



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201819628 A

(43)公開日：中華民國 107 (2018) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：106137653

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 31 日

(51)Int. Cl.：

C12N15/10 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

C12N15/66 (2006.01)

C12N5/077 (2010.01)

C12N5/0783 (2010.01)

A61K35/17 (2015.01)

A61K35/28 (2015.01)

A61P37/02 (2006.01)

(30)優先權：2016/10/31

世界智慧財產權組織

PCT/US16/59729

(71)申請人：西雅圖兒童醫院以西雅圖兒童研究機構名義經營(美國) SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL (DBA SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE) (US)
美國

(72)發明人：夏倫柏格 安德魯 M SCHARENBERG, ANDREW M. (US)；羅林斯 大衛 J RAWLINGS, DAVID J. (US)；托吉森 特洛伊 TORGERSON, TROY (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：90 項 圖式數：26 共 132 頁

(54)名稱

使用具有工程化穩定表現內源性 FOXP3 基因之 CD4 T 細胞治療自體免疫疾病的方法

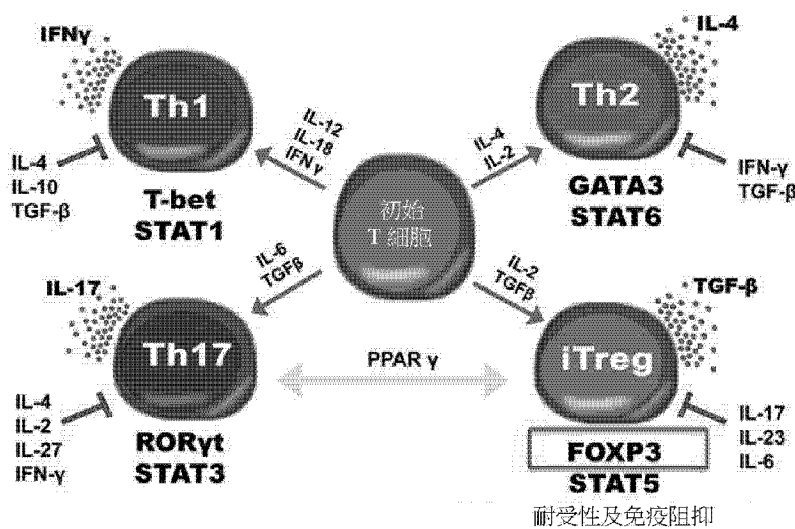
METHOD FOR TREATING AUTOIMMUNE DISEASE USING CD4 T-CELLS WITH ENGINEERED STABILIZATION OF EXPRESSION OF ENDOGENOUS FOXP3 GENE

(57)摘要

本發明揭示製備表現 FOXP3 之遺傳工程化細胞之方法及治療方法。在一些實施例中，該方法可提供第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及 FOXP3 基因或其部分；提供核酸酶；且對該第一核苷酸序列實施基因編輯過程，該基因編輯過程編輯該一或多個調節元件，且視情況編輯該 FOXP3 基因或其部分。亦提供治療患有自體免疫疾病之個體及遭受器官移植效應之個體之方法。

Disclosed are methods of making a genetically cell that expressed FOXP3 and methods of treatment. In some embodiments, the method can providing a first nucleotide sequence, wherein the first nucleotide sequence comprises a coding strand, the coding strand comprising one or more regulatory elements and a FOXP3 gene or portion thereof providing a nuclease and performing a gene editing process on the first nucleotide sequence, which edits said one or more regulatory elements, and optionally edits the FOXP3 gene or portion thereof. Methods of treating a subject suffering from an autoimmune disease and subjects suffering the effects of organ transplantation are also provided.

指定代表圖：



【圖 1】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

使用具有工程化穩定表現內源性FOXP3基因之CD4 T細胞治療自體免疫疾病的方法

【英文發明名稱】

METHOD FOR TREATING AUTOIMMUNE DISEASE USING CD4 T-CELLS WITH ENGINEERED STABILIZATION OF EXPRESSION OF ENDOGENOUS FOXP3 GENE

【技術領域】

本文闡述治療自體免疫疾病及誘導對移植器官之耐受性之方法。該等方法亦可用於嚴重自體免疫疾病及器官移植之細胞療法。

【先前技術】

外周中之免疫自身耐受性可藉由多種細胞對免疫反應施加之負調節來達成，該等細胞中之最佳表徵群體係調節性T細胞(T_{reg})。 T_{reg} 藉由阻抑效應T細胞(T_{eff})之活化並發揮抗炎活性來介導對同種異體抗原之自身耐受性及耐受性。舉例而言，在自體免疫疾病及器官移植之情況下， $CD4+CD25+Foxp3+ T_{reg}$ 係研究及表徵最佳之T細胞之一。

T_{reg} 亦稱為「阻抑性T細胞」。亦闡述具體而言 $CD4+$ 、 $CD25+$ 調節性T細胞可在活體外及活體內展現調節功能且其在活體外阻抑 $CD4+$ 及 $CD8+ T_{eff}$ 之增殖。該等細胞亦顯示在自體免疫性、過敏、發炎及維持母體對胎兒之耐受性、感染及癌症方面起重要作用。已知 T_{reg} 可使免疫反應降低。在癌症中，過量之 T_{reg} 細胞活性可阻止免疫系統破壞癌細胞。在自體免疫疾病中，調節性T細胞活性之缺少可使其他自體免疫細胞攻擊身體

自身組織。

T_{reg} 細胞亦可包括在胸腺中生成之天然(n) T_{reg} 及在外周中生成之誘導型(iT_{reg})。n T_{reg} 在胸腺中出現且可表現叉頭/翼狀螺旋轉錄因子FOXP3，該轉錄因子FOXP3進而控制n T_{reg} 分化。在IL-4、IL-10、TGF- β 及IL-2存在下，在由自身或同種異體抗原刺激之後， iT_{reg} 自記憶及初始CD4+ T_{eff} 在外周中出現。

FOXP3係參與免疫系統反應之蛋白質且由含有11個編碼外顯子之FOXP3基因編碼，其中第一個編碼外顯子在修訂的命名法中命名為外顯子2。FOXP3已表徵為在調節性T細胞之發育及功能中之調節性路徑之主要調節子。在動物研究中，已顯示表現FOXP3之 T_{reg} 在免疫耐受性(例如自身耐受性)之轉移中至關重要。此外已顯示，在糖尿病、多發性硬化、氣喘、發炎性腸病、甲狀腺炎及腎臟病之模型中誘導或投與FOXP3陽性細胞使得自體免疫疾病嚴重程度降低。

先前已提出使用 T_{reg} 治療疾病或在器官移植之情形下阻抑免疫系統。然而，使用t T_{reg} 或p T_{reg} 治療自體免疫疾病之最大障礙之一在於FOXP3表現受到後生調節。在t T_{reg} 中，FOXP3基因中稱為「胸腺特異性去甲基化區」之上游區完全去甲基化，據信此狀態使得FOXP3穩定表現。一般而言，在p T_{reg} 中觀察不到完全去甲基化。在發炎性病狀下，FOXP3可在p T_{reg} 中且有可能在t T_{reg} (儘管一些研究者認為t T_{reg} 完全穩定)中後生沉默，此可潛在地導致p T_{reg} 轉化成促發炎性CD4+ T細胞。p T_{reg} 缺少穩定性係重要問題，此乃因使用回復至發炎性表型之p T_{reg} 輸注可導致自體免疫症狀惡化。因此，需要在 T_{reg} 中誘導FOXP3之安全方法。

【發明內容】

由於調節性T細胞具有誘導抗原特異性耐受性之可能性，因此許多小組關注利用該等細胞治療自體免疫疾病。存在許多形式之調節性T細胞（「T_{reg}」），當前命名法將T_{reg}劃分為以下：在T細胞發育過程中在胸腺中生成之彼等T_{reg}，表示為胸腺調節性T細胞或「tT_{reg}」，及外周誘導之調節性T細胞，表示為外周調節性T細胞或「pT_{reg}」。

調節性T細胞生物學之關鍵方面係轉錄因子FOXP3之表現。認為FOXP3為指定調節性T細胞譜系所必需。此概念係基於觀察到缺少FOXP3之人類在新生兒時期開始產生嚴重自體免疫疾病。然而，使用tT_{reg}或pT_{reg}治療自體免疫疾病之最大障礙在於FOXP3表現受到後生調節。在tT_{reg}中，FOXP3基因中稱為「胸腺特異性去甲基化區」之上游區完全去甲基化，據信此狀態使得FOXP3穩定表現。一般而言，在pT_{reg}中觀察不到完全去甲基化。在發炎性病狀下，FOXP3可在pT_{reg}中且可能在tT_{reg}中後生沉默。此可導致pT_{reg}轉化成促發炎性CD4 T細胞。pT_{reg}缺少穩定性係重要問題，此乃因使用回復至發炎性表型之pT_{reg}輸注可導致自體免疫症狀惡化。

所提出之在CD4 T細胞混合群體中執行FOXP3表現之方法係相對於其他分離天然調節性T細胞群體之方法之改良，此乃因其提供捕獲存在於發炎性T細胞群體中之TCR庫之能力。在患有自體免疫疾病或排斥器官移植之患者中，發炎性T細胞群體中之內源性TCR庫包括具有正確結合特異性以識別器官中之炎性組織或異體組織之TCR。認為該等T細胞介導自體發炎性反應或器官排斥。藉由將混合CD4 T細胞群體之一部分轉化為調節性表型，存在於促發炎性群體中之TCR特異性將表現於治療性細胞群體中。此係相對於基於胸腺調節性T細胞之療法之改良，該等療法被認為具

有與發炎性T細胞不同且不重疊之TCR庫。另外，推測在患有自體免疫疾病或器官排斥之患者中，現有tTreg群體未能產生避免發炎所必需之耐受性。

因此，本文中所闡述之本發明之若干態樣關注使用已經工程化以穩定表現其內源性FOXP3基因之CD4 T細胞來治療或改善自體免疫疾病之方法。本文中所闡述之若干方法利用工程學方法，例如，穩定CD4 T細胞中之FOXP3表現並容許生成潛在阻抑性T細胞之擴增群體，該等群體不再易受其阻抑功能之後生修飾影響。因此，此等細胞將具有用於治療應用之改良性質。

在第一態樣中，提供製備用於表現FOXP3之核酸之方法，其中該方法包含提供第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供核酸酶；且對該第一核苷酸序列實施基因編輯過程，該基因編輯過程編輯該一或多個調節元件，且視情況編輯該FOXP3基因或其部分。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在一或多個調節元件處。在一些替代方案中，靶向基因座係在FOXP3基因或其部分處。在一些替代方案中，FOXP3基因或其部分包含第一天然編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，基因編輯過程係用於插入異源啟動子、異源轉錄增強子結構域或二者之基因敲入過程。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，啟動子係EF1 α 啟動子、PGK

啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，啟動子係異源弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入異源轉錄增強子結構域，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入誘導型效應子。在一些替代方案中，誘導型效應子可藉由類固醇或藥物誘導。在一些替代方案中，插入異源啟動子，其中該異源啟動子之插入生成第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在編碼鏈上第一編碼外顯子上游之任何位置處，且其中該編碼鏈進一步包含FOXP3基因之起始密碼子。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上第一天然外顯子上游之任何位置處插入，且其中該編碼鏈進一步包含FOXP3基因之起始密碼子。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。

在第二態樣中，提供藉由本文中任一替代方案之任一方法所製得之用於FOXP3表現之核酸。該方法包含提供第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供核酸酶；且對該第一核苷酸序列實施基因編輯過程，該基因編輯過程編輯該一或多個調節元件，且視情況編輯該FOXP3基因或其部分。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成

基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在一或多個調節元件處。在一些替代方案中，靶向基因座係在**FOXP3**基因或其部分處。在一些替代方案中，**FOXP3**基因或其部分包含第一天然編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係**Cas9**、鋅指核酸酶或**TALEN**。在一些替代方案中，基因編輯過程係用於插入異源啟動子、異源轉錄增強子結構域或二者之基因敲入過程。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，啟動子係**EF1 α** 啟動子、**PGK**啟動子或**MND**啟動子。在一些替代方案中，啟動子係異源弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入異源轉錄增強子結構域，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入遍在染色質開放元件(**UCOE**)。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入誘導型效應子。在一些替代方案中，誘導型效應子可藉由類固醇或藥物誘導。在一些替代方案中，插入異源啟動子，其中該異源啟動子之插入生成第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在編碼鏈上第一編碼外顯子上游之任何位置處，且其中該編碼鏈進一步包含**FOXP3**基因之起始密碼子。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上第一天然外顯子上游之任何位置處插入，且其中該編碼鏈進一步包含**FOXP3**基因之起始密碼子。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進

行遺傳修飾。

在第三態樣中，提供核酸，該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含異源調節元件及異源啟動子，該等異源調節元件及異源啟動子可操作地連接至FOXP3基因或其部分，其中該FOXP3基因或其部分包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游位置處。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。

在第四態樣中，提供製備遺傳工程化細胞之方法，該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中用於基因編輯過程。在一些替代方案中，基因編輯過程係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然編碼

外顯子或第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍之間的任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源增強子結構域(例如，TCRa增強子)插入至第一核苷酸序列中，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在遺傳修飾期間在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入，或遺傳修飾得到藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在該合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。

在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

在第五態樣中，提供用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞，其係藉由本文中任一替代方案之方法製造。提供製備遺傳工程化細胞之方法，該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中用於基因編輯過程。在一些替代方案中，基因編輯過程係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然編碼外顯子或第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍之間的任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源增強

子結構域(例如，TCRa增強子)插入至第一核苷酸序列中，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在遺傳修飾期間在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入，或遺傳修飾得到藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在該合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

在第六態樣中，提供用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞，其中該遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄增強子結構

域。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

在第七態樣中，提供組合物，其包含本文中任一替代方案之細胞中之任一或多種之遺傳工程化細胞及醫藥賦形劑。用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞可藉由本文中任一替代方案所提供之方法來製造。提供製備遺傳工程化細胞之方法，該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中用於基因編輯過程。在一些替代方案中，基因編輯過程係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然編碼外顯子或第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍之間的任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替

代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源增強子結構域(例如，TCRa增強子)插入至第一核苷酸序列中，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在遺傳修飾期間在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入，或遺傳修飾得到藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在該合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動

子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

在第八態樣中，提供治療、抑制或改善個體之自體免疫病症之方法，該方法包含：向該個體投與本文中任一替代方案之任一或多種細胞之遺傳修飾細胞或任一替代方案所提供之組合物。提供包含本文中任一替代方案之細胞中之任一或多種之遺傳工程化細胞及醫藥賦形劑之組合物。用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞可藉由本文中任一替代方案所提供之方法來製造。提供製備遺傳工程化細胞之方法，該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中用於基因編輯過程。在一些替代方案中，基因編輯過程係

將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然編碼外顯子或第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍之間的任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源增強子結構域(例如，TCRa增強子)插入至第一核苷酸序列中，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在遺傳修飾期間在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入，或遺傳修飾得到藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在該合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插

入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，自體免疫疾病係類風濕性關節炎、糖尿病、發炎性腸病、IPEX (免疫失調、多內分泌病、腸病、X-連鎖(IPEX)症候群)、克隆氏病(Crohn's disease)、多發性硬化、特發

