202321435

(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 202321435 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：111130279 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 08 月 11 日

(51)Int. Cl.： *C12N5/071 (2010.01)* *C12N5/079 (2010.01)*
C12N5/0783 (2010.01) *C12N15/113 (2010.01)*
C07K14/705 (2006.01) *A61K35/17 (2015.01)*
A61K35/30 (2015.01) *A61K35/36 (2015.01)*
A61K35/39 (2015.01) *A61K35/44 (2015.01)*
A61K35/55 (2015.01) *A61K48/00 (2006.01)*

(30)優先權：2021/08/11 美國 63/232,141
2021/10/21 美國 63/270,454

(71)申請人：美商薩那生物科技公司 (美國) SANA BIOTECHNOLOGY, INC. (US)
美國

(72)發明人：道鐸 威廉 DOWDLE, WILLIAM (US)；杉 艾里諾 THAM, ELEONORE (FR)；雷默斯查 雷貝卡 RAMOS-ZAYAS, REBECA (US)；許瑞弗 桑雅 SCHREPFER, SONJA (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：326 項 圖式數：7 共 845 頁

(54)名稱

用於改變低免疫原性細胞中之基因表現之可誘導系統

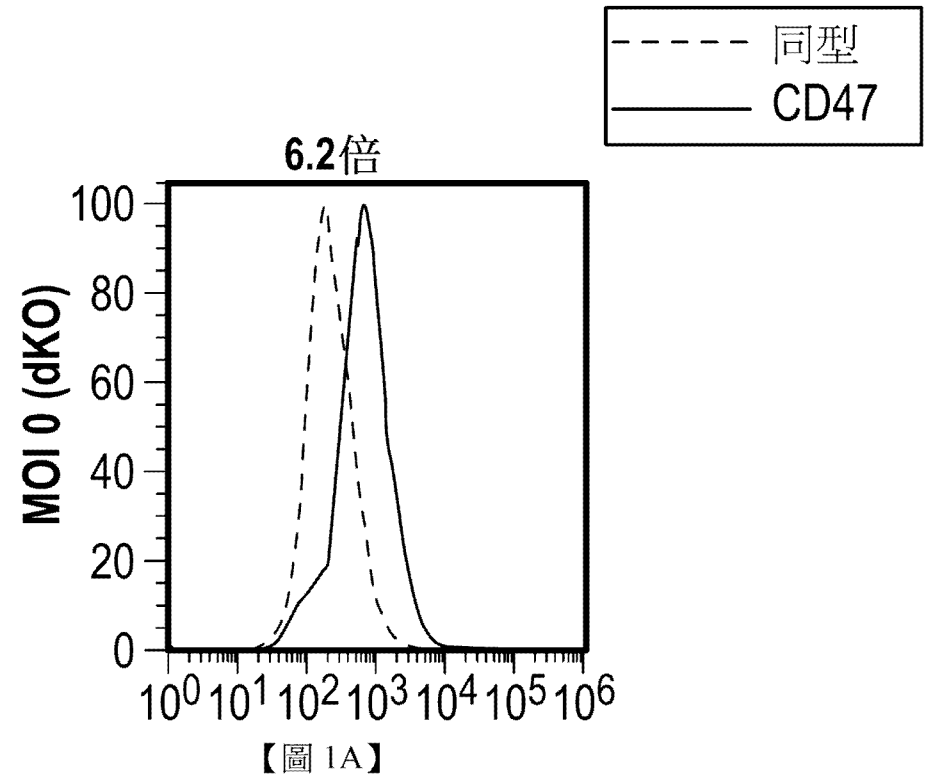
(57)摘要

本文揭示經改造細胞及/或低免疫原性細胞，包括經改造細胞及/或低免疫原性幹細胞、經改造細胞及/或自其分化之低免疫原性細胞、及/或經改造細胞及/或低免疫原性 CAR-T 細胞(原代細胞或自經改造及/或低免疫原性幹細胞分化)，及其使用及生成之相關方法，該等方法包括一或多種 MHC I 類及/或 MHC II 類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現及 CD47 之可調控的過表現。本文提供進一步展現減少的 T 細胞受體表現之細胞。

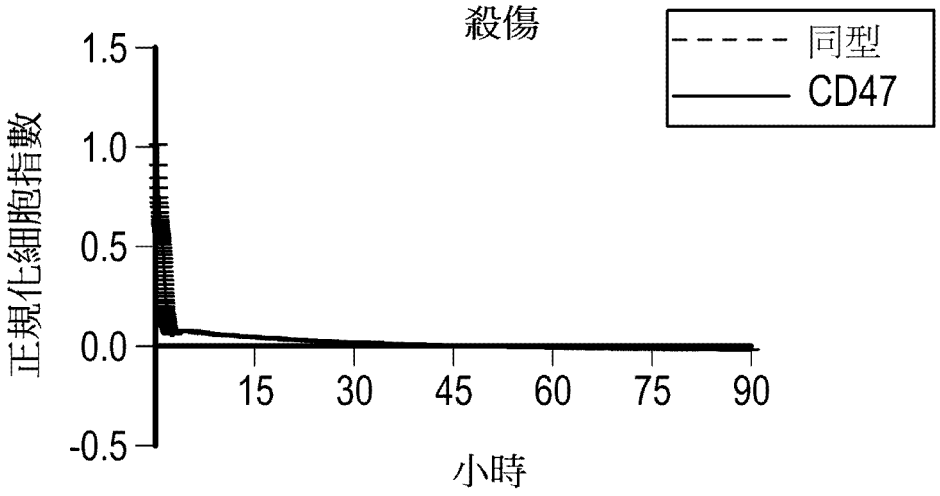
Disclosed herein are engineered cells and/or hypoimmunogenic cells including engineered cells and/or hypoimmunogenic stem cells, engineered cells and/or hypoimmunogenic cells differentiated therefrom, and/or engineered cells and/or hypoimmunogenic CAR-T cells (primary or differentiated from engineered and/or hypoimmunogenic stem cells) and related methods of their use and generation comprising regulatable reduced expression of one or more MHC class I and/or MHC class II human leukocyte antigen molecules and regulatable overexpression of CD47. Provided herein are cells further exhibiting reduced expression of T-cell receptors.

指定代表圖：

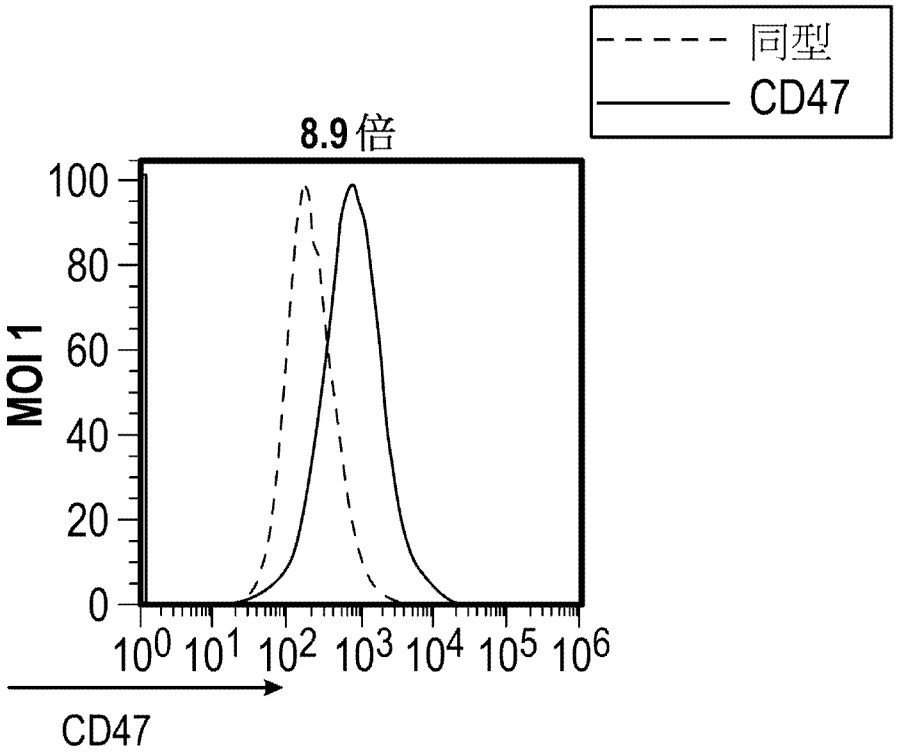
TW 202321435 A



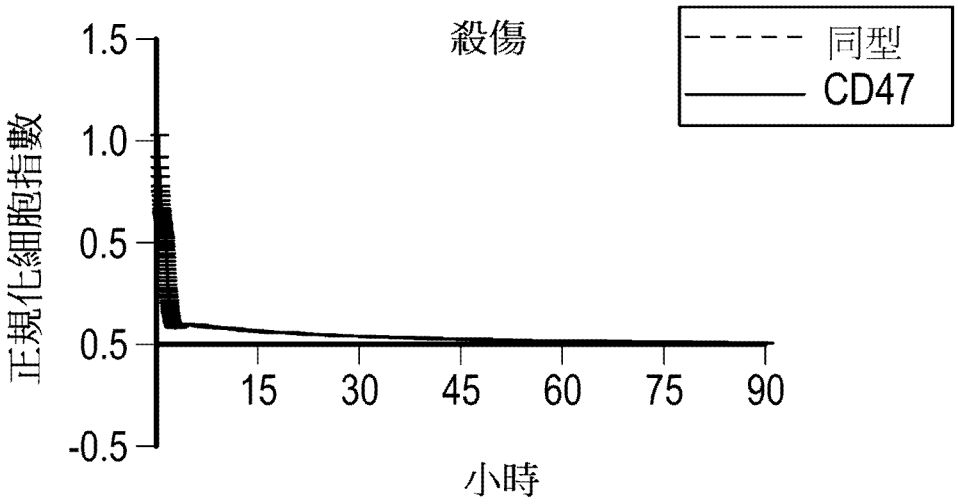
【圖 1A】



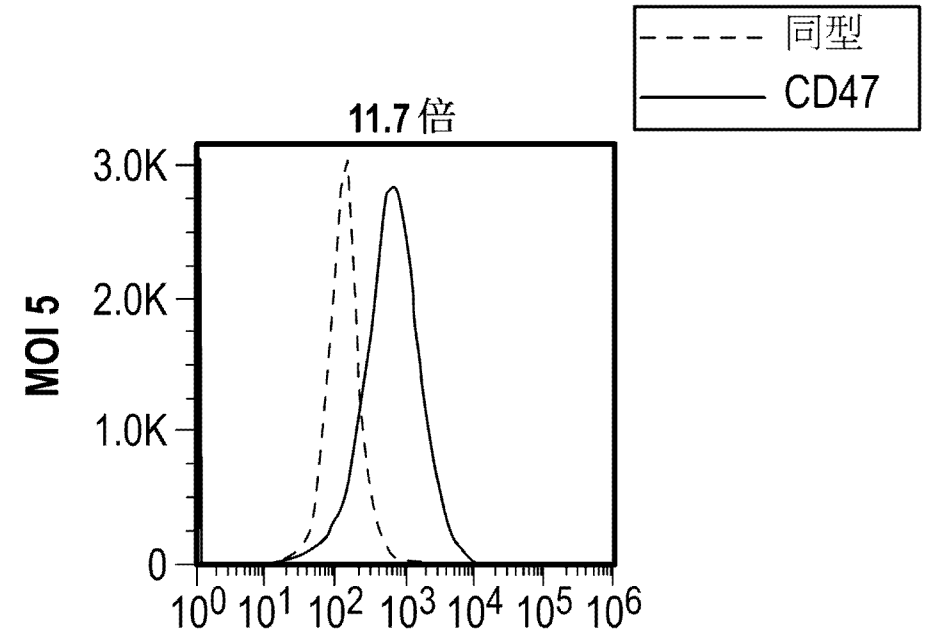
【圖 1B】


同型
CD47
8.9倍
MOI 1
100
80
60
40
20
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
CD47

