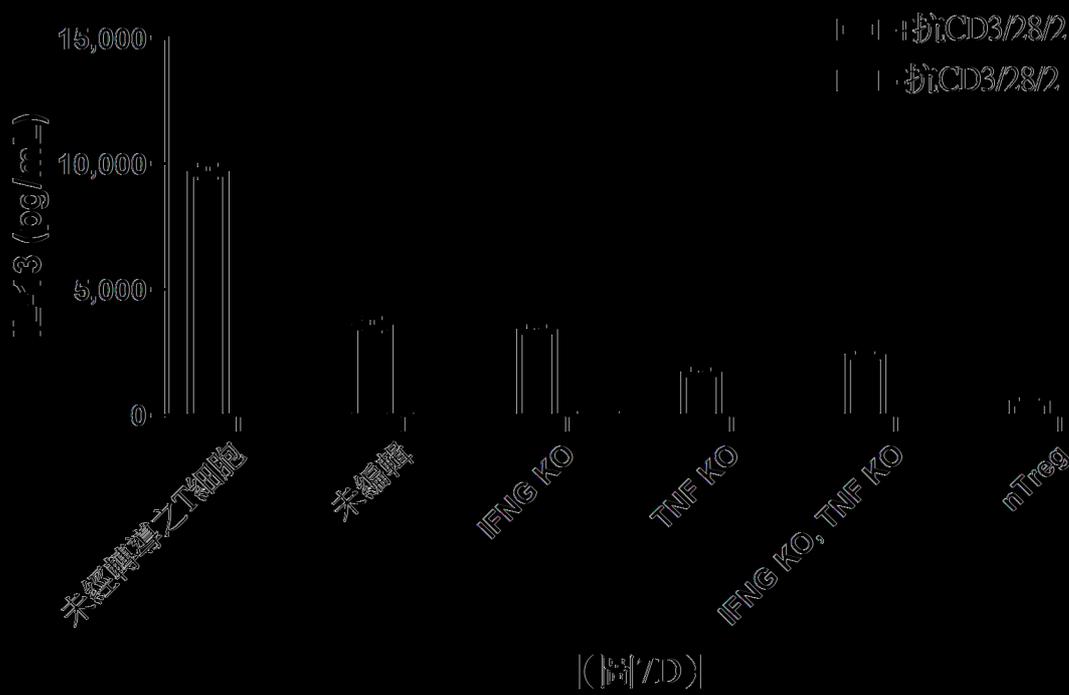
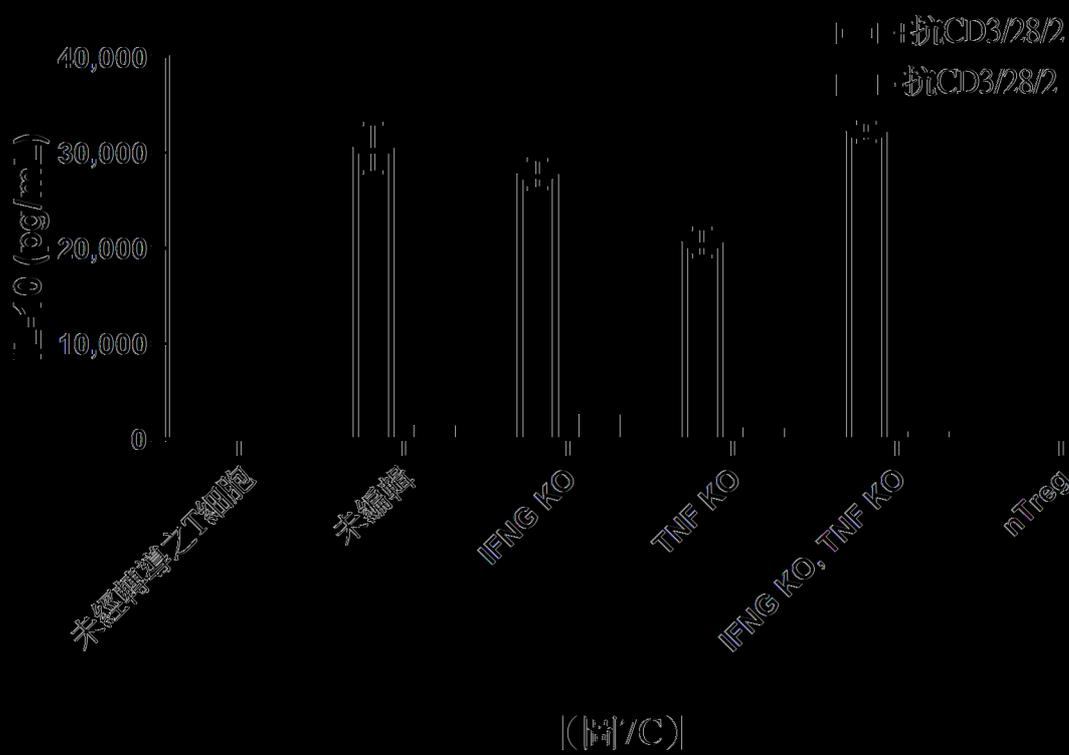