性或全身性紅斑狼瘡。在一些替代方案中，鑑別或選擇個體以接受用於自體免疫疾病之療法。

在第九態樣中，提供治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用之方法，該方法包含：向該個體投與本文中任一替代方案之任一或多種細胞之遺傳修飾細胞或任一替代方案所提供之組合物。提供包含本文中任一替代方案之細胞中之任一或多種之遺傳工程化細胞及醫藥賦形劑之組合物。用於表現**FOXP3**之遺傳工程化細胞可藉由本文中任一替代方案所提供之方法來製造。提供製備遺傳工程化細胞之方法，該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及**FOXP3**基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中用於基因編輯過程。在一些替代方案中，基因編輯過程係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然編碼外顯子或第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍之間的任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係**Cas9**、鋅指核酸酶或**TALEN**。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係**EF1 α**啟動子、**PGK**啟動子或**MND**啟動子。在一些

替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源增強子結構域(例如，TCRa增強子)插入至第一核苷酸序列中，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在遺傳修飾期間在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入，或遺傳修飾得到藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在該合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4+之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導

型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

在第十態樣中，提供治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用(例如器官排斥)之方法，該方法包含：向該個體投與本文中任一替代方案之任一或多種細胞之遺傳修飾細胞或任一替代方案所提供之組合物。提供包含本文中任一替代方案之細胞中之任一或多種之遺傳工程化細胞及醫藥賦形劑之組合物。用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞可藉由本文中任一替代方案所提供之方法來製造。提供製備遺傳工程化細胞之方法，該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中用於基因編輯過程。在一些替代方案中，基因編輯過程係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包

含天然編碼外顯子或第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍之間的任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源增強子結構域(例如，TCRa增強子)插入至第一核苷酸序列中，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在遺傳修飾期間在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入，或遺傳修飾得到藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在該合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4+

之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4+之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4+之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

在第十一態樣中，提供治療、抑制或改善個體之自體免疫病症之方法，該方法包含自有需要之個體取出細胞，其中該等細胞包含第一核苷酸

序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件、**FOXP3**基因或其部分，其中該**FOXP3**基因或其部分包含第一編碼外顯子；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；將該第二核苷酸序列或蛋白質核酸酶引入至該細胞中進行遺傳修飾，其中該遺傳修飾係將啟動子插入至該第一核苷酸序列中之基因敲入過程；及將該細胞引入至該個體中用於治療、抑制或改善。在一些替代方案中，自體免疫疾病係類風濕性關節炎、糖尿病、發炎性腸病、**IPEX**（免疫失調、多內分泌病、腸病、**X-連鎖(IPEX)**症候群）、克隆氏病、多發性硬化、特發性或全身性紅斑狼瘡。在一些替代方案中，鑑別或選擇個體以接受用於自體免疫疾病之療法。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現**CD4+**之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現**CD8+**之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性**T**細胞。

在第十二態樣中，提供治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用之方法，該方法包含自有需要之個體取出細胞，其中該等細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件、**FOXP3**基因或其部分，其中該**FOXP3**基因或其部分包含第一編碼外顯子；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；將該第二核苷酸序列或蛋白質核酸酶引入至該細胞中進行遺傳修飾，其中該遺傳修飾係將啟動子插入至該第一核苷酸序列中之基因敲入過程；及將該細胞引入至該個體中用於治療、抑制或改善。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現**CD4+**之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現**CD8+**之細胞。

在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

在第十三態樣中，提供治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用(例如器官排斥)之方法，該方法包含自有需要之個體取出細胞，其中該等細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件、**FOXP3**基因或其部分，其中該**FOXP3**基因或其部分包含第一編碼外顯子；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；將該第二核苷酸序列或蛋白質核酸酶引入至該細胞中進行遺傳修飾，其中該遺傳修飾係將啟動子插入至該第一核苷酸序列中之基因敲入過程；及將該細胞引入至該個體中用於治療、抑制或改善。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現**CD4+**之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現**CD8+**之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

【圖式簡單說明】

圖1： **FOXP3**促進T_{reg}譜係。如圖中所顯示，初始T細胞表現IL-12、IL-18、IFN γ 、IL-6、TGF- β 、IL-4及IL-2，其進而調節TH1、TH17、TH2及iTreg。T_{reg}在多種自體免疫疾病(IPEX、T1D、SLE、RA、EAE等)中起關鍵性作用。增加人類Treg數量或功能之方法處於目前試驗中，包括低劑量IL-2及自體擴增Treg之過繼性轉移。IL-2療法之效能由於其多向性活性及可增加發炎之潛在「脫靶」效應而受到限制。過繼性Treg療法可能受限於所擴增Treg之活體內穩定性及存活率及其相關抗原特異性之缺少。

圖2： T細胞編輯工具。如圖中所顯示，用於核酸酶及修復模板共遞送之有效方法已就位用於本文中所提供之替代方法。如所顯示，T細胞活化並擴增。利用CD3/CD28珠粒刺激T細胞，然後將該等珠粒去除。然後

經由mRNA電穿孔實施TALEN遞送。藉由腺相關病毒遞送編輯模板。

圖3：藉助基因編輯執行FOXP3表現。如本文之替代方案中所闡述，可使用藉助基因編輯之FOXP3表現來繞過後生調節。在FOXP3編碼區上游穩定、位點特異性整合啟動子之設計可超越傳統對照。Foxp3表現係傳統地藉助第一編碼外顯子(外顯子2)上游之內含子區(內含子1)之後生調節來控制。在休眠初始T細胞中，FOXP3基因座後生地「關閉」(FOXP3-)。胸腺源天然Treg具有「開放」基因座(FOXP3+)。誘導之Treg (iTreg)具有部分開放之基因座(FOXP3+ ---不穩定)。

圖4：進行HDR靶向來工程化FOXP3+穩定化細胞。如圖中所顯示，FOXP3基因之後生調節位點位於FOXP3基因上游。為工程化FOXP3+穩定化T細胞，提供T細胞且首先利用CD3/CD28活化。藉由腺相關病毒遞送編輯模板，並將編碼核酸酶之mRNA引入至T細胞中以工程化基因編輯之T細胞。

圖5：基因編輯模板設計高度靈活。如圖中所顯示，構築五個構築體：GOXP3 [GFP-ex2]、FOXP3 [MND-GFP-ex2]、FOXP3 [MND-EGFRt.t2A-ex2]、FOXP3 [MND-IL10.t2A.GFP-ex2]及FOXP3 [缺失-內含子1.GFP]。

圖6顯示基因編輯有效地靶向FOXP3基因並驅動轉基因之高表現。如圖中所顯示，與未將TALEN核酸酶引入至T細胞中之細胞相比，經工程化以在MND啟動子控制下表現融合至內源性FOXP3基因之N末端之GFP的細胞顯示高程度之GFP-FOXP3融合蛋白表現。

圖7：經編輯細胞在靶向位點顯示無縫HR介導之整合。利用所指示之引子組(即對應於圖上之紅色箭頭位置)實施PCR，且藉由瓊脂糖凝膠電

泳分析所得PCR產物。若發生精確靶向整合，則使用一個在靶向模板外部之引子(引子1或引子2)及一個內部引子(引子3或引子4)之PCR將僅顯示正確大小的條帶。左側凝膠片段展示在模擬編輯之細胞中缺少靶向整合，而右側凝膠片段顯示在經編輯細胞中存在正確大小的條帶。

圖8： GFP/FOXP3融合產生一致之高Foxp3表現程度。如圖中所顯示，相對於模擬編輯之細胞，GFP FOXP3融合誘導在MND啟動子控制下之FOXP3表現。所示為在模擬編輯之細胞中對經編輯細胞中FOXP3表現之流式細胞術分析，其中FOXP3表現顯示於Y軸上，且前向散射顯示於x軸上。

圖9： GFP/FOXP3融合產生一致之高Foxp3表現程度。如圖中所顯示，相對於模擬編輯之細胞，GFP FOXP3融合誘導在MND啟動子控制下之FOXP3表現。所示為在模擬編輯之細胞中對經編輯細胞中FOXP3表現及GFP表現之流式細胞術分析，其中FOXP3表現顯示於每一圖之Y軸上，且GFP顯示於x軸上。

圖10： 圖解說明表面標記物及細胞介素表型之Treg細胞之草圖。

圖11： 經編輯細胞表面表型。如圖中所顯示，藉由流式細胞術分析穩定表現FOXP3之工程化T細胞之CD25、CD127、CTLA4及LAG3表現。類似於天然調節性T細胞，工程化細胞表現高CD25、低CD127及高CTLA4及Lag3。

圖12： 經編輯細胞之細胞介素表現譜。如圖中所顯示，與模擬編輯之T細胞相比，工程化細胞顯示細胞內細胞介素表現之T_{reg}樣譜，其中IL2、IL4及IFN- γ 表現較低。

圖13： 經編輯細胞之細胞介素表現譜。如在條形圖中所顯示，相對

於模擬編輯之細胞，穩定表現FOXP3之工程化T細胞顯示高IL-10表現。

圖14：IL2/STAT5信號傳導敏感性。天然Treg由於其高CD25表現而對IL2高度敏感。藉由在活體外暴露於不同濃度之IL2，比較模擬編輯及經編輯細胞對IL2信號傳導之敏感性。對IL2之反應係根據STAT5之磷酸化程度來量測。如可見，相對於模擬編輯之細胞，經編輯細胞之stat5磷酸化在顯著較低之IL2濃度下指示IL2信號傳導。自頂部至底部之輪廓係：0.1 ng/ml IL/2、1 ng/ml IL/2、10 ng/ml IL/2、100 ng/ml IL/2及無刺激。

圖15：IL2/STAT5信號傳導敏感性(FOXP3+子集)。天然Treg由於其高CD25表現而對IL2高度敏感。藉由在活體外暴露於不同濃度之IL2，比較模擬編輯及經編輯細胞對IL2信號傳導之敏感性。對IL2之反應係根據STAT5之磷酸化程度來量測。如可見，相對於模擬編輯之細胞，經編輯細胞之stat5磷酸化在顯著較低之IL2濃度下指示IL2信號傳導。自頂部至底部之輪廓係：0.1 ng/ml IL/2、1 ng/ml IL/2、10 ng/ml IL/2、100 ng/ml IL/2及無刺激。

圖16：讀取調節性T細胞之阻抑活性之分析之示意圖。將經CFSE標記之反應細胞與經編輯之Treg或模擬編輯之細胞混合，並用珠粒刺激。根據96小時之CFSE稀釋之程度讀取分析。

圖17：經編輯之T細胞可抑制T_{eff}增殖。與模擬編輯之細胞一起培育之反應細胞能夠藉助其增殖顯著稀釋CFSE標記，而與工程化GFP+細胞一起培育之反應細胞大部分保持未分裂(保留大量標記)。

圖18：經編輯細胞之功能活性：使用來自IPEX個體之經編輯之T細胞缺少對T_{eff}增殖之阻抑。使用與圖17相同之分析，模擬編輯或編輯正常患者對照細胞或IPEX患者細胞以執行天然FOXP3基因之表現。相對於模

擬編輯之細胞，將經編輯之健康對照細胞與反應細胞一起培育阻抑反應細胞之CFSE稀釋，而相對於模擬編輯之細胞，培育經編輯之IPEX患者細胞則顯示未阻抑增殖。

圖19：經由FOXP3基因編輯生成抗原特異性T_{reg}-表型細胞。如所顯示，編輯技術可應用於在多種自體免疫疾病中所出現之致病性T細胞純系。顯示對使用對Flu抗原具有特異性之四聚體分離之T細胞純系進行之編輯成功生成穩定表現FOXP3之T細胞。

圖20：經編輯之T細胞之表型。如圖中所顯示，穩定表現FOXP3之T細胞表現CTLA4及LAG3。

圖21：經編輯之GFP-FOXP3 T細胞之表型及功能。如圖中所顯示，穩定表現FOXP3之T細胞具有表型變化(CD25⁺、CD45RO⁺、CCR7及CD38/CTLA-4/LAP)。該等穩定表現FOXP3之T細胞亦顯示細胞內細胞介素表現(IL-2、IFN- γ 及IL-4)之T_{reg}樣譜。當以10 ng至100 ng投與時，pSTAT5信號傳導亦對IL-2敏感。

圖22：活體內GvHD實驗。所示為準備活體內GvHD實驗之時間線。首先輻照小鼠以破壞髓細胞。然後將穩定表現FOXP3之工程化T_{reg}輸注至小鼠中，隨後輸注T_{eff}細胞。在輸注後1-50天之間，然後監測小鼠之體重並研究外周血及不同器官中之T細胞百分比。

圖23：活體內GvHD實驗。如所顯示，圖表顯示接受效應細胞(ET，紅色圓圈)、效應細胞及模擬編輯之T細胞(藍色正方形)以及效應細胞及經編輯之FOXP3穩定化T-reg (綠色三角形)之小鼠之存活百分比。經編輯之foxp3穩定化Treg產生實質之存活優點，此指示其改善由效應細胞產生之異種GvHD之能力。

圖24：經編輯之T細胞中之TSDR CpG甲基化。第一編碼外顯子(實際外顯子2)上游調節區之甲基化如何調節FOXP3基因之示意圖。

圖25：分析純系之甲基化。每一黑點指示跨越T細胞純系之TSDR之PCR片段中之甲基化CpG二核苷酸。如可見，CD25陰性細胞具有高度甲基化之TSDR，指示閉合之無活性非表現之FOXP3基因座，而高CD25細胞(天然Treg)顯示幾乎一致之完全去甲基化之TSDR。

圖26：經編輯之T細胞中之TSDR甲基化。儘管已知高程度之FOXP3表現，但經編輯之T細胞顯示完全甲基化之TSDR，此表明在TSDR下游整合啟動子有效地繞過FOXP3基因座之正常後生調節。

【實施方式】

較佳實施例之詳細闡述

本文闡述使用已經工程化之CD4 T細胞以穩定表現其內源性FOXP3基因來治療或改善自體免疫疾病之若干方法。該等方法亦可用於改善移植物抗宿主病(GVHD)之效應。

定義

如本文中所使用，「核酸」或「核酸分子」係指多核苷酸或寡核苷酸，例如去氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、寡核苷酸、藉由聚合酶鏈式反應(PCR)生成之片段及藉由連接、切斷、內核酸酶作用、外核酸酶作用中之任一者及藉由合成生成所生成之片段。核酸分子可由為天然核苷酸(例如DNA及RNA)或天然核苷酸之類似物(例如，天然核苷酸之鏡像異構形式)或二者之組合之單體構成。經修飾之核苷酸可在糖部分中及/或在嘧啶或嘌呤鹼基部分中具有改變。糖修飾包括(例如)利用鹵素、烷基、胺及疊氮基替代一或多個羥基，或可將糖功能化為醚或酯。此外，整個糖部

分可經立體及電子上相似之結構(例如氮雜糖及碳環糖類似物)替代。鹼基部分中修飾之實例包括烷基化嘌呤及嘧啶、醯化嘌呤或嘧啶或其他熟知之雜環取代物。核酸單體可藉由磷酸二酯鍵或此等鏈接體之類似物連接。磷酸二酯鏈接體之類似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺基硫代磷酸酯、苯胺基磷酸酯或胺基磷酸酯。術語「核酸分子」亦包括所謂的「肽核酸」，其包含附接至聚醯胺主鏈之天然或經修飾之核酸鹼基。核酸可為單鏈或雙鏈。