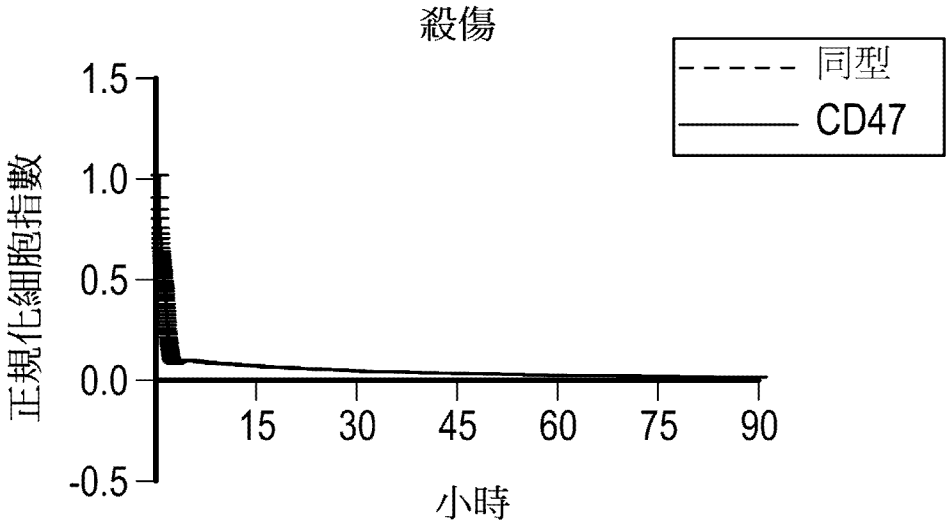
【圖 1C】


殺傷
同型
CD47
正規化細胞指數
1.5
1.0
0.5
0.5
-0.5
15
30
45
60
75
90
小時

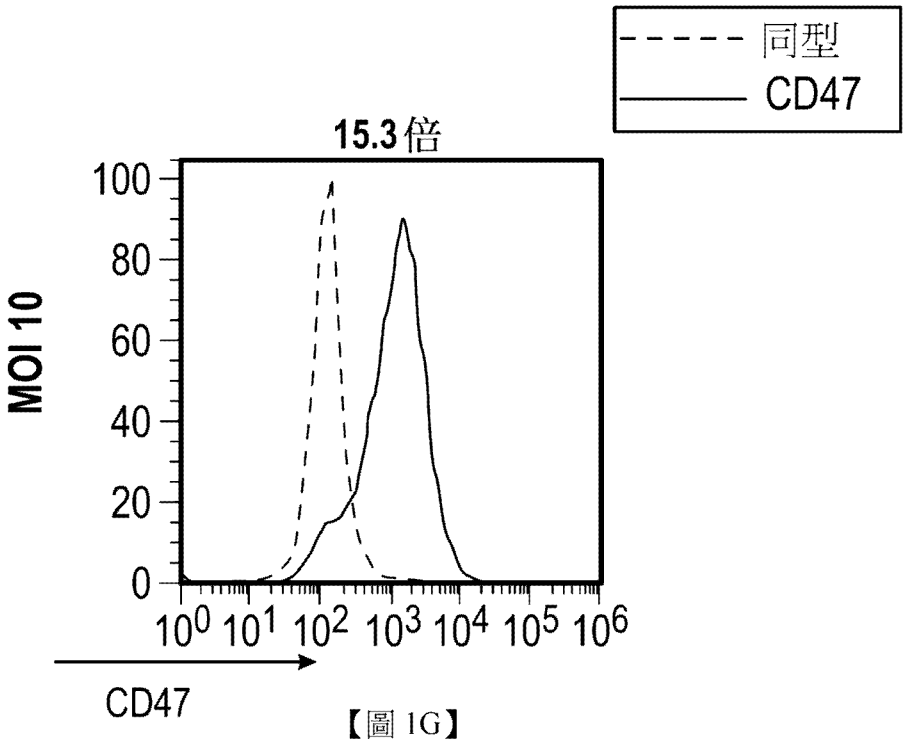
【圖 1D】


同型
CD47
11.7 倍
MOI 5
3.0K
2.0K
1.0K
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6

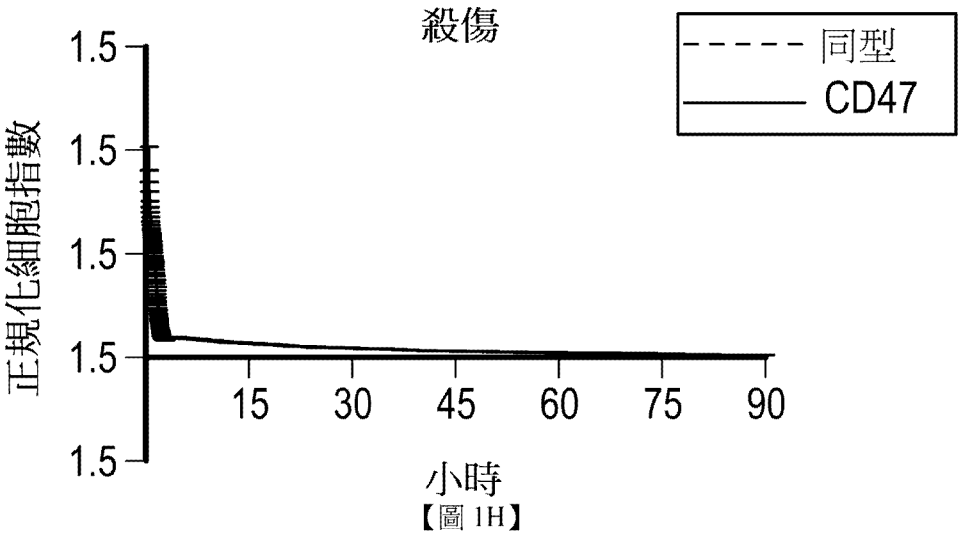
【圖 1E】


殺傷
同型
CD47
正規化細胞指數
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
15
30
45
60
75
90
小時

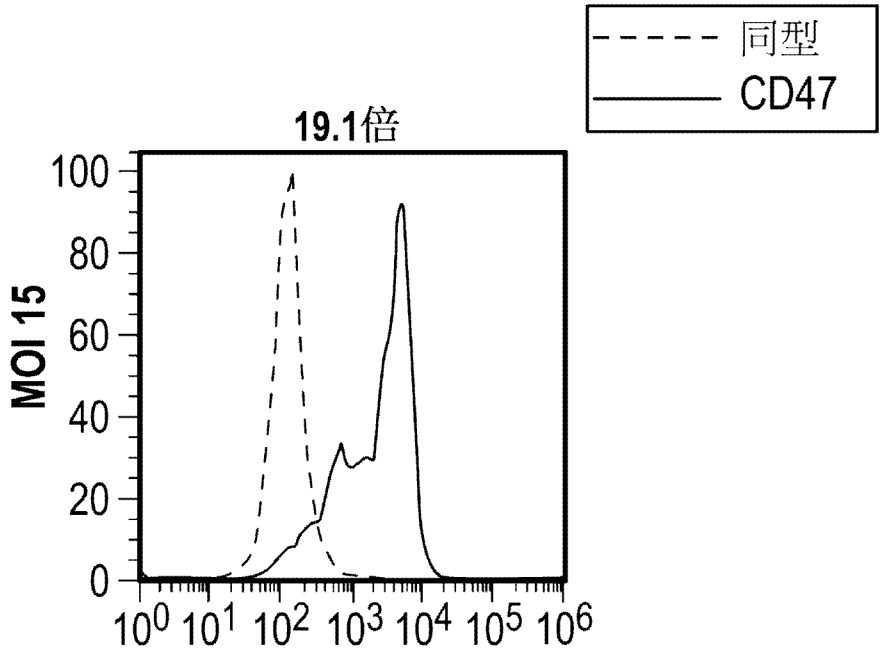
【圖 1F】


同型
CD47
15.3倍
MOI 10
100
80
60
40
20
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
CD47

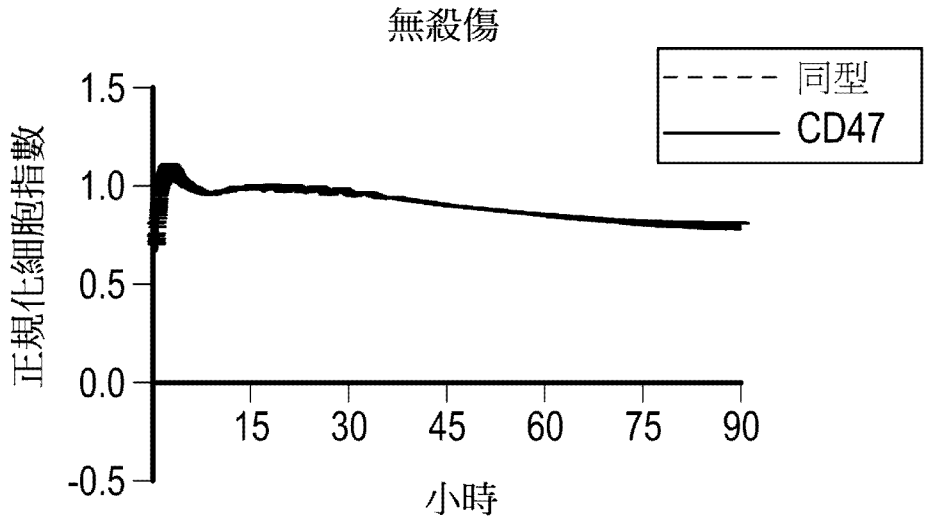
【圖 1G】


殺傷
同型
CD47
正規化細胞指數
1.5
1.5
1.5
1.5
1.5
15
30
45
60
75
90
小時

【圖 1H】

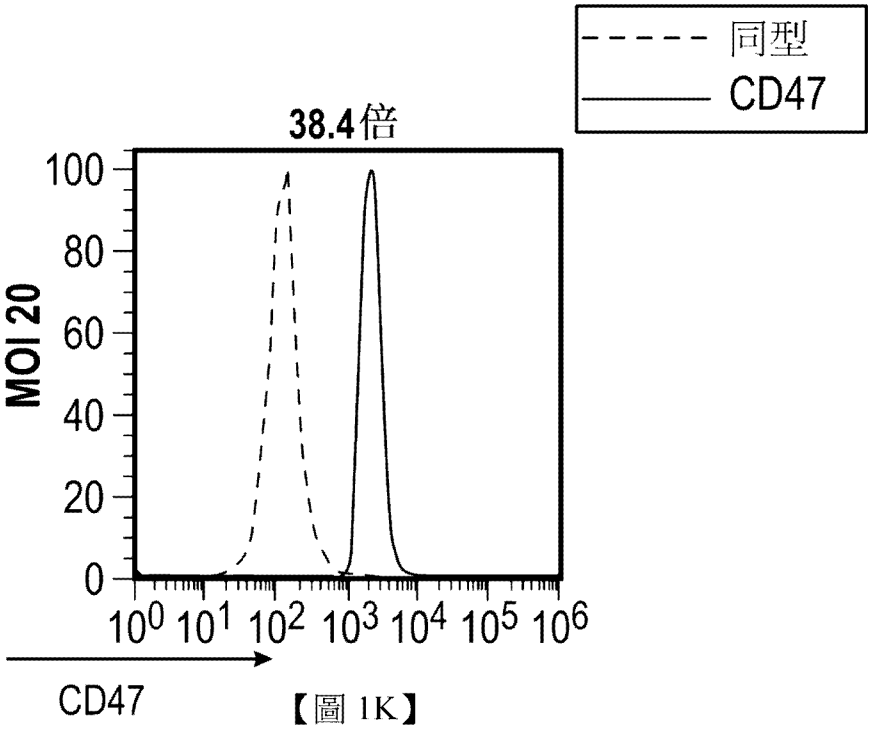

同型
CD47
19.1倍
MOI 15
100
80
60
40
20
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6