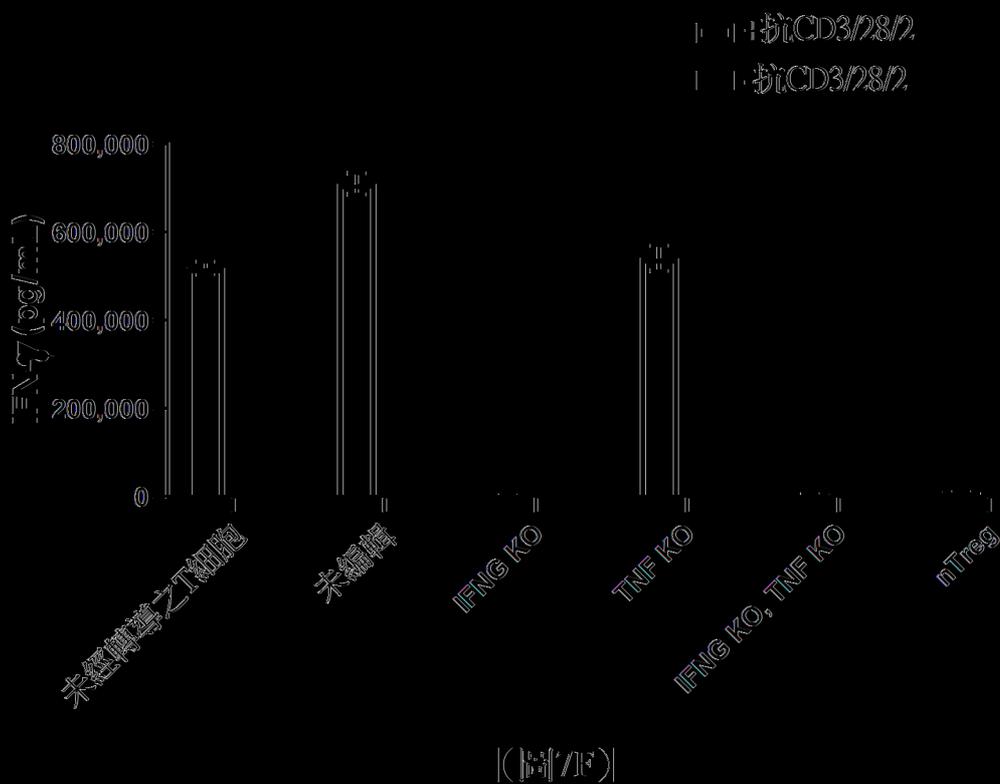
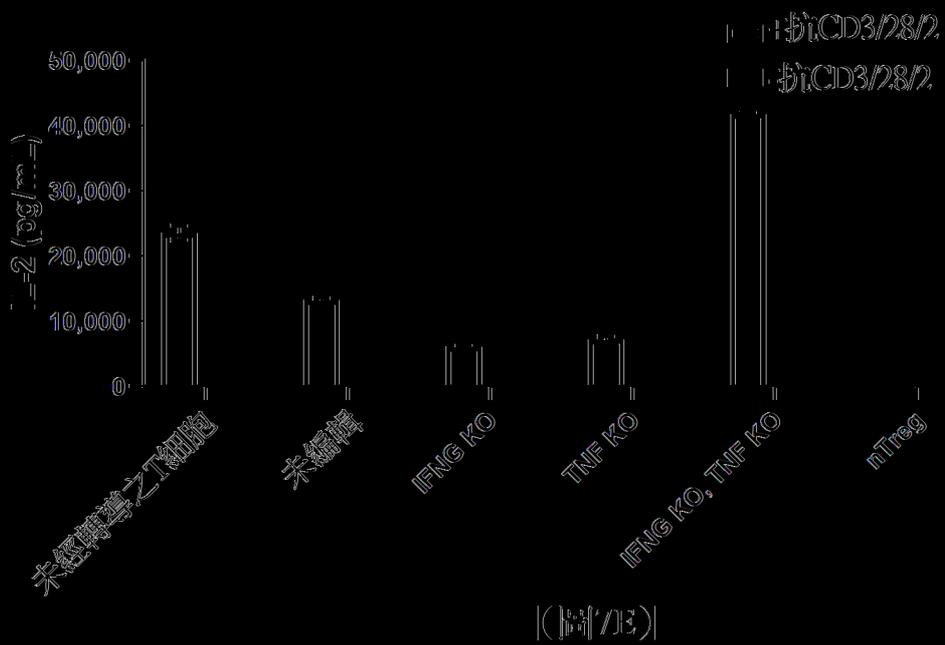