如本文中所闡述之「編碼鏈」係具有與所產生之RNA轉錄物相同之鹼基序列(但胸腺嘧啶由尿嘧啶替代)之DNA鏈。此鏈含有密碼子，而非編碼鏈含有反密碼子。

如本文中所闡述之「調節元件」係指核酸分子區段，其能夠增加或減少生物體內特定基因之表現。基因表現之調節係所有存活生物體及病毒之基本特徵。在不受限制之情形下，調節元件之實例可包括CAAT盒、CCAAT盒、普裡布諾(Pribnow)盒、TATA盒、SECIS元件、mRNA多聚腺苷酸化信號、A盒、Z盒、C盒、E盒、G盒、激素反應元件，例如胰島素基因調節序列、DNA結合結構域、活化結構域及/或增強子結構域。

如本文中所闡述之「FOXP3」係參與免疫系統反應之蛋白質。FOXP3基因含有11個編碼外顯子。Foxp3係天然調節性T細胞(nT_{reg}，T細胞譜系)及適應性/誘導調節性T細胞(a/iT_{reg})之特異性標記物。在動物研究中，Foxp3陽性T細胞之誘導或投與顯示在糖尿病、多發性硬化、氣喘、發炎性腸病、甲狀腺炎及腎臟病之模型中使得(自體免疫)疾病嚴重程度顯著降低。然而，T細胞已能夠在研究中顯示可塑性。因此，在療法中使用調節性T細胞可具風險性，此乃因轉移至患者中之調節性T細胞可變為輔

助性T 17 (Th17)細胞，其係促發炎細胞而非調節性細胞。因此，本文中提供方法以避免可自調節性細胞變為促發炎性細胞引起之風險。如圖1中所顯示，自iTreg表現之FOXP3係用作免疫系統之主要調節子且用於耐受性及免疫阻抑。Treg在多種自體免疫疾病(IPEX、T1D、SLE、RA、EAE等)中起關鍵性作用。增加人類Treg數量或功能之方法處於目前試驗中，包括低劑量IL-2及自體擴增Treg之過繼性轉移。IL-2療法之效能由於其多向性活性及可增加發炎之潛在「脫靶」效應而受到限制。過繼性Treg療法可能受限於所擴增Treg之活體內穩定性及存活率及其相關抗原特異性之缺少。

如本文中所闡述之「核酸酶」係能夠裂解核酸之核苷酸亞單元之間的磷酸二酯鍵之蛋白質或酶。本文中所闡述之核酸酶係用於「基因編輯」，其係使用核酸酶或一或多種工程化核酸酶在活生物體之基因體中插入、缺失或替代DNA之一種遺傳工程類型。在不受限制之情形下，核酸酶可係CRISPR/CAS9系統之核酸酶、鋅指核酸酶或TALEN核酸酶。核酸酶可用於靶向基因座或核酸序列上之靶向基因座。

如本文中所闡述之「編碼外顯子」係指將編碼最終成熟RNA之一部分之基因的任何部分，該最終成熟RNA係在藉由RNA剪接去除內含子之後由該基因所產生。術語外顯子係指基因內之DNA序列及RNA轉錄物中之相應序列二者。在RNA剪接中，內含子去除且外顯子彼此共價接合作為生成成熟信使RNA之一部分。

如本文中所闡述之「Cas9」係與CRISPR（規律成簇間隔短迴文重複 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)）適應性免疫性系統相關之RNA引導之DNA內核酸酶。

如本文中所闡述之「鋅指核酸酶」係藉由將鋅指DNA結合結構域融合至DNA裂解結構域所生成之人工限制酶。鋅指結構域可經工程化以靶向特定所期望之DNA序列，且此使得鋅指核酸酶能夠靶向複雜基因體內之獨特序列。

如本文中所闡述之「TALEN」或「轉錄活化子樣效應子核酸酶」係可經工程化以切割DNA之特定序列之限制酶。其係藉由將TAL效應子DNA結合結構域融合至DNA裂解結構域(切割DNA鏈之核酸酶)所製得。轉錄活化子樣效應子(TALE)可經工程化以結合實際上任何所期望之DNA序列，因此當與核酸酶組合時，DNA可在特定位置切割。可將限制酶引入至細胞中，用於基因編輯或用於原位基因體編輯，即稱為利用工程化核酸酶進行基因體編輯之技術。除鋅指核酸酶及CRISPR/Cas9以外，TALEN亦係基因體編輯領域中之突出工具。

如本文中所闡述之「敲入」係指涉及DNA序列資訊與遺傳基因座中野生型拷貝之一對一取代或插入在基因座中未發現之序列資訊之遺傳工程學方法。

「啟動子」係引導結構基因之轉錄之核苷酸序列。在一些替代方案中，啟動子係位於基因之5'非編碼區中，接近於結構基因之轉錄起始位點。在起始轉錄中起作用之啟動子內之序列元件通常以共有核苷酸序列為特徵。其係起始特定基因轉錄之DNA區。啟動子位於基因之轉錄起始位點附近，在DNA之同一鏈上且在上游(朝向有義鏈之5'區)。啟動子可為約100、200、300、400、500、600、700、800或1000個鹼基對長或在由以上所提及之長度中之任兩者所界定之範圍內。如本文中所使用，啟動子可為組成型活性、抑制型或誘導型啟動子。若啟動子係誘導型啟動子，則轉

錄速率因應誘導劑而增加。相比之下，若啟動子係組成型啟動子，則轉錄速率不受誘導劑調節。亦已知抑制型啟動子。在不受限制之情形下，啟動子之實例可包括組成型啟動子、異源弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)或誘導型啟動子。實例可包括EF1 α 啟動子、PGK啟動子、MND啟動子、KI啟動子、Ki-67基因啟動子及/或可藉由藥物(例如他莫昔芬(tamoxifen)及/或其代謝物)誘導之啟動子。常用之組成型啟動子可包括(但不限於)用於哺乳動物系統之SV40、CMV、UBC、EF1A、PGK及/或CAGG。

若弱啟動子及強啟動子二者均驅動相同編碼序列之表現，則弱啟動子所產生之mRNA表現少於較強啟動子。此可藉由分析(例如)瓊脂醣凝膠來比較。經受近端染色質調節之啟動子之實例係EF1 α 短啟動子，其在一些基因座中具有高度活性，但在其他基因座中幾乎無活性(Eyquem, Biotechnol Bioeng. 2013 年 8 月 ; 110(8):2225-35. doi: 10.1002/bit.24892)。

如本文中所闡述之「轉錄增強子結構域」係指可由蛋白質(活化子)結合以使特定基因轉錄將發生之可能性或所產生之轉錄程度增加或促進或增強之DNA之較短(50-1500 bp)區。該等活化子蛋白通常稱為轉錄因子。增強子通常為順式作用，位於遠離基因高達1 Mbp (1,000,000 bp)處且可在起始位點之上游或下游，且在正向或反向方向上。增強子可位於其所調節基因之上游或下游。在一些實施例中可使用複數個增強子結構域來生成更多轉錄，例如，可使用多聚活化結合結構域來進一步增強或增加轉錄程度。此外，增強子不需要位於轉錄起始位點附近以影響轉錄，此乃因已發現一些位於起始位點上游或下游數十萬個鹼基對之增強子。增強子不作用

於啟動子區本身，但被活化子蛋白結合。該等活化子蛋白與介質複合物相互作用，該介質複合物募集聚合酶II及通用轉錄因子，其然後開始轉錄基因。亦可在內含子內發現增強子。甚至可逆轉增強子之定向而不影響其功能。另外，可將增強子切除並插入染色體中之其他地方，且仍影響基因轉錄。在一些替代方案中，使用增強子使阻止FOXP3基因轉錄之抑制機制沉默。增強子結合結構域之實例係TCR α 增強子。在一些替代方案中，本文中所闡述之替代方案中之增強子結構域係TCR α 增強子。在一些替代方案中，將增強子結合結構域置於啟動子上游使得其將該啟動子活化以增加蛋白質之轉錄。在一些替代方案中，將增強子結合結構域置於啟動子之上游以將該啟動子活化以增加FOXP3基因之轉錄。

如本文中所闡述之「轉錄活化子結構域」或「轉錄活化結構域」係指可由轉錄因子結合之特定DNA序列，其中該轉錄因子可藉此控制遺傳資訊自DNA至信使RNA之轉錄速率。特定轉錄因子可包括(但不限於)SP1、AP1、C/EBP、熱休克因子、ATF/CREB、c-Myc、Oct-1及NF-1。在一些替代方案中，使用活化子結構域使阻止FOXP3基因轉錄之抑制機制沉默。

如本文中所闡述之「遍在染色質開放元件」(UCOE)係指特徵在於未甲基化之CpG島之元件，其跨越管家基因之雙重趨異轉錄之啟動子。UCOE代表有希望之工具，以在眾多種細胞模型(包括細胞系、多能造血幹細胞以及PSC及其分化後代)中避免沉默及維持轉基因表現。

如本文中所使用之「可操作地連接」係指調節序列與異源核酸序列之間之功能鏈接體，以使異源核酸序列表現。

如本文中所闡述之「自體免疫病症」係指免疫系統之異常低活性或

過度活性。在免疫系統過度活性之情形下，身體攻擊並損害其自身組織(自體免疫疾病)。免疫缺失疾病使身體抵抗侵襲者之能力降低，從而使得易受感染侵害。在不受限制之情形下，自體免疫病症或自體免疫疾病之實例可包括(例如)全身性狼瘡、硬皮症、溶血性貧血、血管炎、I型糖尿病、格雷夫斯病(Graves disease)、類風濕性關節炎、多發性硬化、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、肌病、嚴重合併性免疫缺失病、迪喬治症候群(DiGeorge syndrome)、超免疫球蛋白E症候群、常見變異型免疫缺失、慢性肉芽腫病、威斯科特-奧爾德里奇症候群(Wiskott-Aldrich syndrome)、自體免疫淋巴增殖性症候群、高IgM症候群、白血球黏附缺陷、NF- κ B必需調節劑(NEMO)突變、選擇性免疫球蛋白A缺陷、X-連鎖丙種球蛋白缺乏血症、X-連鎖淋巴增殖性疾病、IPEX (免疫失調、多內分泌病、腸病、X-連鎖(IPEX)症候群)及/或共濟失調性毛細血管擴張。當在患者之血清或腦脊髓液中檢測到時，免疫病症可(例如)藉由檢查神經特異性自體抗體或其他生物標記物之譜來分析。在本文中所提供之一些替代方法中，該等方法係用於治療、改善或抑制自體免疫病症。在一些替代方案中，自體免疫病症係全身性狼瘡、硬皮症、溶血性貧血、血管炎、I型糖尿病、格雷夫斯病、類風濕性關節炎、多發性硬化、古巴士德氏症候群、肌病、嚴重合併性免疫缺失病、迪喬治症候群、超免疫球蛋白E症候群、常見變異型免疫缺失、慢性肉芽腫病、威斯科特-奧爾德里奇症候群、自體免疫淋巴增殖性症候群、高IgM症候群、白血球黏附缺陷、NF- κ B必需調節劑(NEMO)突變、選擇性免疫球蛋白A缺陷、X-連鎖丙種球蛋白缺乏血症、X-連鎖淋巴增殖性疾病、IPEX (免疫失調、多內分泌病、腸病、X-連鎖(IPEX)症候群)及/或共濟失調性毛細血管擴張。

如本文中所闡述之「器官移植」係將器官自一個身體移至另一個身體或自供體部位移至人體自身之另一位置，以替代接受者之受損或缺失器官。在同一人體內移植之器官及/或組織稱為自體移植物。近期在兩個相同物種之個體之間實施的移植稱為同種異體移植物。同種異體移植物可來自存活或屍體來源。在本文中所闡述之一些替代方案中，提供治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用(例如器官排斥)之方法。

可移植之器官係(例如)心臟、腎臟、肝、肺、胰臟、腸及胸腺。用於移植之組織可包括(例如)骨、肌腱(二者均稱為肌肉骨骼移植物)、角膜、皮膚、心臟瓣膜、神經及靜脈。腎臟、肝及心臟係最常見之移植器官。角膜及肌肉骨骼移植物係最常見之移植組織。

在本文中所闡述之一些替代方案中，提供治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用(例如器官排斥)之方法。在一些替代方案中，選擇個體以接受抗排斥藥劑。在一些替代方案中，抗排斥藥劑包含普賴松(Prednisone)、依木蘭(Imuran)(硫唑嘌呤)、驍悉(Cellcept)(嗎替麥考酚酯(mycophenolate mofetil)或MMF)、米芙(Myfortic)(麥考酚酸)、斥消靈(Rapamune)(西羅莫司(sirolimus))、新體睦(Neoral)(環孢素)或普樂可複(Prograf)(他克莫司(tacrolimus))。

在一些替代方案中，選擇個體以利用本文中替代方案之工程化細胞進行抑制、改善或治療。在一些替代方案中，個體對抗炎藥物或抗排斥藥物具有副作用。因此，為所選擇之個體提供本文中所提供之替代細胞或組合物。來自抗排斥藥物之副作用可包括與可升高或降低血液中他克莫司含量、腎臟毒性、高血壓、神經毒性(顫抖、頭痛、麻刺感及失眠)、糖尿病(高血糖)、腹瀉、噁心、脫髮及/或高鉀之其他藥劑之相互作用。因此，選

擇患者用於本文中所闡述之治療、抑制或改善之方法。

如本文中所闡述之「器官排斥」或「移植排斥」係當所移植之組織被接受者之免疫系統排斥時，其破壞所移植之組織。

如本文中所闡述之「移植物抗宿主疾病」(Graft-versus-host disease, GVHD)係指在接受來自遺傳上不同之人之移植組織之後的醫學併發症。GVHD通常與幹細胞或骨髓移植相關，但該術語亦適用於其他形式之組織移植物。供體組織中之免疫細胞將接受者識別為異體且不為「自身」。在本文之一些替代方案中，所提供之方法可用於預防或改善可自GVHD引起之併發症。

如本文中所闡述之「醫藥賦形劑」係於其中提供組合物中之細胞之惰性物質。

本文中所闡述之「嵌合抗原受體」(CAR) (亦稱為嵌合T細胞受體)係指人工T細胞受體或遺傳工程化受體，其將所期望之特異性移植至免疫效應細胞上。舉例而言，該等受體可用於將單株抗體或其結合部分之特異性移植至T細胞上。在本文之一些替代方案中，遺傳工程化細胞進一步包含編碼嵌合抗原受體之序列。在一些替代方案中，嵌合抗原受體對腫瘤細胞上之分子具有特異性。嵌合抗原受體或表現T細胞受體之工程化細胞可用於靶向需要FOXP3之特定組織。在本文之一些替代方案中，包含靶向特定組織以提供且遞送FOXP3之方法。在一些替代方案中，組織係移植組織。在一些替代方案中，嵌合抗原受體對所移植組織上之靶標分子具有特異性。