【圖 1I】

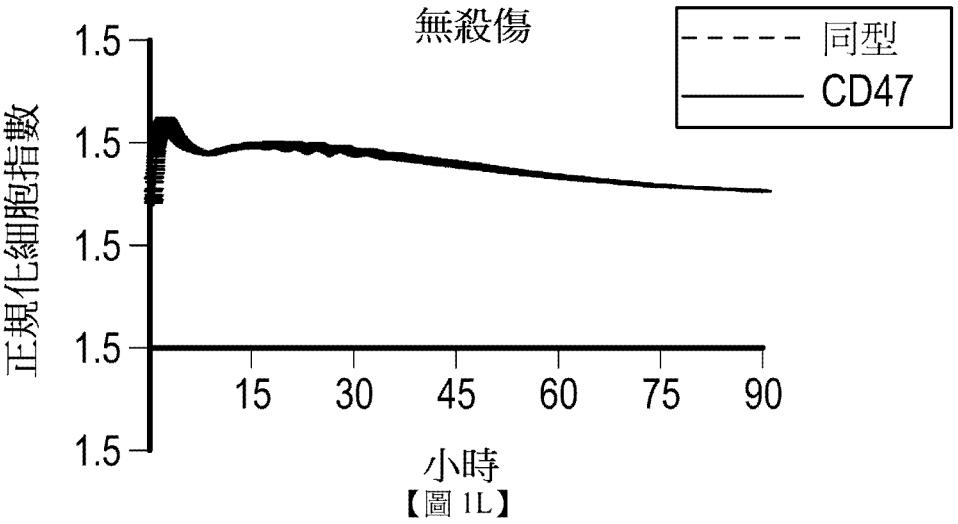

無殺傷
同型
CD47
正規化細胞指數
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
15
30
45
60
75
90
小時

【圖 1J】

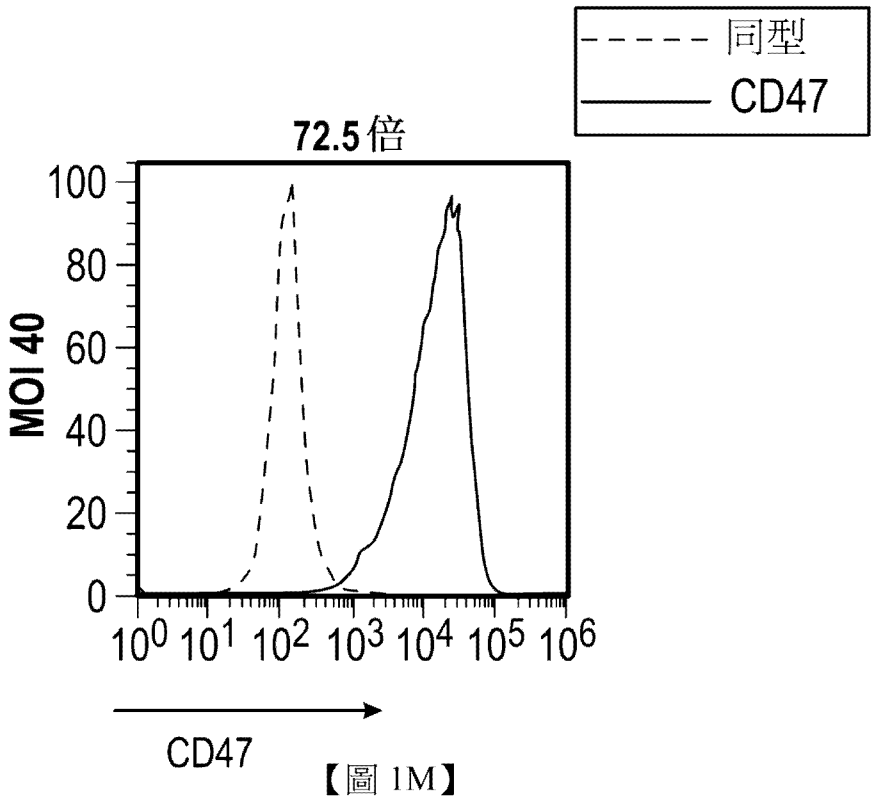
TW 202321435 A



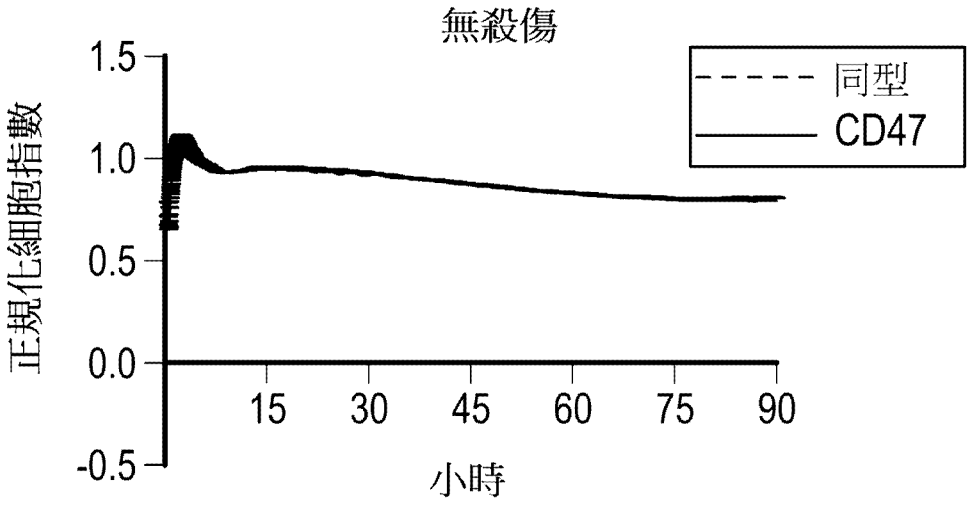
【圖 1K】



【圖 1L】


同型
CD47
72.5倍
MOI 40
100
80
60
40
20
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
CD47

【圖 1M】


無殺傷
同型
CD47
正規化細胞指數
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
15
30
45
60
75
90
小時

【圖 1N】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於改變低免疫原性細胞中之基因表現之可誘導系統

【英文發明名稱】

INDUCIBLE SYSTEMS FOR ALTERING GENE EXPRESSION IN HYPOIMMUNOGENIC CELLS

【中文】

本文揭示經改造細胞及/或低免疫原性細胞，包括經改造細胞及/或低免疫原性幹細胞、經改造細胞及/或自其分化之低免疫原性細胞、及/或經改造細胞及/或低免疫原性CAR-T細胞(原代細胞或自經改造及/或低免疫原性幹細胞分化)，及其使用及生成之相關方法，該等方法包括一或多種MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現及CD47之可調控的過表現。本文提供進一步展現減少的T細胞受體表現之細胞。

【英文】

Disclosed herein are engineered cells and/or hypoimmunogenic cells including engineered cells and/or hypoimmunogenic stem cells, engineered cells and/or hypoimmunogenic cells differentiated therefrom, and/or engineered cells and/or hypoimmunogenic CAR-T cells (primary or differentiated from engineered and/or hypoimmunogenic stem cells) and related methods of their use and generation comprising regulatable reduced expression of one or more MHC class I and/or MHC class II human leukocyte antigen molecules and regulatable overexpression of CD47. Provided herein are cells further exhibiting reduced expression of T-cell receptors.

【指定代表圖】圖1A~1N

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於改變低免疫原性細胞中之基因表現之可誘導系統

【英文發明名稱】

INDUCIBLE SYSTEMS FOR ALTERING GENE EXPRESSION IN HYPOIMMUNOGENIC CELLS

【技術領域】

【0001】本發明關於用於改變低免疫原性細胞中之基因表現之可誘導系統。

【先前技術】

【0002】現成之治療細胞可提供優於基於自體細胞之策略之優勢，包括易於製造、品質控制及避免惡性污染及T細胞功能障礙。然而，針對組織不相容細胞之強烈的宿主抗移植物免疫反應阻止同種異體細胞之擴增及持續，並降低此方法之效能。

【0003】在動物模型及人類患者中皆有大量證據表明，低免疫原性細胞移植係治療多種病症、疾患及疾病之科學上可行且臨床上有前途之方式。

【0004】業內仍需要產生基於細胞之療法之新穎方式、組合物及方法以避免由接受者之免疫系統檢測。

【發明內容】

【0005】在一些實施例中，本文提供經改造細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0006】在一些實施例中，本文提供經改造細胞，其包含相對於對照增加CD47之表現之可調控修飾。

【0007】在一些實施例中，經改造細胞選自由以下組成之群：幹細胞、多能幹細胞(PSC)、誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)、造血幹細胞(HSC)、胚胎幹細胞(ESC)、胰島細胞、β胰島細胞、免疫細胞、B細胞、T細胞、自然殺手(NK)細胞、自然殺手T (NKT)細胞、巨噬細胞、免疫特權細胞、視覺細胞、視網膜色素上皮細胞(RPE)、肝細胞、甲狀腺細胞、內皮細胞、皮膚細胞、神經膠質祖細胞、神經細胞、肌肉細胞、心臟細胞及血球。

【0008】在一些實施例中，本文提供經改造胰島細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0009】在一些實施例中，胰島細胞係β胰島細胞。

【0010】在一些實施例中，本文提供經改造內皮細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0011】在一些實施例中，本文提供經改造心肌細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0012】在一些實施例中，本文提供經改造平滑肌細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0013】在一些實施例中，本文提供經改造骨骼肌細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0014】在一些實施例中，本文提供經改造肝細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0015】在一些實施例中，本文提供經改造神經膠質祖細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0016】在一些實施例中，本文提供經改造多巴胺能神經元，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0017】在一些實施例中，本文提供經改造免疫特權細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0018】在一些實施例中，本文提供經改造視網膜色素上皮細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0019】在一些實施例中，本文提供經改造甲狀腺細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0020】在一些實施例中，本文提供經改造免疫細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0021】在一些實施例中，經改造免疫細胞包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之外源多核苷酸。

【0022】在一些實施例中，本文提供經改造T細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0023】在一些實施例中，經改造T細胞包含編碼一

或多種嵌合抗原受體(CAR)之外源多核苷酸。

【0024】在一些實施例中，本文提供經改造NK細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0025】在一些實施例中，經改造T細胞包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之外源多核苷酸。

【0026】在一些實施例中，本文提供經改造巨噬細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【0027】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少約相同量之CD47。

【0028】在一些實施例中，細胞係免疫特權細胞。

【0029】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約10%之量之CD47。

【0030】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之CD47。

【0031】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之CD47。

【0032】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約1000%之量之CD47。

【0033】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍。

【0034】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之CD47水準的至少約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍或約5倍。

【0035】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之CD47水準的至少約4倍、約4.5倍、約5倍或約5.5倍。

【0036】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之CD47水準的至少約4倍。

【0037】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之CD47水準的至少約4.5倍。

【0038】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之CD47水準的至少約5倍。

【0039】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之CD47水準的至少約5.5倍。

【0040】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之CD47水準的至少約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍。

【0041】在一些實施例中，對照係野生型細胞、對照細胞或基線參考。

【0042】在一些實施例中，對照細胞係未經修飾或未經改變之細胞，視情況地其中未經修飾或未經改變之細胞具有與經改造細胞相同之細胞類型。

【0043】在一些實施例中，對照細胞係來自供體之起

始材料或來自供體集合之起始細胞集合。

【0044】在一些實施例中，基線參考係同型對照或背景信號水準。

【0045】在一些實施例中，基線係同型對照，視情況地其中CD47水準係使用基於抗體之分析測定。

【0046】在一些實施例中，CD47水準係使用基於抗體之量化方法、視情況選用之Quantibrite™分析來測定。

【0047】在一些實施例中，經改造細胞係β胰島細胞，其表現至少約200,000個、250,000個、300,000個、350,000個或400,000個CD47分子/細胞。