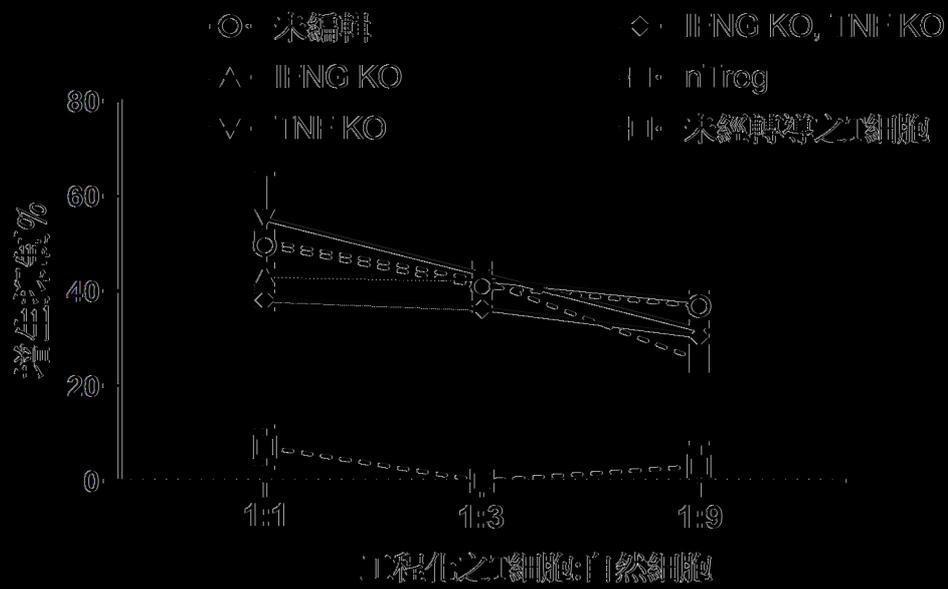
(圖1A)



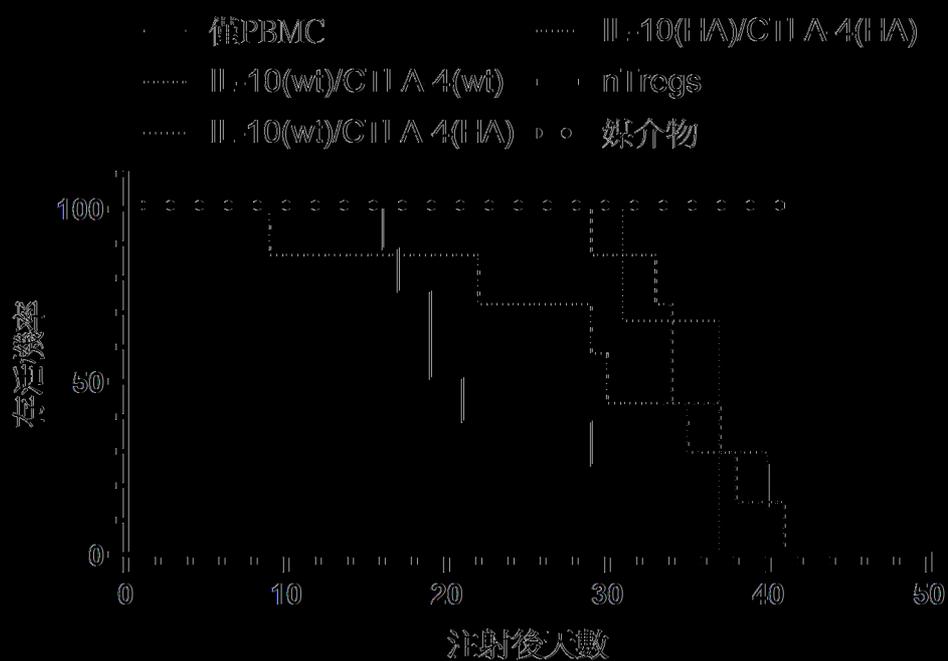
(圖1B)