如本文中所闡述，遺傳工程化細胞經工程化以表現FOXP3，且因此在本文之替代方案中其亦描述為「Treg-表型」細胞。

詳細闡述

由於調節性T細胞誘導抗原特異性耐受性之可能性，許多小組關注利用該等細胞治療自體免疫疾病。存在許多形式之調節性T細胞(「 T_{reg} 」)，當前命名法將 T_{reg} 劃分為以下：在T細胞發育過程中在胸腺中生成之彼等 T_{reg} ，表示為胸腺調節性T細胞或「 tT_{reg} 」，及外周誘導之調節性T細胞，表示為外周調節性T細胞或「 pT_{reg} 」。

調節性T細胞生物學之關鍵方面係轉錄因子FOXP3之表現。認為FOXP3為指定調節性T細胞譜系所必需。此概念係基於觀察到缺少FOXP3之人類在新生兒時期開始產生嚴重自體免疫疾病。使用 tT_{reg} 或 pT_{reg} 治療自體免疫疾病之最大障礙之一在於FOXP3表現受到後生調節。在 tT_{reg} 中，FOXP3基因中稱為「胸腺特異性去甲基化區」之上游區完全去甲基化，據信此狀態使得FOXP3穩定表現。一般而言，在 pT_{reg} 中觀察不到完全去甲基化。在發炎性病狀下，FOXP3可在 pT_{reg} 中且有可能在 tT_{reg} (儘管一些研究者認為 tT_{reg} 完全穩定)中後生沉默，從而潛在地導致 pT_{reg} 轉化成促發炎性CD4 T細胞。 pT_{reg} 缺少穩定性係重要問題，此乃因使用回復至發炎性表型之 pT_{reg} 輸注可導致自體免疫症狀惡化。

本文中提供以下證據：穩定CD4 T細胞中之FOXP3表現之工程學方法容許生成潛在阻抑性T細胞之擴增群體，該等群體不再易受其阻抑功能之後生修飾影響。因此，此等細胞可具有用於治療應用之改良性質。

在本文中所闡述之替代方案中，藉助使用基因編輯核酸酶來修飾FOXP3基因座之調節元件以提供穩定FOXP3表現，將用於治療應用之細胞工程化以具有穩定FOXP3表現。在所提供之例示性數據中，將組成型啟動子置於FOXP3編碼外顯子之上游(組成型啟動子之實例尤其包括EF1

α 啟動子、PGK啟動子及/或MND啟動子)以驅動FOXP3表現，但設想多種方法以修飾調節元件以便容許穩定FOXP3表現。藉由用於修飾內源性調節元件之若干方法，所主張之治療性細胞展現天然FOXP3基因之組成型表現，使得其不再易受可導致FOXP3基因沉默且回復至非阻抑性細胞表型之調節之影響。因此，在本文中所闡述之替代方法中，由於對天然調節序列及啟動子之後生影響而喪失FOXP3表現之問題已得到解決。

所提出之在CD4 T細胞混合群體中執行FOXP3表現之方法亦係相對於其他分離天然調節性T細胞群體之方法之改良，此乃因其提供捕獲存在於發炎性T細胞群體中之TCR庫之方法。在患有自體免疫疾病或排斥器官移植之患者中，發炎性T細胞群體中之內源性TCR庫包括具有正確結合特异性以識別器官中之炎性組織或異體組織之TCR。認為該等T細胞介導自體發炎性反應或器官排斥。藉由將混合CD4 T細胞群體之一部分轉化為調節性表型，存在於促發炎性群體中之TCR特异性將表現於治療性細胞群體中。此係相對於基於胸腺調節性T細胞之療法之改良，該等療法被認為具有與發炎性T細胞不同且不重疊之TCR庫。另外，推測在患有自體免疫疾病或器官排斥之患者中，現有tT_{reg}群體未能產生避免發炎所必需之耐受性。本文中所闡述之方法可用於治療自體免疫疾病及誘導對所移植器官之耐受性。

顯著缺點為需要使用可在FOXP3基因座處有效地進行重組之基因編輯工具。因此，所提供之方法顯示使用TALEN核酸酶可使此反應有效進行，但原則上任何核酸酶平臺均將同樣良好地發揮作用。

調節性T細胞療法可用於移植及自體免疫性中之耐受性應用。目前，離體擴展Treg輸注。I期研究已在T1D方面顯示邊際效能(若存在)，且在一

些情形下在移植後GvHD方面已有益處。對於下一代工程化調節性T細胞，在一些替代方案中，該等調節性T細胞可係嵌合抗原受體(CAR)引導之天然T_{reg}。效應T細胞亦可藉由FOXP3表現轉化為T_{reg}。

然而，工程化T_{reg}對天然T_{reg}之間在治療方法上亦可存在差異。天然Treg療法已視為安全，然而過少之天然T_{reg}引起自體免疫性。Treg在多種自體免疫疾病(IPEX、T1D、SLE、RA、EAE等)中起關鍵性作用。增加人類Treg數量或功能之方法處於目前試驗中，包括低劑量IL-2及自體擴增Treg之過繼性轉移。IL-2療法之效能由於其多向性活性及可增加發炎之潛在「脫靶」效應而受到限制。過繼性Treg療法可能受限於所擴增T_{reg}之活體內穩定性及存活率及其相關抗原特異性之缺少。

使用天然T_{reg}亦存在潛在缺陷。舉例而言，自體免疫患者在遺傳上易出現Treg不穩定性。舉例而言，具有CAR之nTreg轉化為CAR T效應細胞似乎合理。nTreg亦保留後生調節FOXP3之潛力，此可導致FOXP3誘導下調，此意味著功能或nTreg群體可能永遠不可完全預測。此外，天然T_{reg}可不包括正確TCR (T細胞受體)特異性。Treg功能亦可與可選標記物相關聯，其中所擴增之天然Treg細胞群體可一直具有污染性發炎性細胞。因此，本文中所提供之方法相對於藉由使用工程化細胞之使用天然T_{reg}之轉移而言係改良，此乃因存在將CAR表現連接至調節性T細胞功能之潛能，以避免潛在植入具有轉化為促發炎性CAR T細胞之潛能之CAR T_{reg}。

用於工程化用於蛋白質表現之T細胞之T細胞編輯工具眾所周知(例如，參見圖2)。舉例而言，T細胞活化並擴增，TALEN遞送係經由mRNA電穿孔來實施，模板可藉由遞送之腺相關病毒(高MOI瞬時表現-重組AAV非整合)進行編輯。

然後FOXP3可藉助基因編輯過程來表現，其中啟動子在第一編碼外顯子之上游插入及天然調節元件之下游，該等天然調節元件係藉由後生控制機制來控制。藉由在第一啟動子之上游插入啟動子來控制表現尚未報導，且產生FOXP3組成型上調之令人驚訝的結果，其不能藉由後生控制下調。**圖3**中所示為啟動子之插入，例如MND啟動子插入至FOXP3基因中。如所顯示，Foxp3表現係藉助第一編碼外顯子上游之內含子區(内含子1)之後生調節來傳統地控制。

如**圖4**中所顯示，使用HDR靶向來工程化FOXP3+穩定化T細胞，其產生強的組成型表現。**圖5**中所示為本文中所闡述之替代方案中所使用之基因構築體之模板。

亦提供控制FOXP3之表現之方法。在一些替代方案中，在FOXP3編碼外顯子上游插入之啟動子係誘導型受體。在一些替代方案中，系統採用合成之轉錄調節子，其在他莫昔芬存在下結合轉基因上游之合成啟動子以誘導FOXP3之表現。在他莫昔芬存在下，TamR-tf結合至7×HBD/EF1 α p啟動子誘導轉基因表現之「啟動」狀態。在一些替代方案中，此轉錄調節子經修飾以提供對轉基因表現之不同程度之控制。

在一些替代方案中，細胞亦可經進一步工程化以表現嵌合抗原受體或TCR (T細胞受體)或其他靶向部分。細胞可經工程化以表現CAR以靶向特定組織或細胞。在一些替代方案中，CAR包含配體結合結構域，其係在靶細胞群體上表現之腫瘤特異性分子、病毒分子或另一分子。在一些替代方案中，靶向組織具有低表現之FOXP3。容許T細胞表現CAR或TRC將容許該T細胞靶向需要將表現FOXP3之細胞遞送至組織特異性位點之特定組織。

替代方案1：基因編輯有效靶向FOXP3基因並驅動轉基因之高表現。

如圖6中所顯示，與未將TALEN核酸酶引入至T細胞中之細胞相比，經工程化以在MND啟動子控制下表現融合至內源性FOXP3基因之N末端之GFP的細胞顯示高程度之GFP-FOXP3融合蛋白表現。如圖7中所顯示，經編輯細胞在靶向位點顯示無縫HR介導之整合。對於圖7中之實驗，利用所指示之引子組(即對應於圖上之紅色箭頭位置)實施PCR，且藉由瓊脂糖凝膠電泳分析所得PCR產物。若發生精確靶向整合，則使用一個在靶向模板外部之引子(引子1或引子2)及一個內部引子(引子3或引子4)之PCR將僅顯示正確大小的條帶。左側凝膠片段展示在模擬編輯之細胞中缺少靶向整合，而右側凝膠片段顯示在經編輯細胞中存在正確大小的條帶。

GFP/FOXP3融合產生一致之高Foxp3表現程度。如圖中所顯示，相對於模擬編輯之細胞，GFP FOXP3融合誘導在MND啟動子控制下之FOXP3表現。所示為在模擬編輯之細胞中對經編輯細胞中FOXP3表現之流式細胞術分析，其中FOXP3表現顯示於Y軸上，且前向散射顯示於x軸上(圖8)。

GFP/FOXP3融合產生一致之高Foxp3表現程度。如圖9中所顯示，相對於模擬編輯之細胞，GFP FOXP3融合誘導在MND啟動子控制下之FOXP3表現。所示為在模擬編輯之細胞中對經編輯細胞中FOXP3表現及GFP表現之流式細胞術分析，其中FOXP3表現顯示於每一圖之Y軸上，且GFP顯示於x軸上。(參見圖9)。

如該等例示性替代方案之實驗中所顯示，基因編輯有效靶向FOXP3基因並驅動轉基因之高表現。

由於本文中所提供之實驗係在活體外完成，因此難以預測相同高程

度之FOXP3表現可在活體內測試、細胞或個體中維持。因此，將需要在個體中監測用於治療之細胞以查看該等細胞是否維持、增加或減少。在投與後檢查個體之工程化細胞之方法為熟習此項技術者所已知。舉例而言，Adaptive Biotech Technology之市售技術具有對B及T細胞進行免疫定序之系統以檢測特定細胞(例如工程化細胞)，從而測定該細胞是否維持、增加或減少。由於細胞可已在編碼外顯子上游之不同距離處經編輯，故此可影響活體內FOXP3之表現，因此活體內數據不預測活體內實驗之結果。此外，使用不同啟動子、效應子結構域及活化結構域可具有不同結果。

替代方案2：執行FOXP3表現產生具有T_{reg}表面及細胞介素表型之T細胞

圖10顯示圖解說明表面標記物及細胞介素表型之T_{reg}細胞之草圖。期望查看經編輯細胞是否具有特定表面表型。如圖11中所顯示，藉由流式細胞術分析穩定表現FOXP3之工程化T細胞之CD25、CD127、CTLA4及LAG3表現。類似於天然調節性T細胞，顯示工程化細胞表現高CD25、低CD127及高CTLA4及Lag3。

經編輯細胞之細胞介素表現譜亦顯示於圖12中。如圖12中所顯示，與模擬編輯之T細胞相比，工程化細胞顯示細胞內細胞介素表現之T_{reg}樣譜，其中IL2、IL4及IFN- γ 表現較低。如在圖13之條形圖中所顯示，相對於模擬編輯之細胞，穩定表現FOXP3之工程化T細胞顯示高IL-10表現。

亦顯示經編輯細胞具有IL2/STAT5信號傳導敏感性(圖14)。天然Treg由於其高CD25表現而對IL2高度敏感。藉由在活體外暴露於不同濃度之IL2，比較模擬編輯及經編輯細胞對IL2信號傳導之敏感性。對IL2之反應係根據STAT5之磷酸化程度來量測。如可見，相對於模擬編輯之細胞，經編輯細胞之stat5磷酸化在顯著較低之IL2濃度下指示IL2信號傳導。

如圖15中所顯示，天然T_{reg} 由於其高CD25表現而對IL2高度敏感。藉由在活體外暴露於不同濃度之IL2，比較模擬編輯及經編輯細胞對IL2信號傳導之敏感性。對IL2之反應係根據STAT5之磷酸化程度來量測。如可見，相對於模擬編輯之細胞，經編輯細胞之stat5磷酸化在顯著較低之IL2濃度下指示IL2信號傳導。

如此例示性替代方案中所顯示，執行FOXP3表現產生具有T_{reg}表面及細胞介素表型之T細胞。

由於本文中所提供之一些實驗係在活體外完成，因此難以預測細胞中相同升高程度之FOXP3表現可在活體內測試、細胞或個體中維持，且細胞中此等升高程度之FOXP3表現將足以改善(例如)自體免疫病症或GVHD中之致病性T細胞及/或B細胞反應。亦難以預測該等細胞將在活體內具有調節性T細胞特徵。因此，可有利地在個體中監測用於治療、抑制或改善之細胞以測定該等細胞是否在治療之前、期間及/或之後維持、增加或減少。在投與後檢查個體之工程化細胞之方法為熟習此項技術者所已知。舉例而言，Adaptive Biotechnologies及其他者之市售技術係對B及T細胞進行定序以檢測特定類型之免疫細胞(例如工程化細胞或致病性B或T細胞)從而測定該細胞是否維持、增加或減少之系統。由於細胞可已在編碼外顯子上游之不同距離處經編輯，故此可影響活體內FOXP3之表現，因此活體內數據不預測活體內實驗之結果。此外，使用不同啟動子、效應子結構域及活化結構域可具有不同結果。

在本文中所闡述之治療方法之一些替代方案中，該等方法進一步包含監測個體以測定工程化細胞是否在治療之前、期間及/或之後維持、增加或減少。在一些替代方案中，自個體取出細胞樣品以檢測工程化細胞且

測定工程化細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，若工程化細胞在個體中減少，則向有需要之個體給予再次投與工程化細胞。

活體內細胞亦將必須進行測試以查看其是否亦表現與調節性T細胞類似之標記物。

替代方案3：經編輯細胞之功能活性，經編輯細胞可阻抑Teff增殖。

圖16中所示為讀取調節性T細胞之阻抑活性之分析之示意圖。將經CFSE標記之反應細胞與經編輯之Treg或模擬編輯之細胞混合，並用珠粒刺激。該分析係根據96小時之CFSE稀釋之程度來讀取。

圖17顯示經編輯之T細胞可阻抑Teff增殖。與模擬編輯之細胞一起培育之反應細胞能夠藉助其增殖顯著稀釋CFSE標記，而與工程化GFP+細胞一起培育之反應細胞大部分保持未分裂(保留大量標記)。

圖18中顯示經編輯細胞之功能活性：使用來自IPEX個體之經編輯之T細胞缺少對Teff增殖之阻抑。使用與圖17相同之分析，模擬編輯或編輯正常患者對照細胞或IPEX患者細胞以執行天然FOXP3基因之表現。相對於模擬編輯之細胞，將經編輯之健康對照細胞與反應細胞一起培育阻抑反應細胞之CFSE稀釋，而相對於模擬編輯之細胞，培育經編輯之IPEX患者細胞則顯示未阻抑增殖。