【0048】在一些實施例中，經改造細胞係視網膜色素上皮細胞，其表現比基線增加至少約2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、12倍、14倍、16倍、18倍、20倍或更高之CD47表現。

【0049】在一些實施例中，經改造細胞係T細胞，其表現至少約180,000個、190,000個、200,000個、210,000個、220,000個、230,000個、240,000個、250,000個、260,000個、270,000個、280,000個、290,000個、300,000個、350,000個、400,000個、450,000個、500,000個、550,000個、600,000個、650,000個或700,000個CD47分子/細胞。

【0050】在一些實施例中，本文提供經改造細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原之表現，及ii)增加一或多種耐受原性因子

之表現的修飾，其中經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現耐受原性因子。

【0051】在一些實施例中，經改造細胞選自由以下組成之群：幹細胞、多能幹細胞(PSC)、誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)、造血幹細胞(HSC)、胚胎幹細胞(ESC)、胰島細胞、β胰島細胞、免疫細胞、B細胞、T細胞、自然殺手(NK)細胞、自然殺手T (NKT)細胞、巨噬細胞、免疫特權細胞、視覺細胞、視網膜色素上皮細胞(RPE)、肝細胞、甲狀腺細胞、內皮細胞、皮膚細胞、神經膠質祖細胞、神經細胞、肌肉細胞、心臟細胞及血球。

【0052】在一些實施例中，對照係野生型細胞、對照細胞或基線參考。

【0053】在一些實施例中，對照細胞係未經修飾或未經改變之細胞，視情況地其中未經修飾或未經改變之細胞具有與經改造細胞相同之細胞類型。

【0054】在一些實施例中，對照細胞係來自供體之起始材料或來自供體集合之起始細胞集合。

【0055】在一些實施例中，基線參考係同型對照或背景信號水準。

【0056】在一些實施例中，基線係同型對照，視情況地其中耐受原性因子之量係使用基於抗體之分析測定。

【0057】在一些實施例中，耐受原性因子之量係使用基於抗體之量化方法、視情況選用之Quantibrite™分析來測定。

【0058】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少約相同量之耐受原性因子。

【0059】在一些實施例中，細胞係免疫特權細胞。

【0060】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約10%之量之耐受原性因子。

【0061】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之耐受原性因子。

【0062】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之耐受原性因子。

【0063】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約1000%之量之耐受原性因子。

【0064】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之耐受原性因子水準的至少約1.1倍。

【0065】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之耐受原性因子水準的至少約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍或約5倍。

【0066】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之耐受原性因子水準的至少約4倍、約4.5倍、約5倍或約5.5倍。

【0067】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之耐受原性因子水準的至少約4倍。

【0068】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之耐

受原性因子水準的至少約4.5倍。

【0069】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之耐受原性因子水準的至少約5倍。

【0070】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之耐受原性因子水準的至少約5.5倍。

【0071】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之耐受原性因子水準的至少約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍。

【0072】在一些實施例中，修飾減少以下之表現：(a) MHC I類分子；(b) MHC II類分子；或(c) MHC I類分子及MHC II類分子。

【0073】在一些實施例中，相對於對照，修飾減少以下中之一或多者之表現：B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B及/或NFY-C。

【0074】在一些實施例中，細胞並不表現MHC I類分子及/或MHC II類分子。

【0075】在一些實施例中，相對於對照，細胞並不表現以下中之一或多者：B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B及/或NFY-C。

【0076】在一些實施例中，修飾包含一或多個選自由

以下組成之群之靶之敲除：B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B及/或NFY-C。

【0077】在一些實施例中，修飾減少一或多個選自由以下組成之群之靶之表現：B2M、TAP1、NLRC5及/或CIITA。

【0078】在一些實施例中，修飾包含一或多個選自由以下組成之群之靶之敲除：B2M、TAP1、NLRC5及/或CIITA。

【0079】在一些實施例中，敲除發生在兩個對偶基因中。

【0080】在一些實施例中，細胞進一步包含一或多種修飾，相對於對照，該等修飾減少CTLA-4、PD-1、IRF1、MIC-A、MIC-B、參與氧化或ER應激之蛋白質、TRAC、TRB、CD142、ABO、CD38、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD之表現。

【0081】在一些實施例中，參與氧化或ER應激之蛋白質選自由以下組成之群：硫氧還蛋白相互作用蛋白(TXNIP)、PKR樣ER激酶(PERK)、肌醇需求酶1α (IRE1α)及DJ-1 (PARK7)。

【0082】在一些實施例中，修飾包含一或多個選自由以下組成之群之靶之敲除：CTLA-4、PD-1、IRF1、MIC-A、MIC-B、參與氧化或ER應激之蛋白質、TRAC、TRB、

CD142、ABO、CD38、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【0083】在一些實施例中，敲除發生在兩個對偶基因中。

【0084】在一些實施例中，修飾減少B2M之表現。

【0085】在一些實施例中，修飾減少CIITA之表現。

【0086】在一些實施例中，修飾減少B2M及CIITA之表現。

【0087】在一些實施例中，修飾包含B2M及/或CIITA之敲除。

【0088】在一些實施例中，B2M及/或CIITA敲除發生在兩個對偶基因中。

【0089】在一些實施例中，修飾減少NK細胞配位體、視情況地MIC-A及/或MIC-B之表現。

【0090】在一些實施例中，修飾包含MIC-A及/或MIC-B之敲除。

【0091】在一些實施例中，MIC-A及/或MIC-B敲除發生在兩個對偶基因中。

【0092】在一些實施例中，細胞進一步包含相對於對照減少一或多種Y染色體基因之表現之修飾。

【0093】在一些實施例中，一或多種Y染色體基因選自由Y連鎖原鈣黏蛋白-11及Y連鎖神經配蛋白-4組成之群。

【0094】在一些實施例中，修飾減少TXNIP之表現。

【0095】在一些實施例中，修飾包含TXNIP之敲除。

【0096】在一些實施例中，TXNIP敲除發生在兩個對偶基因中。

【0097】在一些實施例中，細胞進一步包含減少以下之表現之修飾：B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、CTLA-4、PD-1、IRF1、MIC-A、MIC-B、參與氧化或ER應激之蛋白質、TRAC、TRB、CD142、ABO、CD38、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【0098】在一些實施例中，細胞並不表現B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、CTLA-4、PD-1、IRF1、MIC-A、MIC-B、參與氧化或ER應激之蛋白質、TRAC、TRB、CD142、ABO、CD38、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【0099】在一些實施例中，細胞進一步包含相對於對照減少以下之表現之修飾：B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【0100】在一些實施例中，細胞並不表現B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【0101】在一些實施例中，細胞包含減少一或多種耐受原性因子之表現之其他修飾。

【0102】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子選自由以下組成之群：A20/TNFAIP3、C1抑制劑、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受體、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1及/或Serpinb9。

【0103】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子選自由以下組成之群：A20/TNFAIP3、C1抑制劑、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受體、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1及/或Serpinb9。

【0104】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含CD47。

【0105】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含HLA-E。

【0106】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含CD24。

【0107】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含PD-L1。

【0108】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含CD46。

【0109】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含CD55。

【0110】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含CD59。

【0111】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含CR1。

【0112】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含MANF。

【0113】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含A20/TNFAIP3。

【0114】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含HLA-E及CD47。

【0115】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含CD24、CD47及/或PDL1中之一或多者。

【0116】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含HLA-E、CD24、CD47及/或PDL1中之一或多者。

【0117】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含CD46、CD55、CD59及/或CR1中之一或多者。

【0118】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含HLA-E、CD46、CD55、CD59及/或CR1中之一或多者。

【0119】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59及/

或CR1中之一或多者。

【0120】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含HLA-E及PDL1。

【0121】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含HLA-E、PDL1及/或A20/TNFAIP中之一或多者。

【0122】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含HLA-E、PDL1及/或MANF中之一或多者。

【0123】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子包含HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP及/或MANF中之一或多者。

【0124】在一些實施例中，修飾：(a)減少MHC I類及/或MHC II類分子之表現；(b)減少MIC-A及/或MIC-B之表現；(c)增加CD47、及視情況存在之CD24及PD-L1之表現；及(d)增加CD46、CD55、CD59及CR1之表現。

【0125】在一些實施例中，修飾：(a)減少MHC I類分子之表現；(b)減少MIC-A及/或MIC-B之表現；(c)減少TXNIP之表現；及(d)增加PD-L1及HLA-E之表現。

【0126】在一些實施例中，修飾進一步增加A20/TNFAIP3及MANF之表現。

【0127】在一些實施例中，細胞衍生自人類細胞或動物細胞。

【0128】在一些實施例中，細胞係衍生自幹細胞之分化細胞或其子代。

【0129】在一些實施例中，幹細胞選自由以下組成之

群：多能幹細胞、誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)、造血幹細胞(HSC)及胚胎幹細胞(ESC)。

【0130】在一些實施例中，細胞衍生自原代細胞或其子代。

【0131】在一些實施例中，細胞在投與接受患者後逃避NK細胞介導之細胞毒性。

【0132】在一些實施例中，細胞在投與接受患者後經保護免於成熟NK細胞之細胞溶解。

【0133】在一些實施例中，細胞在投與接受患者後逃避巨噬細胞吞噬。

【0134】在一些實施例中，細胞在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之先天及/或適應性免疫反應。

【0135】在一些實施例中，細胞在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之基於抗體之免疫反應。

【0136】在一些實施例中，一或多種修飾係可調控修飾。

【0137】在一些實施例中，本文提供經改造細胞，其包含一或多種可調控修飾以相對於對照改變經改造細胞中一或多個靶之表現，視情況地其中一或多種可調控修飾相對於對照增加CD47之表現。

【0138】在一些實施例中，一或多種可調控修飾包含相對於對照，i)增加或ii)減少或敲除一或多個靶之表現的基於RNA之條件或可誘導組分。

【0139】在一些實施例中，基於RNA之條件或可誘導

組分選自由以下組成之群：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。

【0140】在一些實施例中，基於RNA之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【0141】在一些實施例中，基於RNA之可誘導組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【0142】在一些實施例中，可調控修飾包含相對於對照，i)增加或ii)減少或敲除一或多個靶之表現的基於DNA之條件或可誘導組分。

【0143】在一些實施例中，基於DNA之條件或可誘導組分選自由以下組成之群：條件或可誘導CRISPR、條件或可誘導TALEN、條件或可誘導鋅指核酸酶、條件或可誘導歸巢核酸內切酶、條件或可誘導先導編輯、條件或可誘導PASTE編輯及條件或可誘導大範圍核酸酶。

【0144】在一些實施例中，基於DNA之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【0145】在一些實施例中，基於DNA之條件組分處於

可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【0146】在一些實施例中，可調控修飾包含相對於對照，i)增加或ii)減少或敲除一或多個靶之表現的基於蛋白質之條件或可誘導組分。

【0147】在一些實施例中，基於蛋白質之條件或可誘導組分係條件或可誘導降解子組分。

【0148】在一些實施例中，條件或可誘導降解子組分選自由以下組成之群：使用SMASH標籤之配位體誘導之降解(LID)、使用Shield-1之LID、使用生長素之LID、使用雷帕黴素之LID、條件或可誘導肽降解子(*例如*基於IKZF3之降解子)及條件或可誘導蛋白水解靶向嵌合體(PROTAC)。

【0149】在一些實施例中，基於蛋白質之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【0150】在一些實施例中，基於蛋白質之組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【0151】在一些實施例中，細胞包含可操作連接至外源多核苷酸之條件啟動子，該外源多核苷酸編碼一或多種