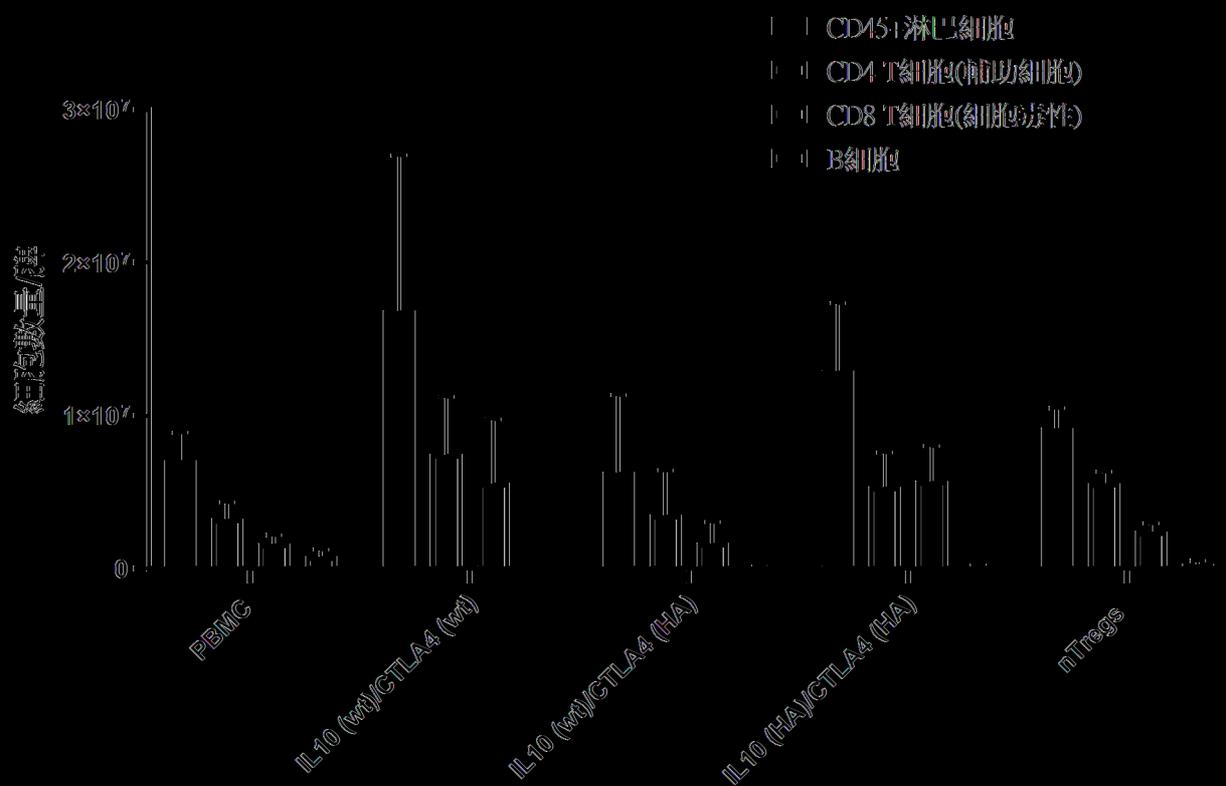




(圖8)



(圖9A)



(圖9B)