抗原特異性Treg細胞亦係經由FOXP3基因編輯來生成。如圖19中所顯示，編輯技術可應用於在多種自體免疫疾病中所出現之致病性T細胞純系。顯示對使用對Flu抗原具有特異性之四聚體分離之T細胞純系進行之編輯成功生成穩定表現FOXP3之T細胞。

如該等例示性替代方案中所顯示，經編輯細胞可阻抑Teff增殖。

由於本文中所提供之一些實驗係在活體外完成，因此難以預測細胞

中相同升高程度之**FOXP3**表現可在活體內測試、細胞或個體中維持，且細胞中此等升高程度之**FOXP3**表現將足以改善(例如)自體免疫病症或**GVHD**中之致病性**T**細胞及/或**B**細胞反應。亦難以預測該等細胞將在活體內具有調節性**T**細胞特徵。因此，可有利地在個體中監測用於治療、改善或抑制之細胞以測定該等細胞是否在治療之前、期間及/或之後維持、增加或減少。在投與後檢查個體之工程化細胞之方法為熟習此項技術者所已知。舉例而言，**Adaptive Biotechnologies**及其他者之市售技術係對**B**及**T**細胞進行定序以檢測特定類型之免疫細胞(例如工程化細胞或致病性**B**或**T**細胞)從而測定該細胞是否維持、增加或減少之系統。由於細胞可已在編碼外顯子上游之不同距離處經編輯，故此可影響活體內**FOXP3**之表現，因此活體內數據不預測活體內實驗之結果。此外，使用不同啟動子、效應子結構域及活化結構域可具有不同結果。

在本文中所闡述之治療、改善或抑制方法之一些替代方案中，該等方法進一步包含監測個體以測定在接受工程化細胞之前、期間及/或之後該等細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，自個體取出細胞樣品以檢測工程化細胞且測定工程化細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，若工程化細胞在個體中減少，則向有需要之個體給予再次投與工程化細胞。

工程化細胞亦將必須進行測試以查看其在活體內是否對**T**效應細胞具有效應，此乃因活體外實驗不能用來預測其在活體內對**T**效應細胞之效應或其是否阻抑**T**效應細胞。

總結

在原代人類**T**細胞中之基因編輯容許經由引入強啟動子執行**Foxp3**表

現且產生穩定 T_{reg} 表型。 $CD4^+$ T細胞中之基因編輯係有效的且產生Foxp3之高的穩定表現。亦顯示基因表現限於內源性基因座。經編輯細胞展示 T_{reg} 功能性質(pSTAT5及細胞內細胞介素產生)、表面表型及活體外功能(T_{eff} 阻抑)。使用抗原特異性T細胞進行FOXP3編輯係可行的。GvHD鼠類模型之成功確立將容許在活體內擴展FOXP3編輯之T細胞之功能測試。

替代方案4：經編輯之GFP FOXP3細胞之表型及功能

如圖21中所顯示，穩定表現FOXP3之T細胞具有表型變化($CD25^+$ 、 $CD45RO^+$ 、CCR7、 $CD38/CTLA-4/LAP$)。該等穩定表現FOXP3之T細胞亦顯示細胞內細胞介素表現(IL-2、IFN- γ 及IL-4)之 T_{reg} 樣譜。當以10 ng至100 ng投與時，pSTAT5信號傳導亦對IL-2敏感。因此，穩定表現FOXP3之T細胞顯示細胞內細胞介素表現之 T_{reg} 樣譜。

由於本文中所提供之一些實驗係在活體外完成，因此難以預測細胞中相同升高程度之FOXP3表現可在活體內測試、細胞或個體中維持，且細胞中此等升高程度之FOXP3表現將足以改善(例如)自體免疫病症或GVHD中之致病性T細胞及/或B細胞反應。亦難以預測該等細胞將在活體內具有調節性T細胞特徵。因此，可有利地在個體中監測用於治療、抑制或改善之細胞以測定該等細胞是否在治療之前、期間及/或之後維持、增加或減少。在投與後檢查個體之工程化細胞之方法為熟習此項技術者所已知。舉例而言，Adaptive Biotechnologies及其他者之市售技術係對B及T細胞進行定序以檢測特定類型之免疫細胞(例如工程化細胞或致病性B或T細胞)從而測定該細胞是否維持、增加或減少之系統。由於細胞可已在編碼外顯子上游之不同距離處經編輯，故此可影響活體內FOXP3之表現，因此活體內數據不預測活體內實驗之結果。此外，使用不同啟動子、效應

子結構域及活化結構域可具有不同結果。

在本文中所闡述之治療、抑制或改善方法之一些替代方案中，該等方法進一步包含監測個體以測定工程化細胞是否在治療之前、期間及/或之後維持、增加或減少。在一些替代方案中，自個體取出細胞樣品以檢測工程化細胞且測定工程化細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，若工程化細胞在個體中減少，則向有需要之個體給予再次投與工程化細胞。

替代方案5：活體內GVHD實驗

圖22中所示為準備活體內GvHD實驗之時間線。首先輻照小鼠以破壞髓細胞。然後將穩定表現FOXP3之具有T_{reg}表型之工程化細胞輸注至小鼠中，隨後輸注T_{eff}細胞。在輸注後1-50天之間，然後監測小鼠之體重並研究外周血及不同器官中之T細胞百分比。

在圖23中，圖表顯示接受效應細胞(圓圈)、效應細胞及模擬編輯之T細胞(正方形)以及效應細胞及具有T-reg表型之經編輯之FOXP3穩定化細胞(三角形)之小鼠之存活百分比。經編輯之foxp3穩定化Treg-表型細胞產生實質之存活優點，此指示其改善由效應細胞產生之異種GvHD之能力。

替代方案6：工程化致耐受性T細胞與天然胸腺T_{reg}之分子相似性/差異。

圖24中所示為經編輯之T細胞中TSDR CpG甲基化之示意圖。FOXP3基因係藉由第一編碼外顯子(實際外顯子2)上游調節區之甲基化調節。

然後分析純系之甲基化(圖25)。每一黑點指示跨越T細胞純系之TSDR之PCR片段中之甲基化CpG二核苷酸。如可見，CD25陰性細胞具有高度甲基化之TSDR，指示閉合之無活性非表現之FOXP3基因座，而高

CD25細胞(天然Treg)顯示幾乎一致之完全去甲基化之TSDR。

儘管已知高程度之FOXP3表現，但經編輯之T細胞顯示完全甲基化之TSDR，此表明在TSDR下游整合啟動子有效地繞過FOXP3基因座之正常後生調節(圖26)。

由於本文中所提供之一些實驗係在活體外完成，因此難以預測細胞中相同升高程度之FOXP3表現可在活體內測試、細胞或個體中維持，且細胞中此等升高程度之FOXP3表現將足以改善(例如)自體免疫病症或GVHD中之致病性T細胞及/或B細胞反應。亦難以預測該等細胞將在活體內具有調節性T細胞特徵。因此，可有利地在個體中監測用於治療、抑制或改善之細胞以測定該等細胞是否在治療之前、期間及/或之後維持、增加或減少。在投與後檢查個體之工程化細胞之方法為熟習此項技術者所已知。舉例而言，Adaptive Biotechnologies及其他者之市售技術係對B及T細胞進行定序以檢測特定類型之免疫細胞(例如工程化細胞或致病性B或T細胞)從而測定該細胞是否維持、增加或減少之系統。由於細胞可已在編碼外顯子上游之不同距離處經編輯，故此可影響活體內FOXP3之表現，因此活體內數據不預測活體內實驗之結果。此外，使用不同啟動子、效應子結構域及活化結構域可具有不同結果。

製備核酸之方法

在一些替代方案中，提供繞過蛋白質表現之後生控制之製備核酸之方法。在一些替代方案中，蛋白質係FOXP3。在一些替代方案中，提供製備用於表現FOXP3之核酸之方法。該方法包含提供第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供核酸酶；且對該第一核苷酸序列實施基因編

輯過程，該基因編輯過程編輯該一或多個調節元件，且視情況編輯該FOXP3基因或其部分。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，第一靶向基因座包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，在完成基因編輯過程之後，靶向基因座包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在一或多個調節元件處。在一些替代方案中，靶向基因座係在FOXP3基因或其部分處，其中該FOXP3基因或其部分包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，基因編輯過程係用於插入異源啟動子、異源轉錄增強子結構域或二者之基因敲入過程。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，啟動子係異源弱啟動子(例如，活性或轉錄效率小於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入一或多個異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入一或多個異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入誘導型效應子。在一些替代方案中，誘導型效應子可藉由類固醇或藥物誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上第一編碼外顯子上游之任何位置處插入，其中該第一編碼外顯子代表完成基因編輯過程之後之外顯子且其中該編碼鏈進一步包含FOXP3基因之起始密碼子。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個

調節元件進行遺傳修飾。

用於穩定表現FOXP3之核酸

在一些替代方案中，提供用於繞過蛋白質表現之後生控制之核酸。在一些替代方案中，蛋白質係FOXP3。在一些替代方案中，提供核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含異源調節元件及異源啟動子，該等異源調節元件及異源啟動子可操作地連接至FOXP3基因或其部分，其中該FOXP3基因或其部分包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，活性或轉錄效率小於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含一或多個異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含一或多個異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。

製備用於穩定表現蛋白質之遺傳工程化細胞之方法

在一些替代方案中，提供繞過後生控制之製備遺傳工程化細胞之方法。在一些替代方案中，提供製備遺傳工程化細胞之方法，該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供編

碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中以進行遺傳修飾。在一些替代方案中，遺傳修飾係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子處。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍內之任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，活性或轉錄效率小於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將一或多個異源增強子結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將一或多個異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入或藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹

細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

細胞

在一些替代方案中，提供用於繞過蛋白質表現之後生控制之遺傳工程化細胞。在一些替代方案中，蛋白質係FOXP3。在一些替代方案中，提供藉由本文中所闡述方法中之任一者之方法所製造之用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞。該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中以進行遺傳修飾。在一些替代方案中，遺傳修飾係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子處。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍內之任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，活性或轉錄效率小於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係

誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將一或多個異源增強子結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將一或多個異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入或藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

在一些替代方案中，提供用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞，其中該遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，活性或轉錄效率小於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含一或多個異

源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含一或多個異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4+之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，細胞可經工程化以表現嵌合抗原受體。

組合物

本揭示內容提供利用該等組合物之方法或使用該等組合物在患有疾病或病症之個體中實施細胞免疫療法之方法。在一些替代方案中，組合物包含本文中任一替代方案之細胞中之任一或多種之遺傳工程化細胞及醫藥賦形劑。該細胞係用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞，其係藉由本文中所闡述方法中之任一者之方法所製造。該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中以進行遺傳修飾。在一些替代方案中，遺傳修飾係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子處。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍

內之任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，活性或轉錄效率小於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將一或多個異源增強子結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將一或多個異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入或藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

在一些替代方案中，遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係

EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，活性或轉錄效率小於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含一或多個異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含一或多個異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4+之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，細胞可經工程化以表現嵌合抗原受體。

治療或改善方法

在一些替代方案中，提供治療、抑制或改善個體之自體免疫病症之方法，該方法包含向該個體投與本文中所提供之任一替代方案之任一或多種細胞之遺傳修飾細胞或本文中所提供之任一替代方案之組合物。在一些替代方案中，組合物包含本文中任一替代方案之細胞中之任一或多種之遺傳工程化細胞及醫藥賦形劑。該細胞係用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞，其係藉由本文中所闡述方法中之任一者之方法所製造。該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供編

碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中以進行遺傳修飾。在一些替代方案中，遺傳修飾係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子處。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍內之任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，活性或轉錄效率小於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將一或多個異源增強子結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將一或多個異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入或藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹

細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

在一些替代方案中，遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，活性或轉錄效率小於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含一或多個異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含一或多個異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，細胞可經工程化以表現嵌合抗原受體。在一些替代方案中，自體免疫疾病係類風濕性關節炎、糖尿病、發炎性腸病、IPEX (免疫失調、多內分泌病、腸病、X-連鎖(IPEX)症候群)、克隆氏病、多發性硬化、特發性或全身性紅斑狼瘡。在一些替

代方案中，自體免疫疾病係全身性狼瘡、硬皮症、溶血性貧血、血管炎、I型糖尿病、格雷夫斯病、類風濕性關節炎、多發性硬化、古巴士德氏症候群、肌病、嚴重合併性免疫缺失病、迪喬治症候群、超免疫球蛋白E症候群、常見變異型免疫缺失、慢性肉芽腫病、威斯科特-奧爾德裡奇症候群、自體免疫淋巴增殖性症候群、高IgM症候群、白血球黏附缺陷、NF- κ B必需調節劑(NEMO)突變、選擇性免疫球蛋白A缺陷、X-連鎖丙種球蛋白缺乏血症、X-連鎖淋巴增殖性疾病及/或共濟失調性毛細血管擴張。在一些替代方案中，自體免疫病症係全身性狼瘡、硬皮症、溶血性貧血、血管炎、I型糖尿病、格雷夫斯病、類風濕性關節炎、多發性硬化、古巴士德氏症候群、肌病、嚴重合併性免疫缺失病、迪喬治症候群、超免疫球蛋白E症候群、常見變異型免疫缺失、慢性肉芽腫病、威斯科特-奧爾德裡奇症候群、自體免疫淋巴增殖性症候群、高IgM症候群、白血球黏附缺陷、NF- κ B必需調節劑(NEMO)突變、選擇性免疫球蛋白A缺陷、X-連鎖丙種球蛋白缺乏血症、X-連鎖淋巴增殖性疾病、IPEX (免疫失調、多內分泌病、腸病、X-連鎖(IPEX)症候群)及/或共濟失調性毛細血管擴張。在一些替代方案中，鑑別或選擇個體以接受用於自體免疫疾病之療法。在一些替代方案中，用於自體免疫疾病之標準療法或用於抗炎療法之標準療法難以治療個體。此鑑別或選擇可基於臨床或診斷評估來完成。

在一些替代方案中，給予個體組合療法，其中投與該個體抗排斥藥物或抗炎藥物與工程化細胞之組合。在一些替代方案中，選擇個體以接受抗排斥藥劑。在一些替代方案中，抗排斥藥劑包含普賴松、依木蘭(硫唑嘌呤)、驍悉(嗎替麥考酚酯或MMF)、米芙(麥考酚酸)、斥消靈(西羅莫司)、新體睦(環孢素)或普樂可複(他克莫司)。在一些替代方案中，抗炎藥

物包含Tysabri®、類固醇、免疫抑制劑、NSAID、免疫球蛋白、撲熱息痛、塞來昔布(celecoxib)、吲哚美辛(indomethacin)或雙氯芬酸。在一些替代方案中，在接受細胞之過程之前、期間及/或之後監測個體活體內表現FOXP3⁺之工程化T細胞、及表現Treg表型之工程化細胞群體或致病性T或B細胞群體之變化。在一些替代方案中，取決於對第一細胞濃注劑之第一反應，選擇個體以接受工程化細胞之再次投與。在一些替代方案中，自初始劑量1週、2週或一個月內投與個體另一劑量之細胞。