耐受原性因子或CD47。

【0152】在一些實施例中，細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之條件啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼一或多種耐受原性因子或CD47之貨物多核苷酸。

【0153】在一些實施例中，條件啟動子選自由以下組成之群：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【0154】在一些實施例中，細胞包含可操作連接至外源多核苷酸之可誘導啟動子，該外源多核苷酸編碼一或多種耐受原性因子或CD47。

【0155】在一些實施例中，細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之可誘導啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼一或多種耐受原性因子或CD47之貨物多核苷酸。

【0156】在一些實施例中，可誘導啟動子係由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【0157】在一些實施例中，細胞包含與SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或100%序列一致性之CD47多肽。

【0158】在一些實施例中，細胞包含與SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或100%序列一致性之CD47多肽。

【0159】在一些實施例中，細胞進一步包含可調控修飾，其相對於對照增加以下中之一或多者之表現：A20/TNFAIP3、C1抑制劑、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受體、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1及/或Serpinb9。

【0160】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之A20/TNFAIP3、C1抑制劑、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受體、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1及/或Serpinb9。

【0161】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之A20/TNFAIP3、C1抑制劑、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受體、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1及/或Serpinb9。

【0162】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約1000%之量之A20/TNFAIP3、C1抑制劑、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受體、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1及/或Serpinb9。

【0163】在一些實施例中，對照係野生型細胞、對照細胞或基線參考。

【0164】在一些實施例中，對照細胞係未經修飾或未經改變之細胞，視情況地其中未經修飾或未經改變之細胞具有與經改造細胞相同之細胞類型。

【0165】在一些實施例中，對照細胞係來自供體之起始材料或來自供體集合之起始細胞集合。

【0166】在一些實施例中，基線參考係同型對照或背景信號水準。

【0167】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子或CD47由第一外源多核苷酸編碼。

【0168】在一些實施例中，細胞包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之第二外源多核苷酸。

【0169】在一些實施例中，第一及/或第二外源多核苷酸插入細胞之至少一個對偶基因之第一及/或第二特定基因座中。

【0170】在一些實施例中，第一及/或第二特定基因

座選自由以下組成之群：安全港基因座、靶基因座、*RHD*基因座、*B2M*基因座、*CIITA*基因座、*TRAC*基因座及*TRB*基因座。

【0171】在一些實施例中，安全港基因座選自由以下組成之群：*CCR5*基因座、*PPP1R12C*基因座、*Rosa*基因座、*ROSA26*基因座及*CLYBL*基因座。

【0172】在一些實施例中，靶基因座選自由以下組成之群：*CXCR4*基因座、*ALB*基因座、*SHS231*基因座、*F3*(*CD142*)基因座、*MICA*基因座、*MICB*基因座、*LRP1*(*CD91*)基因座、*HMGB1*基因座、*ABO*基因座、*FUT1*基因座及*KDM5D*基因座。

【0173】在一些實施例中，使用慢病毒載體將第一及/或第二外源多核苷酸引入細胞中。

【0174】在一些實施例中，使用選自由以下組成之群之促融劑介導之遞送或轉座酶系統將第一及/或第二外源多核苷酸引入細胞中：條件或可誘導轉座酶、條件或可誘導PiggyBac轉座子、條件或可誘導睡美人(SB11)轉座子、條件或可誘導Mos1轉座子及條件或可誘導Tol2轉座子。

【0175】在一些實施例中，本文提供胰島細胞，其具有減少的MHC I類HLA表現及/或減少的MHC II類HLA表現且相對於對照表現至少高約1000%之量之CD47。

【0176】在一些實施例中，細胞係原代β胰島細胞，其表現對照中表現之CD47水準的至少約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍。

【0177】在一些實施例中，本文提供經改造細胞，其相對於對照表現至少高約10%之量之CD47，或其表現對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍。

【0178】在一些實施例中，本文提供經改造細胞，其相對於對照表現至少高約10%之量之CD47，或其表現對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍。

【0179】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%、約200%、約300%、約400%、約500%、約600%、約700%、約800%、約900%或約1000%之量之CD47。

【0180】在一些實施例中，細胞表現對照中表現之CD47水準的至少約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍或約5倍。

【0181】在一些實施例中，細胞係原代胰島細胞，其相對於對照表現至少高約1000%或至少高約2000%之量之CD47。

【0182】在一些實施例中，對照係野生型細胞、對照細胞或基線參考。

【0183】在一些實施例中，對照細胞係未經修飾或未經改變之細胞，視情況地其中未經修飾或未經改變之細胞具有與經改造細胞相同之細胞類型。

【0184】在一些實施例中，對照細胞係來自供體之起始材料或來自供體集合之起始細胞集合。

【0185】在一些實施例中，基線參考係同型對照或背景信號水準。

【0186】在一些實施例中，CD47水準係使用基於抗體之量化方法、視情況選用之Quantibrite™分析來測定。

【0187】在一些實施例中，本文提供經改造T細胞，其具有減少的MHC I類HLA表現及/或減少的MHC II類HLA表現且相對於對照表現至少高約10%之量之CD47，表現對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍，或表現至少約170,000個CD47分子。

【0188】在一些實施例中，細胞係T細胞，其相對於對照表現至少高約300%或至少高約400%之量之CD47。

【0189】在一些實施例中，細胞係T細胞，其表現對照中表現之CD47水準的至少約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍或約5倍。

【0190】在一些實施例中，本文提供經改造T細胞，其表現至少約170,000個CD47分子。

【0191】在一些實施例中，T細胞表現至少約180,000個CD47分子、至少約190,000個CD47分子、至少約200,000個CD47分子、至少約210,000個CD47分子、至少約220,000個CD47分子、至少約230,000個CD47分子、至少約240,000個CD47分子、至少約250,000個CD47分子、至少約260,000個CD47分子、至少約270,000個CD47分子、至少約280,000個CD47分子、至少約290,000個CD47分子、或至少約300,000個CD47分子。

【0192】在一些實施例中，對照係野生型細胞、對照細胞或基線參考。

【0193】在一些實施例中，對照細胞係未經修飾或未經改變之細胞，視情況地其中未經修飾或未經改變之細胞具有與經改造細胞相同之細胞類型。

【0194】在一些實施例中，對照細胞係來自供體之起始材料或來自供體集合之起始細胞集合。

【0195】在一些實施例中，基線參考係同型對照或背景信號水準。

【0196】在一些實施例中，CD47水準係使用基於抗體之量化方法、視情況選用之Quantibrite™分析來測定。

【0197】在一些實施例中，細胞包含1個、2個、3個、4個或5個拷貝之編碼CD47之外源多核苷酸。

【0198】在一些實施例中，細胞包含可操作連接至編碼CD47之外源多核苷酸之組成型啟動子。

【0199】在一些實施例中，編碼CD47之外源多核苷酸係經由病毒介導之整合遞送至細胞。

【0200】在一些實施例中，病毒介導之整合係慢病毒介導之整合。

【0201】在一些實施例中，編碼CD47之外源多核苷酸經由HDR整合至細胞基因體之位點。

【0202】在一些實施例中，編碼CD47之外源多核苷酸整合至TRAC基因之基因座、TRBC基因之基因座或其組合中。

【0203】在一些實施例中，編碼CD47之外源多核苷酸整合至至少一個TRAC對偶基因、至少一個TRBC對偶基因或其組合中。

【0204】在一些實施例中，編碼CD47之外源多核苷酸整合至至少兩個TRAC對偶基因、至少兩個TRBC對偶基因或其組合中。

【0205】在一些實施例中，細胞包含含有CD47多肽之外源多核苷酸，該CD47多肽與SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少約80%之序列一致性、與SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少約85%之序列一致性、與SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少約90%之序列一致性、與SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少約95%之序列一致性、與SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少約98%之序列一致性、與SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少約99%之序列一致性，或具有SEQ ID NO:129之胺基酸序列。

【0206】在一些實施例中，細胞包含含有CD47多肽之外源多核苷酸，該CD47多肽與SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少約80%之序列一致性、與SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少約85%之序列一致性、與SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少約90%之序列一致性、與SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少約95%之序列一致性、與SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少約98%之序列一致性、與SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少約

99%之序列一致性，或具有SEQ ID NO:130之胺基酸序列。

【0207】在一些實施例中，細胞包含相對於對照減少的一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現。

【0208】在一些實施例中，一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之減少的表現係由編碼MHC I類及/或II類HLA之一或多種基因之組成型修飾引起。

【0209】在一些實施例中，細胞包含選自由MHC I類及MHC II類HLA組成之群之靶之一或多個敲除。

【0210】在一些實施例中，一或多個敲除係組成型敲除。

【0211】在一些實施例中，細胞包含相對於對照減少的一或多個選自由B2M及CIITA組成之群之靶之表現。

【0212】在一些實施例中，B2M及/或CIITA之減少的表現係由B2M基因及/或CIITA基因之組成型修飾引起。

【0213】在一些實施例中，細胞包含選自由B2M及CIITA組成之群之靶之一或多個敲除。

【0214】在一些實施例中，細胞包含B2M之兩個對偶基因及/或CIITA之兩個對偶基因的敲除。

【0215】在一些實施例中，一或多個敲除係組成型敲除。

【0216】在一些實施例中，細胞進一步包含編碼一或多種其他耐受原性因子之外源多核苷酸。

【0217】在一些實施例中，一或多種其他耐受原性因

子選自由以下組成之群：HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、PD-L1、CTLA-4-Ig、CI抑制劑及IL-35。

【0218】在一些實施例中，細胞包含相對於對照減少的B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD之表現。

【0219】在一些實施例中，細胞並不表現B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【0220】在一些實施例中，細胞係多能幹細胞。

【0221】在一些實施例中，多能幹細胞係誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)、造血幹細胞(HSC)或胚胎幹細胞(ESC)。

【0222】在一些實施例中，細胞係衍生自多能幹細胞之分化細胞或其子代。

【0223】在一些實施例中，分化細胞選自由以下組成之群：胰島細胞、T細胞、自然殺手(NK)細胞、CAR-M細胞、內皮細胞、心肌細胞、平滑肌細胞、骨骼肌細胞、肝細胞、神經膠質祖細胞、多巴胺能神經元、視網膜色素上皮細胞及甲狀腺細胞。

【0224】在一些實施例中，細胞係原代細胞或其子代。

【0225】在一些實施例中，原代細胞或其子代係T細胞或NK細胞。

【0226】在一些實施例中，T細胞進一步包含減少的T細胞受體(TCR)-α及/或TCR-β表現。

【0227】在一些實施例中，T細胞並不表現TCR-α及/或TCR-β。

【0228】在一些實施例中，T細胞進一步包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之第二外源多核苷酸。

【0229】在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47表現，且相對於對照減少MHC I類及MHC II類人類白血球抗原中之一或多者之表現。

【0230】在一些實施例中，細胞表現不具或具有低CD47表現之野生型細胞或對照細胞中表現之CD47水準的至少約2倍、約3倍、約4倍或約5倍，及相對於對照細胞減少的MHC I類及MHC II類人類白血球抗原中之一或多者之表現。

【0231】在一些實施例中，細胞表現不具或具有低CD47表現之相同細胞類型之野生型細胞或對照細胞中表現之CD47水準的至少約3倍、約4倍或約5倍。

【0232】在一些實施例中，對照細胞係胰島細胞、T細胞、自然殺手(NK)細胞、CAR-M細胞、內皮細胞、心肌細胞、平滑肌細胞、骨骼肌細胞、肝細胞、神經膠質祖細胞、多巴胺能神經元、視網膜色素上皮細胞或甲狀腺細

胞。

【0233】在一些實施例中，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後逃避NK細胞介導之細胞毒性，在投與接受患者後經保護免於成熟NK細胞之細胞溶解，在投與接受患者後逃避巨噬細胞吞噬，在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之先天及/或適應性免疫反應，及/或在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之基於抗體之免疫反應。

【0234】在一些實施例中，細胞係自體細胞。

【0235】在一些實施例中，細胞係同種異體細胞。

【0236】在一些實施例中，本文提供醫藥組合物，其包含本文所揭示經改造細胞之群體及醫藥學上可接受之添加劑、載劑、稀釋劑或賦形劑。

【0237】在一些實施例中，經改造細胞係β胰島細胞且醫藥組合物群體進一步包含一或多種額外胰島細胞。

【0238】在一些實施例中，本文提供治療將受益於基於細胞之療法之患有疾病或疾患之患者的方法，其包括向患者投與臨床有效量或治療有效量之本文所揭示之經改造細胞。

【0239】在一些實施例中，本文提供治療將受益於基於細胞之療法之患有疾病或疾患之患者的方法，其包括向患者投與包含本文所揭示之經改造細胞之細胞群體。

【0240】在一些實施例中，本文提供治療將受益於基於細胞之療法之患有疾病或疾患之患者的方法，其包括向

患者投與包含本文所揭示之分化細胞之細胞群體。

【0241】在一些實施例中，本文提供治療將受益於基於細胞之療法之患有疾病或疾患之患者的方法，其包括向患者投與本文所揭示之醫藥組合物。

【0242】在一些實施例中，疾病或疾患選自由以下組成之群：癌症、遺傳病症、慢性傳染病、自體免疫病症、神經病症、心臟病症(選自由以下組成之群：兒童心肌病、年齡相關之心肌病、擴張性心肌病、肥厚性心肌病、限制性心肌病、慢性缺血性心肌病、圍產期心肌病、發炎性心肌病、特發性心肌病、其他心肌病、心肌缺血性再灌注損傷、心室功能障礙、心臟衰竭、充血性心臟衰竭、冠狀動脈疾病、終末期心臟病、動脈粥樣硬化、缺血、高血壓、再狹窄、心絞痛、風濕性心臟病、動脈發炎、心血管疾病、心肌梗塞、心肌缺血、心肌梗塞、心臟缺血、心臟損傷、心肌缺血、血管疾病、獲得性心臟病、先天性心臟病、冠狀動脈疾病、傳導系統功能障礙、冠狀動脈功能障礙、肺部高血壓、心律不整、肌肉萎縮症、肌肉質量異常、肌肉變性、心肌炎、感染性心肌炎、藥物或毒素誘發之肌肉異常、過敏性心肌炎、二尖瓣閉鎖不全、自體免疫性心內膜炎、原發性心律不整疾病、心臟通道病、長QT症候群、短QT症候群、布魯格達氏症候群(Brugada syndrome)、兒茶酚胺能多型性心室性心搏過速、傑維爾及朗格-尼爾森症候群(Jervell and Lange-Nielsen syndrome)、心肌梗塞、心臟衰竭、心肌病、先天性心臟

缺陷、心臟瓣膜疾病或功能障礙、心內膜炎、風濕熱、二尖瓣瓣膜脫垂、感染性心內膜炎、肥厚性心肌病、擴張性心肌病、心肌炎、心肥大、二尖瓣閉鎖不全)、神經病症(選自由以下組成之群:阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)、亨廷頓氏病(Huntington's disease)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、佩梅病(Pelizaeus-Merzbacher disease)、其他神經變性疾病或疾患、注意力缺陷過動症(ADHD)、缺血、多發性硬化、創傷性腦損傷、癲癇、僵住症、腦炎、腦膜炎、偏頭痛、中風、短暫性缺血發作、蛛膜下出血、硬腦膜下出血、血腫、硬膜外出血、脊髓損傷、頸椎病、腕隧道症候群、腦或脊髓腫瘤、外周神經病變、格林-巴利症候群(Guillan-Barre syndrome)、神經痛、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)、tau蛋白病變、匹克病(Pick disease)、進行性核上性麻痺、皮質基底核變性、嗜銀顆粒病、伯爾氏麻痺(Bell's palsy)、大腦性麻痺、運動神經元疾病、神經纖維瘤病、腦炎、腦膜炎、妥瑞氏症候群(Tourette's syndrome)、精神分裂症、精神病、抑鬱症及其他神經精神病症)、血管型失智症、阿茲海默氏病、帕金森氏病、亨廷頓氏病、多發性硬化、其他神經變性疾病或疾患、注意力缺陷過動症(ADHD)、妥瑞氏症候群(TS)、精神分裂症、精神病、抑鬱症、其他神經精神病症、HIV-1相關之神經認知病症、創傷性腦損傷、中風、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)、大腦出血、癲癇發作、脊髓損傷、嗜銀顆粒病(AGD)、肌肉萎縮性脊髓側索

硬化症(ALS)、皮質基底核變性(CBD)、與染色體17相關之帕金森氏症(FTDP-17)、多系統萎縮症(MSA)、帕金森氏病/瀰漫性路易體病(diffuse Lewy body disease)(PD/DLBD)或阿茲海默氏病、動脈粥樣硬化、動脈粥樣化形成、動脈血栓形成、靜脈血栓形成、血小板性微血管病、血管滲漏、瀰漫性血管內凝血、糖尿病、胰島素抗性、心血管疾病、血管疾病、外周血管疾病、缺血性疾病、心肌梗塞、充血性心臟衰竭、外周血管阻塞性疾病、中風、再灌注損傷、肢體缺血、神經病變(*例如*外周神經病變或糖尿病性神經病變)、器官衰竭(*例如*肝衰竭、腎衰竭及諸如此類)、糖尿病、類風濕性關節炎、骨質疏鬆症、血管損傷、組織損傷、高血壓、因冠狀動脈疾病所致之心絞痛及心肌梗塞、腎血管性高血壓、因腎動脈狹窄所致之腎衰竭、下肢跛行、短暫性缺血發作或中風、心肌梗塞及肢體缺血、缺血性組織修復、血管及心臟瓣膜形成、人工血管改造、受損血管修復及誘導經改造組織中之血管形成(*例如*在移植之前)、修復或替代需要血管細胞或血管形成之組織，尤其心臟組織、肝組織、胰臟組織、腎組織、肌肉組織、神經組織、骨組織，其可為受損的且特徵在於過量細胞死亡之組織、具有受損風險之組織或人工改造之組織)、冠狀動脈疾病、腦血管疾病、主動脈狹窄、主動脈瘤、外周動脈疾病、動脈粥樣硬化、靜脈曲張、血管病、缺乏冠狀動脈灌注之心臟梗塞區域、傷口不愈合、糖尿病性或非糖尿病性潰瘍或其中需要誘導血管形成、從

而改良用於血管重建手術之假體植入物(*例如*由諸如Dacron及Gortex之合成材料製得之血管)的任何其他疾病或病症，選自由以下組成之群之血管病症：血管損傷、心血管疾病、血管疾病、外周血管疾病、缺血性疾病、心肌梗塞、充血性心臟衰竭、外周血管阻塞性疾病、高血壓、缺血性組織損傷、再灌注損傷、肢體缺血、中風、神經病變(*例如*外周神經病變或糖尿病性神經病變)、器官衰竭(*例如*肝衰竭、腎衰竭及諸如此類)、糖尿病、類風濕性關節炎、骨質疏鬆症、腦血管疾病、高血壓、因冠狀動脈疾病所致之心絞痛及心肌梗塞、腎血管性高血壓、因腎動脈狹窄所致之腎衰竭、下肢跛行、其他血管疾患或疾病，自體免疫性甲狀腺炎、甲狀腺腫、副甲狀腺高能症、副甲狀腺低能症(先天性或自體免疫性)、甲狀腺炎、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、產後甲狀腺炎、亞急性甲狀腺炎、醫源性甲狀腺低能症、格雷氏病(Grave's disease)及甲狀腺眼病、傳染性肝炎(A型、B型及C型)、自體免疫肝炎、原發性膽汁性膽管炎、原發性硬化性膽管炎、非酒精性脂肪肝病、肝硬化、血色素沈著症、高草酸鹽尿症、α-1抗胰蛋白酶缺乏症、肝衰竭、威爾森氏病(Wilson's disease)、肝性腦病、黃疸、急性肝性卟啉症、阿拉吉歐症候群(Alagille syndrome)、膽道閉鎖、佈-加二氏症候群(Budd-Chiari syndrome)、高膽紅素血症、克-納二氏症候群(Crigler-Najjar syndrome)、吉-梅二氏症候群(Gilbert-Meulengracht syndrome)、杜-強二氏症候群(Dubin-Johnson

syndrome)、羅托症候群(Rotor syndrome)、半乳糖血症、1型肝糖儲積症、肝腎症候群、妊娠期肝內膽汁淤積症、進行性家族性肝內膽汁淤積症、雷氏症候群(Reye's syndrome)、溶酶體酸性脂肪酶缺乏症、酒精相關之胰臟炎、膽石性胰臟炎、糖尿病(1型及2型)、糖尿病前期、妊娠性糖尿病、胰臟外分泌性糖尿病、胰臟外分泌不足、急性胰臟炎、慢性胰臟炎、遺傳性胰臟炎、高胰島素血症、胰囊腫、左-艾二氏症候群(Zollinger-Ellison syndrome)、舒-戴二氏症候群(Shwachman-Diamond syndrome)、遺傳性血色素沈著症、地中海性貧血、胰臟鐵沈積、囊性纖維化、胰臟分裂及胰臟切除、黃斑變性或具有受損RPE細胞之患者、年齡相關之黃斑變性(AMD)、早期AMD、中期AMD、晚期AMD、非新生血管性年齡相關之黃斑變性、乾式黃斑變性(乾式年齡相關之黃斑變性)、濕式黃斑變性(濕式年齡相關之黃斑變性)、成人發作型卵黃囊狀黃斑失養症(AVMD)、百斯特卵黃囊狀黃斑失養症(Best vitelliform macular dystrophy)、斯達加特樣黃斑失養症(Stargardt-like macular dystrophy，STGD3)、索斯比眼底失養症(Sorby's fundus dystrophy，SFD)、ABCA4相關之疾病、IB型厄捨病(Senear-Usher)、常染色體隱性卵黃樣變、常染色體顯性玻璃體視網膜脈絡膜病變、幼年型黃斑變性(JMD)、萊伯氏先天性黑矇症(Leber's Congenital Amaurosis)或色素性視網膜炎、視網膜脫落、視網膜撕裂、重度合併免疫缺乏(SCID)、歐門氏症候群(Omenn

syndrome)、軟骨-毛髮發育不全、網狀組織發育不良、偉-爾二氏症候群(Wiskott-Aldrich syndrome)、毛細血管擴張性共濟失調、迪喬治症候群(DiGeorge syndrome)、免疫性骨發育不良、先天性角化不良、慢性黏膜皮膚念珠菌病、血液惡性病、濾泡性淋巴瘤(FL)、骨髓性贅瘤、成熟T/NK贅瘤、組織細胞贅瘤、多發性骨髓瘤(MM)、骨髓發育不良症候群(MDS)、淋巴漿細胞性淋巴瘤(LPL)、瓦登斯特隆巨球蛋白血症(Waldenström macroglobulinemia)、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt lymphoma，BL)、原發性縱膈大B細胞淋巴瘤(PMBL)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、外套細胞淋巴瘤(MCL)、毛細胞白血病(HCL)、骨髓增生性/骨髓發育不良症候群(MDS)、急性淋巴性白血病(ALL)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、B細胞急性淋巴性白血病(B-ALL)、T細胞急性淋巴性白血病(T-ALL)、T細胞淋巴瘤、B細胞淋巴瘤、自體免疫疾病，包括例如狼瘡、全身性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎、牛皮癬、牛皮癬關節炎、多發性硬化、克隆氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、艾迪生病(Addison's disease)、格雷氏病、休格倫氏症候群(Sjögren's syndrome)、橋本氏甲狀腺炎、1型糖尿病、原發性膽汁性肝硬化、自體免疫肝炎、乳糜瀉、癌症，包括(但不限於)B細胞急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤、肝癌、胰臟癌、乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、肺