在本文中所闡述之治療方法之一些替代方案中，該等方法進一步包含監測個體以測定工程化細胞是否在治療之前、期間及/或之後維持、增加或減少。在一些替代方案中，自個體取出細胞樣品以檢測工程化細胞且測定工程化細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，若工程化細胞在個體中減少，則向有需要之個體給予再次投與工程化細胞。

在一些替代方案中，提供治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用之方法，該方法包含向該個體投與本文中任一替代方案之任一或多種細胞之遺傳修飾細胞或本文中任一替代方案之組合物。在一些替代方案中，組合物包含本文中任一替代方案之細胞中之任一或多種之遺傳工程化細胞及醫藥賦形劑。該細胞係用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞，其係藉由本文中所闡述方法中之任一者之方法所製造。該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中以進行遺傳修飾。在一些替代方案中，遺傳修飾係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼

鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子處。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍內之任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，活性或轉錄效率小於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將一或多個異源增強子結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將一或多個異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入或藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，用於自體免疫疾病之

標準療法或用於抗炎療法之標準療法難以治療個體。在一些替代方案中，標準抗排斥藥劑或標準抗排斥療法難以治療個體。因此，在一些替代方案中，選擇個體以接受表現**FOXP3**之遺傳工程化細胞。

在一些替代方案中，遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至**FOXP3**基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該**FOXP3**基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係**EF1 α** 啟動子、**PGK**啟動子或**MND**啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，活性或轉錄效率小於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含一或多個異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含一或多個異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(**UCOE**)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現**CD4+**之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現**CD8+**之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性**T**細胞。

在一些替代方案中，提供治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用(例如器官排斥)之方法，該方法包含向該個體投與本文中任一替代方案之任一或多種細胞之遺傳修飾細胞或本文中任一替代方案之組合物。在一

些替代方案中，組合物包含本文中任一替代方案之細胞中之任一或多種之遺傳工程化細胞及醫藥賦形劑。該細胞係用於表現**FOXP3**之遺傳工程化細胞，其係藉由本文中所闡述方法中之任一者之方法所製造。該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及**FOXP3**基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中以進行遺傳修飾。在一些替代方案中，遺傳修飾係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子處。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍內之任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係**Cas9**、鋅指核酸酶或**TALEN**。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係**EF1 α**啟動子、**PGK**啟動子或**MND**啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，活性或轉錄效率小於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將一或多個異源增強子結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將一或多個異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件

(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入或藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，用於自體免疫疾病之標準療法或用於抗炎療法之標準療法難以治療個體。在一些替代方案中，標準抗排斥藥劑或標準抗排斥療法難以治療個體。因此，在一些替代方案中，選擇個體以接受表現FOXP3之遺傳工程化細胞。

在一些替代方案中，遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，活性或轉錄效率小於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含一或多個異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含一或多個異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係

在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在本文中所闡述之治療、抑制或改善方法之一些替代方案中，該等方法進一步包含監測個體以測定在接受工程化細胞之前、期間及/或之後該等細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，自個體取出細胞樣品以檢測工程化細胞且測定工程化細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，若工程化細胞在個體中減少，則向有需要之個體給予再次投與工程化細胞。

在一些替代方案中，提供治療、抑制或改善個體之自體免疫病症之方法，該方法包含自有需要之個體取出細胞，其中該等細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件、FOXP3基因或其部分，其中該FOXP3基因或其部分包含第一編碼外顯子；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；將該第二核苷酸序列或蛋白質核酸酶引入至該細胞中進行遺傳修飾，其中該遺傳修飾係將啟動子插入至該第一核苷酸序列中之基因敲入過程；及將該細胞引入至該個體中用於治療、抑制或改善。在一些替代方案中，自體免疫疾病係類風濕性關節炎、糖尿病、發炎性腸病、IPEX (免疫失調、多內分泌病、腸病、X-連鎖(IPEX)症候群)、克隆氏病、多發性硬化、特發性或全身性紅斑狼瘡。在一些替代方案中，自體免疫疾病係全身性狼瘡、硬皮症、溶血性貧血、血管炎、I型糖尿病、格雷夫斯病、類風濕性關節炎、多發性硬化、古巴士德氏症候群、肌病、嚴重合併性免疫缺失病、迪喬治

症候群、超免疫球蛋白E症候群、常見變異型免疫缺失、慢性肉芽腫病、威斯科特-奧爾德里奇症候群、自體免疫淋巴增殖性症候群、高IgM症候群、白血球黏附缺陷、NF- κ B必需調節劑(NEMO)突變、選擇性免疫球蛋白A缺陷、X-連鎖丙種球蛋白缺乏血症、X-連鎖淋巴增殖性疾病及/或共濟失調性毛細血管擴張。在一些替代方案中，鑑別或選擇個體以接受用於自體免疫疾病之療法。在一些替代方案中，自體免疫疾病係類風濕性關節炎、糖尿病、發炎性腸病、IPEX (免疫失調、多內分泌病、腸病、X-連鎖(IPEX)症候群)、克隆氏病、多發性硬化、特發性或全身性紅斑狼瘡。此鑑別或選擇可藉由診斷及/或臨床評估來完成。在一些替代方案中，用於自體免疫疾病之標準療法或用於抗炎療法之標準療法難以治療個體。在一些替代方案中，標準抗排斥藥劑或標準抗排斥療法難以治療個體。因此，在一些替代方案中，選擇個體以接受表現FOXP3之遺傳工程化細胞。

在一些替代方案中，提供治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用之方法，該方法包含自有需要之個體取出細胞，其中該等細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件、FOXP3基因或其部分，其中該FOXP3基因或其部分包含第一編碼外顯子；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；將該第二核苷酸序列或蛋白質核酸酶引入至該細胞中進行遺傳修飾，其中該遺傳修飾係將啟動子插入至該第一核苷酸序列中之基因敲入過程；及將該細胞引入至該個體中用於治療、抑制或改善。在本文中所闡述之治療、抑制或改善方法之一些替代方案中，該等方法進一步包含監測個體以測定在接受工程化細胞之前、期間及/或之後該等細胞是否維持、增加或減少。

在一些替代方案中，自個體取出細胞樣品以檢測工程化細胞且測定工程化細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，若工程化細胞在個體中減少，則向有需要之個體給予再次投與工程化細胞。在一些替代方案中，用於自體免疫疾病之標準療法或用於抗炎療法之標準療法難以治療個體。在一些替代方案中，標準抗排斥藥劑或標準抗排斥療法難以治療個體。因此，在一些替代方案中，選擇個體以接受表現**FOXP3**之遺傳工程化細胞。

在一些替代方案中，提供治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用(例如器官排斥)之方法，該方法包含自有需要之個體取出細胞，其中該等細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件、**FOXP3**基因或其部分，其中該**FOXP3**基因或其部分包含第一編碼外顯子；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；將該第二核苷酸序列或蛋白質核酸酶引入至該細胞中進行遺傳修飾，其中該遺傳修飾係將啟動子插入至該第一核苷酸序列中之基因敲入過程；及將該細胞引入至該個體中用於治療。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現**CD4+**之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現**CD8+**之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性**T**細胞。在一些替代方案中，用於自體免疫疾病之標準療法或用於抗炎療法之標準療法難以治療個體。在一些替代方案中，標準抗排斥藥劑或標準抗排斥療法難以治療個體。因此，在一些替代方案中，選擇個體以接受表現**FOXP3**之遺傳工程化細胞。

更多替代方案

在一些替代方案中，提供製備用於表現**FOXP3**之核酸之方法，其中

該方法包含提供第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供核酸酶；且對該第一核苷酸序列實施基因編輯過程，該基因編輯過程編輯該一或多個調節元件，且視情況編輯該FOXP3基因或其部分。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在一或多個調節元件處。在一些替代方案中，靶向基因座係在FOXP3基因或其部分處。在一些替代方案中，FOXP3基因或其部分包含該第一天然編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，基因編輯過程係用於插入異源啟動子、異源轉錄增強子結構域或二者之基因敲入過程。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，啟動子係異源弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入異源轉錄增強子結構域，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入誘導型效應子。在一些替代方案中，誘導型效應子可藉由類固醇或藥物誘導。在一些替代方案中，插入異源啟動子，其中該異源啟動子之插入生成第一編碼外顯子，

其中該異源啟動子係在編碼鏈上第一編碼外顯子上游之任何位置處，且其中該編碼鏈進一步包含**FOXP3**基因之起始密碼子。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上第一天然外顯子上游之任何位置處插入，且其中該編碼鏈進一步包含**FOXP3**基因之起始密碼子。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。

在一些替代方案中，提供藉由本文中任一替代方案之任一方法所製得之用於**FOXP3**表現之核酸。該方法包含提供第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及**FOXP3**基因或其部分；提供核酸酶；且 對該第一核苷酸序列實施基因編輯過程，該基因編輯過程編輯該一或多個調節元件，且視情況編輯該**FOXP3**基因或其部分。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在一或多個調節元件處。在一些替代方案中，靶向基因座係在**FOXP3**基因或其部分處。在一些替代方案中，**FOXP3**基因或其部分包含該第一天然編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，基因編輯過程係用於插入異源啟動子、異源轉錄增強子結構域或二者之基因敲入過程。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，啟動子係異源弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，啟動子係誘導型啟動子。

在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入異源轉錄增強子結構域，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，該方法進一步包含插入誘導型效應子。在一些替代方案中，誘導型效應子可藉由類固醇或藥物誘導。在一些替代方案中，插入異源啟動子，其中該異源啟動子之插入生成第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在編碼鏈上第一編碼外顯子上游之任何位置處，且其中該編碼鏈進一步包含FOXP3基因之起始密碼子。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上第一天然外顯子上游之任何位置處插入，且其中該編碼鏈進一步包含FOXP3基因之起始密碼子。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。

在一些替代方案中，提供核酸，該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含異源調節元件及異源啟動子，該等異源調節元件及異源啟動子可操作地連接至FOXP3基因或其部分，其中該FOXP3基因或其部分包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游位置處。在一些替

代方案中，核酸進一步包含異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。

在一些替代方案中，提供製備遺傳工程化細胞之方法，該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及**FOXP3**基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中用於基因編輯過程。在一些替代方案中，基因編輯過程係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然編碼外顯子或第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍之間的任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係**Cas9**、鋅指核酸酶或**TALEN**。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係**EF1 α** 啟動子、**PGK**啟動子或**MND**啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源

啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源增強子結構域(例如，TCRa增強子)插入至第一核苷酸序列中，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在遺傳修飾期間在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入，或遺傳修飾得到藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在該合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4+之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

在一些替代方案中，提供藉由本文中任一替代方案之方法製造之用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞。提供製備遺傳工程化細胞之方法，該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中用於基因編輯過程。在一些替代方案中，基因編輯過程係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方

案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然編碼外顯子或第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍之間的任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源增強子結構域(例如，TCRa增強子)插入至第一核苷酸序列中，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在遺傳修飾期間在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入，或遺傳修飾得到藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在該合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些

替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4+之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

在一些替代方案中，用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞，該遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4+之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

在一些替代方案中，提供組合物，其包含本文中任一替代方案之細胞中之任一或多種之遺傳工程化細胞及醫藥賦形劑。用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞可藉由本文中任一替代方案所提供之方法來製造。提供製

備遺傳工程化細胞之方法，該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及**FOXP3**基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中用於基因編輯過程。在一些替代方案中，基因編輯過程係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然編碼外顯子或第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍之間的任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係**Cas9**、鋅指核酸酶或**TALEN**。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係**EF1 α** 啟動子、**PGK**啟動子或**MND**啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源增強子結構域(例如，**TCRa**增強子)插入至第一核苷酸序列中，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元

件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在遺傳修飾期間在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入，或遺傳修飾得到藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在該合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹

細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。

在一些替代方案中，提供治療、抑制或改善個體之自體免疫病症之方法，該方法包含：向該個體投與本文中任一替代方案之任一或多種細胞之遺傳修飾細胞或任一替代方案所提供之組合物。提供包含本文中任一替代方案之細胞中之任一或多種之遺傳工程化細胞及醫藥賦形劑之組合物。用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞可藉由本文中任一替代方案所提供之方法來製造。提供製備遺傳工程化細胞之方法，該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中用於基因編輯過程。在一些替代方案中，基因編輯過程係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然編碼外顯子或第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍之間的任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代

方案中，異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源增強子結構域(例如，TCRa增強子)插入至第一核苷酸序列中，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在遺傳修飾期間在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入，或遺傳修飾得到藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在該合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動

子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4+之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，自體免疫疾病係類風濕性關節炎、糖尿病、發炎性腸病、IPEX (免疫失調、多內分泌病、腸病、X-連鎖(IPEX)症候群)、克隆氏病、多發性硬化、特發性或全身性紅斑狼瘡。在一些替代方案中，鑑別或選擇個體以接受用於自體免疫疾病之療法。在一些替代方案中，給予個體組合療法，其中投與該個體用於阻抑自體免疫疾病之藥物與工程化細胞之組合。在一些替代方案中，監測個體在治療過程期間活體內FOXP3+Treg表型細胞群體之變化。在一些替代方案中，選擇個體以接受工程化細胞之再次投與。在一些替代方案中，給予個體組合療法，其中投與該個體抗排斥藥物或抗炎藥物與工程化細胞之組合。在一些替代方案中，選擇個體以接受抗排斥藥劑。在一些替代方案中，抗排斥藥劑包含普賴松、依木蘭(硫唑嘌呤)、驍悉(嗎替麥考酚酯或MMF)、米芙(麥考酚酸)、斥消靈(西羅莫司)、新體睦(環孢素)或普樂可複(他克莫司)。在一些替代方案中，抗炎藥物包含Tysabri®、類固醇、免疫

阻抑劑、NSAID、免疫球蛋白、撲熱息痛、塞來昔布、吲哚美辛或雙氯芬酸。在一些替代方案中，在治療、抑制或改善過程之前、期間及/或之後監測個體活體內表現FOXP3⁺之工程化T細胞、及表現Treg表型之工程化細胞群體或致病性T或B細胞群體之變化。在一些替代方案中，取決於對治療、抑制或改善之第一反應，選擇個體以接受工程化細胞之再次投與。在一些替代方案中，自初始劑量1週、2週或一個月內投與個體另一劑量之細胞。在一些替代方案中，用於自體免疫疾病之標準療法或用於抗炎療法之標準療法難以治療個體。在一些替代方案中，標準抗排斥藥劑或標準抗排斥療法難以治療個體。因此，在一些替代方案中，選擇個體以接受表現FOXP3之遺傳工程化細胞。

在一些替代方案中，提供治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用之方法，該方法包含：向該個體投與本文中任一替代方案之任一或多種細胞之遺傳修飾細胞或任一替代方案所提供之組合物。提供包含本文中任一替代方案之細胞中之任一或多種之遺傳工程化細胞及醫藥賦形劑之組合物。用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞可藉由本文中任一替代方案所提供之方法來製造。提供製備遺傳工程化細胞之方法，該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中用於基因編輯過程。在一些替代方案中，基因編輯過程係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然編碼

外顯子或第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍之間的任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源增強子結構域(例如，TCRa增強子)插入至第一核苷酸序列中，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在遺傳修飾期間在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入，或遺傳修飾得到藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在該合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。