癌、非小細胞肺癌、急性骨髓性淋巴性白血病、多發性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰臟腺癌、神經膠母細胞瘤、神經母細胞瘤、肺鱗狀細胞癌、肝細胞癌、膀胱癌、全身性紅斑狼瘡(SLE)、1型糖尿病、自體免疫肝病、休格倫氏症候群、類風濕性關節炎、全身性硬化(硬皮症)、器官特異性自體免疫疾病(自體免疫肝炎、原發性硬化性膽管炎)、酒精相關之肝病、多發性硬化、NK細胞缺乏(NKD) (功能性(FNKD)或經典(CNKD))、免疫缺乏-多內分泌病-腸病-X連鎖(IPEX)樣症候群、布魯姆症候群(Bloom syndrome)、范康尼氏貧血(Fanconi's anemia)、先天性角化不良、闕東二氏症候群(Chediak-Higashi syndrome)、家族性嗜血細胞性淋巴組織細胞增多症(FHL)、2型格里切利症候群(Griscelli syndrome type 2)、赫普二氏症候群(Hermansky Pudliak syndrome)、帕-雷二氏症候群(Papillon-Lefevre syndrome)、偉-爾二氏症候群(Wiskott-Aldrich syndrome)、常染色體隱性高IgE症候群、梅-黑二氏異常(May Hegglin anomaly)及I型或III型白血球黏附缺乏症。

【0243】在一些實施例中，分化細胞選自由以下組成之群：間質幹細胞(MSC)、造血幹細胞(HSC)、胰島細胞、β胰島細胞、免疫細胞、B細胞、T細胞、自然殺手(NK)細胞、自然殺手T (NKT)細胞、巨噬細胞、免疫特權細胞、視覺細胞、視網膜色素上皮細胞(RPE)、肝細胞、甲狀腺細胞、內皮細胞、皮膚細胞、神經膠質祖細胞、神經細胞、肌肉細胞、心臟細胞及血球。

【0244】在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑並未在投與細胞群體之前投與患者。

【0245】在一些實施例中，該方法進一步包括向患者投與一或多種免疫阻抑劑。

【0246】在一些實施例中，其中已向患者投與一或多種免疫阻抑劑。

【0247】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係小分子或抗體。

【0248】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑選自由以下組成之群：環孢素、硫唑嘌呤、黴酚酸、麥考酚酸嗎乙酯、皮質類固醇、普賴鬆(prednisone)、胺甲喋呤(methotrexate)、金鹽、柳氮磺吡啶(sulfasalazine)、抗瘧疾藥、佈喹那(brequinar)、來氟米特(leflunomide)、咪唑立賓(mizoribine)、15-去氧精胍菌素(15-deoxyspergualine)、6-巰基嘌呤、環磷醯胺、雷帕黴素、他克莫司(tacrolimus，FK-506)、OKT3、抗胸腺細胞球蛋白、胸腺噴丁(thymopentin，胸腺素-α)及免疫阻抑抗體。

【0249】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑包含環孢素。

【0250】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑包含麥考酚酸嗎乙酯。

【0251】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑包含皮質類固醇。

【0252】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑包含

環磷醯胺。

【0253】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑包含雷帕黴素。

【0254】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑包含他克莫司(FK-506)。

【0255】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑包含抗胸腺細胞球蛋白。

【0256】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係一或多種免疫調節劑。

【0257】在一些實施例中，一或多種免疫調節劑係小分子或抗體。

【0258】在一些實施例中，抗體結合至選自由以下組成之群之受體或配位體中之一或多者：IL-2受體之p75、MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD28、B7、CD40、CD45、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6R、IL-6、IGF、IGFR1、IL-7、IL-8、IL-10、CD11a、CD58及結合至其配位體中之任一者之抗體。

【0259】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係或已在投與經改造細胞之前投與患者。

【0260】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係或已在投與經改造細胞之前至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天投與患者。

【0261】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係或

已在投與經改造細胞之前至少1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間投與患者。

【0262】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係或已在投與經改造細胞之後至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天投與患者。

【0263】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係或已在投與經改造細胞之後至少1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間投與患者。

【0264】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係或已在與第一次投與經改造細胞同一天投與患者。

【0265】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係或已在投與經改造細胞之後投與患者。

【0266】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係或已在投與經改造細胞之第一次及/或第二次投與之後投與患者。

【0267】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係或已在投與經改造細胞之第一次及/或第二次投與之前投與患者。

【0268】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係或已在投與經改造細胞之第一次及/或第二次投與之前至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天投與患者。

【0269】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係或

已在投與經改造細胞之第一次及/或第二次投與之前至少1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間投與患者。

【0270】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係或已在投與經改造細胞之第一次及/或第二次投與之後至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天投與患者。

【0271】在一些實施例中，一或多種免疫阻抑劑係或已在投與經改造細胞之第一次及/或第二次投與之後至少1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間投與患者。

【0272】在一些實施例中，與經投與以減少不包含經改造細胞之修飾之免疫原性細胞之免疫排斥的一或多種免疫阻抑劑之劑量相比，一或多種免疫阻抑劑係以較低劑量投與。

【0273】在一些實施例中，本文提供本文所揭示經改造細胞之群體之用途，其用於治療將受益於基於細胞之療法之接受患者之病症或疾患。

【0274】在一些實施例中，本文提供產生本文所揭示之經改造細胞或包含本文所揭示之經改造細胞之細胞群體的方法，該方法包括：(a)獲得經分離細胞；及(b)使經分離細胞與一或多種試劑及/或組分接觸以修飾經分離細胞中之基因表現，由此產生經改造細胞或包含經改造細胞之細胞群體。

【0275】在一些實施例中，該方法進一步包括測定經改造細胞或細胞群體之CD47表現水準。

【0276】在一些實施例中，該方法進一步包括，若確定經改造細胞或細胞群體以臨限值水準或更高水準表現CD47，則選擇經改造細胞或細胞群體用於生產治療產品。

【0277】在一些實施例中，相對於對照，經改造細胞或細胞群體表現至少約相同量之CD47。

【0278】在一些實施例中，相對於對照，經改造細胞或細胞群體表現至少高約10%之量之CD47。

【0279】在一些實施例中，相對於對照，經改造細胞或細胞群體表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之CD47。

【0280】在一些實施例中，相對於對照，經改造細胞或細胞群體表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之CD47。

【0281】在一些實施例中，相對於對照，經改造細胞或細胞群體表現至少高約1000%之量之CD47。

【0282】在一些實施例中，經改造細胞或細胞群體表現對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍。

【0283】在一些實施例中，經改造細胞或細胞群體表現對照中表現之CD47水準的至少約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍或約5倍。

【0284】在一些實施例中，經改造細胞或細胞群體表

現對照中表現之CD47水準的至少約4倍、約4.5倍、約5倍或約5.5倍。

【0285】在一些實施例中，經改造細胞或細胞群體表現對照中表現之CD47水準的至少約4倍。

【0286】在一些實施例中，經改造細胞或細胞群體表現對照中表現之CD47水準的至少約4.5倍。

【0287】在一些實施例中，經改造細胞或細胞群體表現對照中表現之CD47水準的至少約5倍。

【0288】在一些實施例中，經改造細胞或細胞群體表現對照中表現之CD47水準的至少約5.5倍。

【0289】在一些實施例中，經改造細胞或細胞群體表現對照中表現之CD47水準的至少約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍。

【0290】在一些實施例中，對照係野生型細胞或野生型細胞群體、對照細胞或對照細胞群體、或基線參考。

【0291】在一些實施例中，對照細胞或對照細胞群體包含未經修飾或未經改變之細胞，視情況地其中未經修飾或未經改變之細胞具有與經改造細胞相同之細胞類型。

【0292】在一些實施例中，對照細胞或對照細胞群體係來自供體之起始材料或來自供體集合之起始細胞集合。

【0293】在一些實施例中，基線參考係同型對照或背景信號水準。

【0294】在一些實施例中，經改造細胞係β胰島細胞且細胞群體包含β胰島細胞及其他胰島細胞。

【0295】在一些實施例中，經改造細胞包含相對於對照改變經改造細胞中一或多個靶之表現的可調控修飾。

【0296】在一些實施例中，相對於野生型細胞、野生型細胞群體、對照細胞或對照細胞群體，可調控修飾減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現。

【0297】在一些實施例中，相對於野生型細胞、野生型細胞群體、對照細胞或對照細胞群體，可調控修飾增加一或多種耐受原性因子之表現。

【0298】在一些實施例中，修飾經分離細胞中之基因表現之一或多種試劑包含i)用於改變一或多個靶之表現的基於RNA之條件或可誘導組分，ii)用於改變一或多個靶之表現的基於DNA之條件或可誘導組分，或iii)用於改變一或多個靶之表現的基於蛋白質之條件或可誘導組分。

【0299】在一些實施例中，該方法進一步包括使經分離細胞與外源因子接觸或將經分離細胞暴露於活化條件或可誘導啟動子之條件，由此表現一或多個靶，由此產生經改造細胞。

【0300】在一些實施例中，本文提供產生經改造細胞之方法，該經改造細胞包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加一或多種耐受原性因子之表現的可調控修飾，該方法包括：(a)獲得經分離細胞；(b)將以下引入細胞中：用於MHC I類及/或MHC II類人類白血球分子之可調控減少的表現之基於RNA之條件或可誘導組分、用於MHC I類及/或MHC II類人類白

血球分子之可調控減少的表現之基於DNA之條件或可誘導組分、或用於MHC I類及/或MHC II類人類白血球分子之可調控減少的表現之基於蛋白質之條件或可誘導組分；(c)將細胞暴露於活化條件或可誘導組分之條件或外源因子，由此減少MHC I類及/或MHC II類分子之表現；(d)將包含條件或可誘導啟動子之核酸引入經分離細胞中，該條件或可誘導啟動子可操作連接至編碼一或多種耐受原性因子之外源多核苷酸，用於一或多種耐受原性因子之可調控的增加的表現；及(e)將經改造細胞暴露於活化條件或可誘導啟動子之條件或外源因子，由此表現一或多種外源耐受原性因子，且由此產生經改造細胞。

【0301】在一些實施例中，步驟(a)-(d)係以任一順序實施。

【0302】在一些實施例中，步驟(a)-(d)中之一或多者係同時實施。

【0303】在一些實施例中，步驟(b)及(c)係在步驟(d)及(e)之前實施。

【0304】在一些實施例中，步驟(d)及(e)係在步驟(b)及(c)之前實施。

【0305】在一些實施例中，步驟(c)及(e)係依序實施。

【0306】在一些實施例中，步驟(c)及(e)係同時實施。

【0307】在一些實施例中，本文提供用於鑑別適於用

作治療產品之細胞群體或包含本文所揭示之經改造細胞之細胞群體的方法，該方法包括：(a)獲得經分離細胞；(b)將相對於對照減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現之一或多種修飾引入細胞中；(c)將相對於對照增加CD47之表現之一或多種修飾引入細胞中；(d)量測細胞之CD47表現水準；及(e)選擇相對於對照表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47之細胞群體，且將群體鑑別為適於用作治療產品。

【0308】在一些實施例中，本文提供用於鑑別適於用作治療產品之細胞群體或包含本文所揭示之經改造細胞之細胞群體的方法，該方法包括：(a)獲得經分離細胞；(b)將相對於對照減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現之一或多種修飾引入細胞中；(c)將相對於對照增加CD47之表現之一或多種修飾引入細胞中；(d)量測細胞之CD47表現水準；及(e)選擇表現對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍、約1.5倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約11倍、約12倍、約13倍、約14倍、約15倍、約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍之細胞群體，且將群體鑑別為適於用作治療產品。