在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4+之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，給予個體組合療法，其中投與該個體抗排斥藥物與工程化細胞之組合。在一些替代方案中，選擇個體以接受抗排斥藥劑。在一些替代方案中，抗排斥藥劑包含普賴松、依木蘭(硫唑嘌呤)、驍悉(嗎替麥考酚酯或MMF)、米芙(麥考酚酸)、斥消靈(西羅莫司)、新體睦(環孢素)或普樂可複(他克莫司)。在一些替代方案中，監測個體在治療過程期間活體內FOXp3+Treg-表型細胞群

體之變化。在一些替代方案中，選擇個體以接受工程化細胞之再次投與。在一些替代方案中，選擇有需要之個體以接受抗排斥療法或抗炎療法。在一些替代方案中，該方法進一步包含藉由對遺傳工程化細胞進行定序以測定工程化細胞在個體中維持、增加或減少，從而確定工程化細胞在有需要之個體中。在一些替代方案中，給予個體組合療法，其中投與該個體抗排斥藥物或抗炎藥物與工程化細胞之組合。在一些替代方案中，選擇個體以接受抗排斥藥劑。在一些替代方案中，抗排斥藥劑包含普賴松、依木蘭(硫唑嘌呤)、驍悉(嗎替麥考酚酯或MMF)、米芙(麥考酚酸)、斥消靈(西羅莫司)、新體睦(環孢素)或普樂可複(他克莫司)。在一些替代方案中，抗炎藥物包含Tysabri®、類固醇、免疫抑制劑、NSAID、免疫球蛋白、撲熱息痛、塞來昔布、吲哚美辛或雙氯芬酸。在一些替代方案中，在治療、抑制或改善過程之前、期間及/或之後監測個體活體內表現FOXP3+之工程化T細胞、及表現Treg表型之工程化細胞群體或致病性T或B細胞群體之變化。在一些替代方案中，取決於對治療、抑制或改善之第一反應，選擇個體以接受工程化細胞之再次投與。在一些替代方案中，自初始劑量1週、2週或一個月內投與個體另一劑量之細胞。在本文中所闡述之治療方法之一些替代方案中，該等方法進一步包含監測個體以測定工程化細胞是否在治療之前、期間及/或之後維持、增加或減少。在一些替代方案中，自個體取出細胞樣品以檢測工程化細胞且測定工程化細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，若工程化細胞在個體中減少，則向有需要之個體給予再次投與工程化細胞。在一些替代方案中，用於自體免疫疾病之標準療法或用於抗炎療法之標準療法難以治療個體。在一些替代方案中，標準抗排斥藥劑或標準抗排斥療法難以治療個體。因此，在一些替代方案中，

選擇個體以接受表現**FOXP3**之遺傳工程化細胞。

在一些替代方案中，提供治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用(例如器官排斥)之方法，該方法包含：向該個體投與本文中任一替代方案之任一或多種細胞之遺傳修飾細胞或任一替代方案所提供之組合物。提供包含本文中任一替代方案之細胞中之任一或多種之遺傳工程化細胞及醫藥賦形劑之組合物。用於表現**FOXP3**之遺傳工程化細胞可藉由本文中任一替代方案所提供之方法來製造。提供製備遺傳工程化細胞之方法，該方法包含提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及**FOXP3**基因或其部分；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；及將該第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中用於基因編輯過程。在一些替代方案中，基因編輯過程係將異源啟動子插入至第一核苷酸序列中之基因敲入過程。在一些替代方案中，編碼鏈包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，第一核苷酸序列包含靶向基因座。在一些替代方案中，靶向基因座包含天然編碼外顯子或第一編碼外顯子。在一些替代方案中，完成基因編輯過程在基因編輯過程之後在靶向基因座中產生第一編碼外顯子。在一些替代方案中，靶向基因座係在第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍之間的任何數量之鹼基對內。在一些替代方案中，基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。在一些替代方案中，核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成

之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源增強子結構域(例如，TCRa增強子)插入至第一核苷酸序列中，其中該增強子結構域係在一或多個調節序列之上游或下游。在一些替代方案中，該方法進一步包含將異源轉錄活化結構域插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至第一核苷酸序列中。在一些替代方案中，異源啟動子係在遺傳修飾期間在編碼鏈上第一編碼外顯子之上游插入，或遺傳修飾得到藉助完成基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在該合成之第一編碼外顯子之上游。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4+之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外顯子。在一些替代方案中，異源啟動子係組成型啟動子。在一些替代方案中，組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。在一些替代方案中，異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。在一些替代方案中，異源啟動子係誘導型啟動子。在一些替代方案中，誘導型啟動子可藉由藥物或

類固醇誘導。在一些替代方案中，異源啟動子係在第一編碼外顯子之上游插入。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄增強子結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含異源轉錄活化結構域。在一些替代方案中，核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。在一些替代方案中，異源啟動子係在編碼鏈上一或多個調節元件之下游插入。在一些替代方案中，該一或多個調節元件經遺傳修飾。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，給予個體組合療法，其中投與該個體抗排斥藥物與工程化細胞之組合。在一些替代方案中，選擇個體以接受抗排斥藥劑。在一些替代方案中，抗排斥藥劑包含普賴松、依木蘭(硫唑嘌呤)、驍悉(嗎替麥考酚酯或MMF)、米芙(麥考酚酸)、斥消靈(西羅莫司)、新體睦(環孢素)或普樂可複(他克莫司)。在一些替代方案中，監測個體在治療過程期間活體內FOXp3⁺Treg⁻表型細胞群體之變化。在一些替代方案中，選擇個體以接受工程化細胞之再次投與。在一些替代方案中，選擇有需要之個體以接受抗排斥療法或抗炎療法。在一些替代方案中，該方法進一步包含藉由對遺傳工程化細胞進行定序以測定工程化細胞在個體中維持、增加或減少從而確定工程化細胞在有需要之個體中。在一些替代方案中，選擇個體以接受抗排斥藥劑。在一些替代方案中，抗排斥藥劑包含普賴松、依木蘭(硫唑嘌呤)、驍悉(嗎替麥考酚酯

或MMF)、米芙(麥考酚酸)、斥消靈(西羅莫司)、新體睦(環孢素)或普樂可複(他克莫司)。在一些替代方案中，抗炎藥物包含Tysabri®、類固醇、免疫阻抑劑、NSAID、免疫球蛋白、撲熱息痛、塞來昔布、吲哚美辛或雙氯芬酸。在一些替代方案中，在治療、抑制或改善過程之前、期間及/或之後監測個體活體內表現FOXP3⁺之工程化T細胞、及表現Treg表型之工程化細胞群體或致病性T或B細胞群體之變化。在一些替代方案中，取決於對治療、抑制或改善之第一反應，選擇個體以接受工程化細胞之再次投與。在一些替代方案中，自初始劑量1週、2週或一個月內投與個體另一劑量之細胞。在本文中所闡述之治療方法之一些替代方案中，該等方法進一步包含監測個體以測定在接受細胞之第一次投與之前、期間及/或之後工程化細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，自個體取出細胞樣品以檢測工程化細胞且測定工程化細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，若工程化細胞在個體中減少，則向有需要之個體給予再次投與工程化細胞。在一些替代方案中，用於自體免疫疾病之標準療法或用於抗炎療法之標準療法難以治療個體。在一些替代方案中，標準抗排斥藥劑或標準抗排斥療法難以治療個體。因此，在一些替代方案中，選擇個體以接受表現FOXP3之遺傳工程化細胞。

在一些替代方案中，提供治療、抑制或改善個體之自體免疫病症之方法，該方法包含自有需要之個體取出細胞，其中該等細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件、FOXP3基因或其部分，其中該FOXP3基因或其部分包含第一編碼外顯子；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；將該第二核苷酸序列或蛋白質核酸酶引入至該細胞中進行遺傳修飾，其中該遺傳

修飾係將啟動子插入至該第一核苷酸序列中之基因敲入過程；及將該細胞引入至該個體中用於治療、抑制或改善。在一些替代方案中，自體免疫疾病係類風濕性關節炎、糖尿病、發炎性腸病、IPEX (免疫失調、多內分泌病、腸病、X-連鎖(IPEX)症候群)、克隆氏病、多發性硬化、特發性或全身性紅斑狼瘡。在一些替代方案中，鑑別或選擇個體以接受用於自體免疫疾病之療法。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4+之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8+之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，給予個體組合療法，其中投與該個體用於改善自體免疫疾病症狀之藥物與工程化細胞之組合。在一些替代方案中，選擇個體以接受抗排斥藥劑。在一些替代方案中，抗排斥藥劑包含普賴松、依木蘭(硫唑嘌呤)、驍悉(嗎替麥考酚酯或MMF)、米芙(麥考酚酸)、斥消靈(西羅莫司)、新體睦(環孢素)或普樂可複(他克莫司)。在一些替代方案中，監測個體在治療過程期間活體內FOXP3+Treg-表型細胞群體之變化。在一些替代方案中，選擇個體以接受工程化細胞之再次投與。在一些替代方案中，選擇有需要之個體以接受抗排斥療法或抗炎療法。在一些替代方案中，該方法進一步包含藉由對遺傳工程化細胞進行定序以測定工程化細胞在個體中維持、增加或減少從而確定工程化細胞在有需要之個體中。在一些替代方案中，選擇個體以接受抗排斥藥劑。在一些替代方案中，抗排斥藥劑包含普賴松、依木蘭(硫唑嘌呤)、驍悉(嗎替麥考酚酯或MMF)、米芙(麥考酚酸)、斥消靈(西羅莫司)、新體睦(環孢素)或普樂可複(他克莫司)。在一些替代方案中，抗炎藥物包含Tysabri®、類固醇、免疫阻抑劑、NSAID、免疫球蛋白、撲熱息痛、塞來昔布、吲哚美辛或雙

氯芬酸。在一些替代方案中，在治療過程之前、期間及/或之後監測個體活體內表現**FOXP3+**之工程化T細胞、及表現**Treg**表型之工程化細胞群體或致病性**T**或**B**細胞群體之變化。在一些替代方案中，取決於對治療之第一反應，選擇個體以接受工程化細胞之再次投與。在一些替代方案中，自初始劑量1週、2週或一個月內投與個體另一劑量之細胞。在本文中所闡述之治療方法之一些替代方案中，該等方法進一步包含監測個體以測定工程化細胞是否在治療之前、期間及/或之後維持、增加或減少。在一些替代方案中，自個體取出細胞樣品以檢測工程化細胞且測定工程化細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，若工程化細胞在個體中減少，則向有需要之個體給予再次投與工程化細胞。在一些替代方案中，用於自體免疫疾病之標準療法或用於抗炎療法之標準療法難以治療個體。在一些替代方案中，標準抗排斥藥劑或標準抗排斥療法難以治療個體。因此，在一些替代方案中，選擇個體以接受表現**FOXP3**之遺傳工程化細胞。

在一些替代方案中，提供治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用之方法，該方法包含自有需要之個體取出細胞，其中該等細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件、**FOXP3**基因或其部分，其中該**FOXP3**基因或其部分包含第一編碼外顯子；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；將該第二核苷酸序列或蛋白質核酸酶引入至該細胞中進行遺傳修飾，其中該遺傳修飾係將啟動子插入至該第一核苷酸序列中之基因敲入過程；及將該細胞引入至該個體中用於治療。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現**CD4+**之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現**CD8+**之細胞。在一些替代

方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，給予個體組合療法，其中投與該個體抗排斥藥物與工程化細胞之組合。在一些替代方案中，選擇個體以接受抗排斥藥劑。在一些替代方案中，抗排斥藥劑包含普賴松、依木蘭(硫唑嘌呤)、驍悉(嗎替麥考酚酯或MMF)、米芙(麥考酚酸)、斥消靈(西羅莫司)、新體睦(環孢素)或普樂可複(他克莫司)。在一些替代方案中，監測個體在治療、抑制或改善過程期間活體內FOXP3+Treg-表型細胞群體之變化。在一些替代方案中，選擇個體以接受工程化細胞之再次投與。在一些替代方案中，選擇有需要之個體以接受抗排斥療法或抗炎療法。在一些替代方案中，該方法進一步包含藉由對遺傳工程化細胞進行定序以測定工程化細胞在個體中維持、增加或減少從而確定工程化細胞在有需要之個體中。在一些替代方案中，選擇個體以接受抗排斥藥劑。在一些替代方案中，抗排斥藥劑包含普賴松、依木蘭(硫唑嘌呤)、驍悉(嗎替麥考酚酯或MMF)、米芙(麥考酚酸)、斥消靈(西羅莫司)、新體睦(環孢素)或普樂可複(他克莫司)。在一些替代方案中，抗炎藥物包含Tysabri®、類固醇、免疫抑制劑、NSAID、免疫球蛋白、撲熱息痛、塞來昔布、吲哚美辛或雙氯芬酸。在一些替代方案中，在治療、抑制或改善過程之前、期間及/或之後監測個體活體內表現FOXP3+之工程化T細胞、及表現Treg表型之工程化細胞群體或致病性T或B細胞群體之變化。在一些替代方案中，取決於對治療之第一反應，選擇個體以接受工程化細胞之再次投與。在一些替代方案中，自初始劑量1週、2週或一個月內投與個體另一劑量之細胞。在本文中所闡述之治療、抑制或改善方法之一些替代方案中，該等方法進一步包含監測個體以測定工程化細胞是否在治療之前、期間及/或之後維持、增加或減少。在一些替代方案中，自個體取出細胞樣品以檢測工

程化細胞且測定工程化細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，若工程化細胞在個體中減少，則向有需要之個體給予再次投與工程化細胞。在一些替代方案中，用於自體免疫疾病之標準療法或用於抗炎療法之標準療法難以治療個體。在一些替代方案中，標準抗排斥藥劑或標準抗排斥療法難以治療個體。因此，在一些替代方案中，選擇個體以接受表現FOXP3之遺傳工程化細胞。

在一些替代方案中，提供治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用(例如器官排斥)之方法，該方法包含自有需要之個體取出細胞，其中該等細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件、FOXP3基因或其部分，其中該FOXP3基因或其部分包含第一編碼外顯子；提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；將該第二核苷酸序列或蛋白質核酸酶引入至該細胞中進行遺傳修飾，其中該遺傳修飾係將啟動子插入至該第一核苷酸序列中之基因敲入過程；及將該細胞引入至該個體中用於治療。在一些替代方案中，細胞係前體幹細胞。在一些替代方案中，細胞係造血幹細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD4⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係表現CD8⁺之細胞。在一些替代方案中，細胞係調節性T細胞。在一些替代方案中，給予個體組合療法，其中投與該個體抗排斥藥物與工程化細胞之組合。在一些替代方案中，選擇個體以接受抗排斥藥劑。在一些替代方案中，抗排斥藥劑包含普賴松、依木蘭(硫唑嘌呤)、驍悉(嗎替麥考酚酯或MMF)、米芙(麥考酚酸)、斥消靈(西羅莫司)、新體睦(環孢素)或普樂可複(他克莫司)。在一些替代方案中，監測個體在治療過程期間活體內FOXp3⁺Treg⁻表型細胞群體之變化。在一些替代方案中，選擇個體以接受工程化細胞之再次

投與。在一些替代方案中，選擇有需要之個體以接受抗排斥療法或抗炎療法。在一些替代方案中，該方法進一步包含藉由對遺傳工程化細胞進行定序以測定工程化細胞在個體中維持、增加或減少從而確定工程化細胞在有需要之個體中。在一些替代方案中，選擇個體以接受抗排斥藥劑。在一些替代方案中，抗排斥藥劑包含普賴松、依木蘭(硫唑嘌呤)、驍悉(嗎替麥考酚酯或MMF)、米芙(麥考酚酸)、斥消靈(西羅莫司)、新體睦(環孢素)或普樂可複(他克莫司)。在一些替代方案中，抗炎藥物包含Tysabri®、類固醇、免疫阻抑劑、NSAID、免疫球蛋白、撲熱息痛、塞來昔布、吲哚美辛或雙氯芬酸。在一些替代方案中，在治療、抑制或改善過程之前、期間及/或之後監測個體活體內表現FOXP3+之工程化T細胞、及表現Treg表型之工程化細胞群體或致病性T或B細胞群體之變化。在一些替代方案中，取決於對細胞之第一次投與之第一反應，選擇個體以接受工程化細胞之再次投與。在一些替代方案中，自初始劑量1週、2週或一個月內投與個體另一劑量之細胞。在本文中所闡述之治療方法之一些替代方案中，該等方法進一步包含監測個體以測定在接受工程化細胞之前、期間及/或之後該等細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，自個體取出細胞樣品以檢測工程化細胞且測定工程化細胞是否維持、增加或減少。在一些替代方案中，若工程化細胞在個體中減少，則向有需要之個體給予再次投與工程化細胞。在一些替代方案中，用於自體免疫疾病之標準療法或用於抗炎療法之標準療法難以治療個體。在一些替代方案中，標準抗排斥藥劑或標準抗排斥療法難以治療個體。因此，在一些替代方案中，選擇個體以接受表現FOXP3之遺傳工程化細胞。



201819628

【發明摘要】**【中文發明名稱】**

使用具有工程化穩定表現內源性FOXP3基因之CD4 T細胞治療自體免疫疾病的方法

【英文發明名稱】

METHOD FOR TREATING AUTOIMMUNE DISEASE USING CD4 T-CELLS WITH ENGINEERED STABILIZATION OF EXPRESSION OF ENDOGENOUS FOXP3 GENE

【中文】

本發明揭示製備表現FOXP3之遺傳工程化細胞之方法及治療方法。在一些實施例中，該方法可提供第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含一或多個調節元件及FOXP3基因或其部分；提供核酸酶；且對該第一核苷酸序列實施基因編輯過程，該基因編輯過程編輯該一或多個調節元件，且視情況編輯該FOXP3基因或其部分。亦提供治療患有自體免疫疾病之個體及遭受器官移植效應之個體之方法。

【英文】

Disclosed are methods of making a genetically cell that expressed FOXP3 and methods of treatment. In some embodiments, the method can providing a first nucleotide sequence, wherein the first nucleotide sequence comprises a coding strand, the coding strand comprising one or more regulatory elements and a FOXP3 gene or portion thereof providing a nuclease and performing a gene editing process on the first nucleotide sequence, which edits said one or more regulatory elements,

and optionally edits the FOXP3 gene or portion thereof. Methods of treating a subject suffering from an autoimmune disease and subjects suffering the effects of organ transplantation are also provided.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種製備用於表現FOXP3之核酸之方法，該方法包含：

提供第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含：

一或多個調節元件；及

FOXP3基因或其部分；

提供核酸酶；且

對該第一核苷酸序列實施基因編輯過程，該基因編輯過程編輯該一或多個調節元件，且視情況編輯該FOXP3基因或其部分。

【第2項】

如請求項1之方法，其中該第一核苷酸序列包含靶向基因座。

【第3項】

如請求項2之方法，其中該靶向基因座包含天然第一編碼外顯子。

【第4項】

如請求項2之方法，其中完成該基因編輯過程在該基因編輯過程之後在該靶向基因座中產生第一編碼外顯子。

【第5項】

如請求項2至4中任一項之方法，其中該靶向基因座係在該一或多個調節元件處。

【第6項】

如請求項2至4中任一項之方法，其中該靶向基因座係在該FOXP3基因或其部分處。

【第7項】

如請求項2至4中任一項之方法，其中該FOXP3基因或其部分包含該第一天然編碼外顯子。

【第8項】

如請求項1至4中任一項之方法，其中該核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。

【第9項】

如請求項1至4中任一項之方法，其中該基因編輯過程係用於插入異源啟動子、異源轉錄增強子結構域或二者之基因敲入過程。

【第10項】

如請求項9之方法，其中該異源啟動子係組成型啟動子。

【第11項】

如請求項10之方法，其中該啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。

【第12項】

如請求項9之方法，其中該啟動子係異源弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。

【第13項】

如請求項9之方法，其中該啟動子係誘導型啟動子。

【第14項】

如請求項13之方法，其中該誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。

【第15項】

如請求項1至4或10至14中任一項之方法，其中該方法進一步包含插入異源轉錄增強子結構域，其中該增強子結構域係在該一或多個調節序列之上游或下游。

【第16項】

如請求項1至4或10至14中任一項之方法，其中該方法進一步包含插入異源轉錄活化結構域。

【第17項】

如請求項1至4或10至14中任一項之方法，其中該方法進一步包含插入遍在染色質開放元件(UCOE)。

【第18項】

如請求項1至4或10至14中任一項之方法，其中該方法進一步包含插入誘導型效應子。

【第19項】

如請求項18之方法，其中該誘導型效應子可藉由類固醇或藥物誘導。

【第20項】

如請求項10至14或18中任一項之方法，其中插入該異源啟動子，其中該異源啟動子之插入生成該第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在該編碼鏈上之該第一編碼外顯子上游之任何位置處，且其中該編碼鏈進一步包含該FOXP3基因之起始密碼子。

【第21項】

如請求項10至14或18中任一項之方法，其中該異源啟動子係在該編碼鏈上之該第一天然外顯子上游之任何位置處插入，且其中該編碼鏈進一

步包含該FOXP3基因之起始密碼子。

【第22項】

如請求項10至14或18中任一項之方法，其中該異源啟動子係在該編碼鏈上之該一或多個調節元件之下游插入。

【第23項】

如請求項1至4、10至14或19中任一項之方法，其中該方法進一步包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。

【第24項】

一種用於FOXP3表現之核酸，其係藉由如請求項1至23中任一項之方法中之任一者所製得。

【第25項】

一種核酸，其包含：

編碼鏈，該編碼鏈包含異源調節元件；及

異源啟動子，該等異源調節元件及該異源啟動子可操作地連接至FOXP3基因或其部分，其中該FOXP3基因或其部分包含第一編碼外顯子。

【第26項】

如請求項25之核酸，其中該異源啟動子係組成型啟動子。

【第27項】

如請求項26之核酸，其中該組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。

【第28項】

如請求項26之核酸，其中該異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之

表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。

【第29項】

如請求項26之核酸，其中該啟動子係誘導型啟動子。

【第30項】

如請求項29之核酸，其中該誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。

【第31項】

如請求項25至30中任一項之核酸，其中該異源啟動子係在該第一編碼外顯子之上游位置處。

【第32項】

如請求項25至30中任一項之核酸，其進一步包含異源轉錄增強子結構域。

【第33項】

如請求項25至30中任一項之核酸，其進一步包含異源轉錄活化結構域。

【第34項】

如請求項25至30中任一項之核酸，其進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。

【第35項】

如請求項25至30中任一項之核酸，其中該異源啟動子係在該編碼鏈上之該一或多個調節元件之下游插入。

【第36項】

如請求項25至30中任一項之核酸，其中該一或多個調節元件經遺傳

修飾。

【第37項】

一種製備遺傳工程化細胞之方法，該方法包含：

提供細胞，其中該細胞包含第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包含編碼鏈，該編碼鏈包含：

一或多個調節元件；及

FOXP3基因或其部分；

提供編碼核酸酶之第二核苷酸序列或提供蛋白質核酸酶；且

將第二寡核苷酸或蛋白質核酸酶引入至該細胞中用於基因編輯過程。

【第38項】

如請求項37之方法，其中該基因編輯過程係將異源啟動子插入至該第一核苷酸序列中之基因敲入過程。

【第39項】

如請求項37或38之方法，其中該編碼鏈包含第一編碼外顯子。

【第40項】

如請求項37或38之方法，其中該第一核苷酸序列包含靶向基因座。

【第41項】

如請求項39之方法，其中該靶向基因座包含天然編碼外顯子或該第一編碼外顯子。

【第42項】

如請求項37或38之方法，其中完成該基因編輯過程在該基因編輯過程之後在該靶向基因座中產生第一編碼外顯子。

【第43項】

如請求項42之方法，其中該靶向基因座係在該第一編碼外顯子上游之10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或110個鹼基對或由以上所提及之任兩個值所界定範圍之間的任何數量之鹼基對內。

【第44項】

如請求項37、38、41或43中任一項之方法，其中該基因編輯過程進一步包含產生合成之第一編碼外顯子。

【第45項】

如請求項37、38、41或43中任一項之方法，其中該核酸酶係Cas9、鋅指核酸酶或TALEN。

【第46項】

如請求項37、38、41或43中任一項之方法，其中該異源啟動子係組成型啟動子。

【第47項】

如請求項46之方法，其中該異源啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。

【第48項】

如請求項37、38、41、43或47中任一項之方法，其中該異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。

【第49項】

如請求項37、38、41、43或47中任一項之方法，其中該異源啟動子係誘導型啟動子。

【第50項】

如請求項49之方法，其中該誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。

【第51項】

如請求項37、38、41、43、47或50中任一項之方法，其中該方法進一步包含將異源增強子結構域(例如，TCRa增強子)插入至該第一核苷酸序列中，其中該增強子結構域係在該一或多個調節序列之上游或下游。

【第52項】

如請求項37、38、41、43、47或50中任一項之方法，其中該方法進一步包含將異源轉錄活化結構域插入至該第一核苷酸序列中。

【第53項】

如請求項37、38、41、43、47或50中任一項之方法，其中該方法進一步包含將遍在染色質開放元件(UCOE)插入至該第一核苷酸序列中。

【第54項】

如請求項38、41、43、47或50中任一項之方法，其中該異源啟動子係在遺傳修飾期間在該編碼鏈上之該第一編碼外顯子之上游插入，或該遺傳修飾得到藉助完成該基因編輯過程而產生之合成之第一編碼外顯子，其中該異源啟動子係在該合成之第一編碼外顯子之上游。

【第55項】

如請求項37、38、41、47或50中任一項之方法，其中該異源啟動子係在該編碼鏈上之該一或多個調節元件之下游插入。

【第56項】

如請求項37、38、41、47或50中任一項之方法，其中該方法進一步

包含對該一或多個調節元件進行遺傳修飾。

【第57項】

如請求項37、38、41、47或50中任一項之方法，其中該細胞係前體幹細胞。

【第58項】

如請求項37、38、41、47或50中任一項之方法，其中該細胞係造血幹細胞。

【第59項】

如請求項37、38、41、47或50中任一項之方法，其中該細胞係表現CD4+之細胞。

【第60項】

如請求項37、38、41、47或50中任一項之方法，其中該細胞係表現CD8+之細胞。

【第61項】

如請求項37、38、41、47或50中任一項之方法，其中該細胞係調節性T細胞。

【第62項】

一種用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞，其係藉由如請求項37至61中任一項之方法來製造。

【第63項】

一種用於表現FOXP3之遺傳工程化細胞，該遺傳工程化細胞包含核酸，其中該核酸包含編碼鏈，該編碼鏈包含可操作地連接至FOXP3基因之一或多個調節元件及異源啟動子，其中該FOXP3基因包含第一編碼外

顯子。

【第64項】

如請求項63之遺傳工程化細胞，其中該異源啟動子係組成型啟動子。

【第65項】

如請求項64之遺傳工程化細胞，其中該組成型啟動子係EF1 α 啟動子、PGK啟動子或MND啟動子。

【第66項】

如請求項63之遺傳工程化細胞，其中該異源啟動子係弱啟動子(例如，所生成之表現少於內源性啟動子及/或組成型啟動子之啟動子)。

【第67項】

如請求項63之遺傳工程化細胞，其中該異源啟動子係誘導型啟動子。

【第68項】

如請求項67之遺傳工程化細胞，其中該誘導型啟動子可藉由藥物或類固醇誘導。

【第69項】

如請求項63至68中任一項之遺傳工程化細胞，其中該異源啟動子係在該第一編碼外顯子之上游插入。

【第70項】

如請求項63至68中任一項之遺傳工程化細胞，其中該核酸進一步包含異源轉錄增強子結構域。

【第71項】

如請求項63至68中任一項之遺傳工程化細胞，其中該核酸進一步包含異源轉錄活化結構域。

【第72項】

如請求項63至68中任一項之遺傳工程化細胞，其中該核酸進一步包含遍在染色質開放元件(UCOE)。

【第73項】

如請求項63至68中任一項之遺傳工程化細胞，其中該異源啟動子係在該編碼鏈上之該一或多個調節元件之下游插入。

【第74項】

如請求項63至68中任一項之遺傳工程化細胞，其中該一或多個調節元件經遺傳修飾。

【第75項】

如請求項63至68中任一項之遺傳工程化細胞，其中該細胞係前體幹細胞。

【第76項】

如請求項63至68中任一項之遺傳工程化細胞，其中該細胞係造血幹細胞。

【第77項】

如請求項63至68中任一項之遺傳工程化細胞，其中該細胞係表現CD4⁺之細胞。

【第78項】

如請求項63至68中任一項之遺傳工程化細胞，其中該細胞係表現CD8⁺之細胞。

【第79項】

如請求項63至68中任一項之遺傳工程化細胞，其中該細胞係調節性T細胞。

【第80項】

一種組合物，其包含：

如請求項62至79之細胞中之任一或多種之遺傳工程化細胞；及
醫藥賦形劑。

【第81項】

一種如請求項62至79之細胞中之任一或多種之遺傳修飾細胞或如請求項80之組合物之用途，其用於製造用於治療個體之自體免疫病症之藥劑。

【第82項】

如請求項81之用途，其中該自體免疫疾病係類風濕性關節炎、糖尿病、發炎性腸病、IPEX（免疫失調、多內分泌病、腸病、X-連鎖(IPEX)症候群）、克隆氏病(Crohn's disease)、多發性硬化、特發性或全身性紅斑狼瘡。

【第83項】

如請求項81之用途，其中鑑別或選擇該個體以接受用於自體免疫疾病之療法。

【第84項】

一種如請求項62至79之細胞中之任一或多種之遺傳修飾細胞或如請求項80之組合物之用途，其用於製造用於治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用之藥劑。

【第85項】

一種如請求項62至79之細胞中之任一或多種之遺傳修飾細胞或如請求項80之組合物之用途，其用於製造用於治療、抑制或改善個體中器官移植之副作用、例如器官排斥之藥劑。

【第86項】

如請求項82之用途，其中該細胞係前體幹細胞。

【第87項】

如請求項82之用途，其中該細胞係造血幹細胞。

【第88項】

如請求項82之用途，其中該細胞係表現CD4⁺之細胞。

【第89項】

如請求項82之用途，其中該細胞係表現CD8⁺之細胞。

【第90項】

如請求項82之用途，其中該細胞係調節性T細胞。