【0309】在一些實施例中，步驟(b)係在步驟(c)之前實施。

【0310】在一些實施例中，步驟(c)係在步驟(b)之前實施。

【0311】在一些實施例中，步驟(b)及(c)係同時實施。

【0312】在一些實施例中，本文提供確定細胞群體是否適於用作治療產品之方法，該方法包括：(a)產生包含編碼CD47之第一外源多核苷酸之經改造細胞，視情況地本文所揭示之經改造細胞；(b)量測細胞之CD47表現水準；及(c)若相對於對照，細胞表現高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，則確定細胞群體適於用作治療產品。

【0313】在一些實施例中，本文提供確定細胞群體是否適於用作治療產品之方法，該方法包括：(a)產生包含編碼CD47之第一外源多核苷酸之經改造細胞，視情況地本文所揭示之經改造細胞；(b)量測細胞之CD47表現水準；及(c)若細胞表現對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍、約1.5倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約11倍、約12倍、約13倍、約14倍、約15倍、約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍，則確定細胞群體適於用作治療產品。

【0314】在一些實施例中，對照係野生型細胞、對照細胞或基線參考。

【0315】在一些實施例中，對照細胞係未經修飾或未經改變之細胞，視情況地其中未經修飾或未經改變之細胞具有與經改造細胞相同之細胞類型。

【0316】在一些實施例中，對照細胞係來自供體之起始材料或來自供體集合之起始細胞集合。

【0317】在一些實施例中，基線參考係同型對照或背景信號水準。

【0318】在一些實施例中，CD47水準係使用基於抗體之量化方法、視情況選用之Quantibrite™分析來測定。

【0319】在一些實施例中，本文提供確定免疫逃避低免疫原性細胞所需之CD47表現水準之臨限值的方法，該方法包括：(a)產生包含編碼CD47之第一外源多核苷酸之經改造細胞；(b)基於CD47表現水準分選經改造細胞，以生成具有相似CD47表現水準之細胞之集合；(c)評價由細胞集合誘導之免疫反應；及(d)確定免疫逃避所需之CD47表現水準之臨限值。

【0320】在一些實施例中，CD47水準係使用基於抗體之量化方法、視情況選用之Quantibrite™分析來測定。

【0321】在一些實施例中，該方法之步驟(a)進一步包括改造細胞以包含相對於野生型細胞或對照細胞減少的一或多種Y染色體基因及I類及/或II類主要組織相容性複合物(MHC)人類白血球抗原表現。

【0322】在一些實施例中，使用活體外分析或活體內分析來實施免疫反應之評價。

【0323】在一些實施例中，免疫反應之評價係藉由量測NK細胞介導之細胞毒性、成熟NK細胞之溶解、巨噬細胞吞噬、針對細胞之基於抗體之免疫反應或藉由量測在投與接受患者後之某一時間段後仍存在於接受者中之細胞之百分比來實施。

【0324】在一些實施例中，本文提供用於鑑別適於用作治療產品之細胞群體或包含本文所揭示之經改造細胞之細胞群體的方法，該方法包括：(a)將相對於對照減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現之一或多種修飾引入經分離細胞中，及(b)將相對於對照增加CD47之表現之一或多種修飾引入細胞中。

【0325】在一些實施例中，該方法進一步包括步驟(c)量測細胞之CD47表現水準。

【0326】在一些實施例中，該方法進一步包括步驟(d)選擇相對於對照表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47之細胞群體，且將群體鑑別為適於用作治療產品。

【0327】在一些實施例中，該方法進一步包括步驟(d)選擇表現對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍、約1.5倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約11倍、約12倍、約13倍、約14倍、約15倍、約16倍、約17

倍、約18倍、約19倍或約20倍之細胞群體，且將群體鑑別為適於用作治療產品。

【0328】在一些實施例中，步驟(a)係在步驟(b)之前實施。

【0329】在一些實施例中，步驟(b)係在步驟(a)之前實施。

【0330】在一些實施例中，步驟(a)及(b)係同時實施。

【0331】低免疫原性細胞、產生其之方法及使用其之方法的詳細描述參見於2020年8月13日提出申請之美國臨時申請案第63/065,342號、於2020年12月31日提出申請之美國臨時申請案第63/136,152號、於2021年4月14日提出申請之美國臨時申請案第63/175,030號、於2021年4月14日提出申請之美國臨時申請案第63/175,003號、及於2021年1月11日提出申請之美國臨時申請案(代理人案號18615-30046.00)、於2015年5月9日提出申請之WO2016/183041、於2018年1月14日提出申請之WO2018/132783、於2019年7月17日提出申請之WO2020/018615、於2019年7月17日提出申請之WO2020/018620、於2020年2月16日提出申請之WO2020/168317、於2021年4月27日提出申請之PCT/US2021/029443，該等申請案之揭示內容(包括實例、序列表及圖)之全文皆以引用方式併入本文中。

【圖式簡單說明】

【0332】

[圖1A]、[圖1C]、[圖1E]、[圖1G]、[圖1I]、[圖1K]及[圖1M]繪示量測原代小鼠B2M$^{-/-}$; CD47*tg* β胰島細胞之細胞表面上之CD47水準的流式細胞術數據，該等胰島細胞係自B2M敲除之C57BL/6 (B6)小鼠分離且然後用含有CD47轉基因之慢病毒轉導之β胰島細胞生成。使用B2M$^{-/-}$; CD47*tg* β胰島細胞來評估各種MOI。將CD47水準與同型對照(左側)進行比較。[圖1B]、[圖1D]、[圖1F]、[圖1H]、[圖1J]、[圖1L]及[圖1N]繪示小鼠NK細胞對B2M$^{-/-}$; CD47*tg* β胰島細胞之NK細胞介導之殺傷的數據。

[圖2A-2B]繪示NK細胞及巨噬細胞對B2M$^{-/-}$; CD47*tg* T細胞之NK細胞及巨噬細胞介導之殺傷或缺少其的Xelligence分析之數據。

[圖3A-3L]繪示NK細胞對B2M$^{-/-}$; CD47*tg* T細胞之NK細胞介導之殺傷或缺少其的Xelligence分析之數據。

[圖4A-4C]繪示量測未經修飾之原代RPE細胞之細胞表面上之HLA-I、HLA-II及CD47水準的流式細胞術數據。

[圖5A-5D]繪示量測B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$; CD47*tg*原代RPE細胞之細胞表面上之HLA-I、HLA-II及CD47水準的細胞形態(圖5A)及流式細胞術(圖5B-5D)數據。

[圖6A-6I]繪示量測未經修飾之原代RPE細胞(圖6A-6C)、B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$原代RPE細胞(圖6D-6F)及B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$; CD47*tg*原代RPE細胞(圖6G-6I)之細胞表面上之HLA-I、HLA-II及CD47水準的流式細胞術數據。

[圖7A-7I]繪示NK細胞及巨噬細胞對未經修飾之原代RPE細胞(圖7A-7C)、B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$原代RPE細胞(圖7D-7F)及B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$; CD47*tg*原代RPE細胞(圖7G-7I)之NK細胞及巨噬細胞介導之殺傷或缺少其的Xelligence分析之數據。

【0333】自下文詳細描述將明瞭本揭示案之其他目標、優點及實施例。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0334】本申請案主張於2021年8月11日提出申請之美國臨時申請案第63/232,141號及於2021年10月21日提出申請之美國臨時申請案第63/270,454號的優先權，該等美國臨時申請案中每一者之揭示內容皆以全文併入本文中。

I. 前言

【0335】本文闡述部分地基於WO2018132783及於12/23/2021提出申請之PCT/US21/65157 (該等專利中每一者之全文皆以引用方式併入本文中)中所述之低免疫編輯平台的經改造或經修飾之免疫逃避細胞，包括(但不限於)人類免疫逃避細胞。為克服個體對該等原代及/或幹細胞源性移植物之免疫排斥，本發明者已開發出且在本文中闡述低免疫原性細胞(*例如*低免疫原性多能細胞、衍生自其之分化細胞及原代細胞)，其代表任一可移植細胞類型之

可行來源。該等細胞在投與接受個體後經保護免於適應性及/或先天免疫排斥。有利地，接受個體之免疫系統並不排斥本文所揭示之細胞，無論個體之遺傳構成如何，此乃因其在投與接受個體後經保護免於適應性及先天免疫排斥。在一些實施例中，低免疫原性細胞可調控地缺乏一或多種MHC I類及II類抗原分子及/或T細胞受體之表現。在某些實施例中，低免疫原性細胞可調控地缺乏主要組織相容性複合物(MHC) I及II抗原分子及/或T細胞受體之表現且可調控地過表現一或多種耐受原性因子。在某些實施例中，低免疫原性細胞(例如低免疫原性T細胞)可調控地缺乏一或多種MHC I及II抗原分子及/或T細胞受體之表現，可調控地過表現CD47且可調控地表現CAR。在一些實施例中，低免疫原性細胞可調控地缺乏一或多種MHC I及II抗原分子及/或T細胞受體及/或一或多種Y染色體基因之表現。在某些實施例中，低免疫原性細胞可調控地缺乏一或多種MHC I及II抗原分子及/或T細胞受體及/或一或多種Y染色體基因之表現且可調控地過表現CD47。在某些實施例中，低免疫原性細胞可調控地缺乏一或多種MHC I及II抗原分子及/或T細胞受體及/或RHD之表現且可調控地過表現CD47蛋白。在某些實施例中，低免疫原性細胞可調控地缺乏一或多種MHC I及II抗原分子及/或T細胞受體及/或ABO之表現且可調控地過表現CD47蛋白。在某些實施例中，低免疫原性細胞可調控地缺乏一或多種MHC I及II抗原分子及/或T細胞受體及/或MICA之表現且可調控地過

表現CD47蛋白。在某些實施例中，低免疫原性細胞可調控地缺乏一或多種MHC I及II抗原分子及/或T細胞受體及/或MICB之表現且可調控地過表現CD47蛋白。在某些實施例中，低免疫原性細胞(例如低免疫原性T細胞)可調控地缺乏一或多種MHC I及II抗原分子及/或T細胞受體及/或一或多種Y染色體基因之表現，可調控地過表現CD47且可調控地表現CAR。

【0336】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞並未經歷先天免疫細胞排斥。在一些情況下，低免疫原性細胞對NK細胞介導之溶解不敏感。在一些情況下，低免疫原性細胞對巨噬細胞吞噬不敏感。在一些實施例中，低免疫原性細胞可用作需要極少或不需要免疫阻抑劑移植至接受個體中之通用相容性細胞或組織(*例如*通用供體細胞或組織)的來源。該等低免疫原性細胞在移植後保留細胞特異性特徵及特性，包括例如多能性以及能夠植入及與相應天然細胞之功能相似。

【0337】本文所揭示之技術利用耐受原性因子之可調控表現及人類細胞中MHC I分子、MHC II分子及/或TCR表現之可調控調節(*例如*減少或消除)。在一些實施例中，亦使用利用可調控稀切核酸內切酶(*例如*CRISPR/Cas、TALEN、鋅指核酸酶大範圍核酸酶及歸巢核酸內切酶系統)之可調控基因體編輯技術來減少或消除細胞中參與先天及/或適應性免疫反應之基因之表現(*例如*，藉由缺失參與先天及/或適應性免疫反應之基因之基因體DNA或藉由

將基因體DNA插入該等基因中，使得影響基因表現)。在一些實施例中，使用可調控基因體編輯技術或其他基因調節技術在人類細胞中插入耐受誘導(耐受原性)因子，使細胞及其子代(包括自其製備之任何分化細胞)在植入接受個體中後能夠逃避免疫識別。因此，本文所述之細胞展現影響MHC I分子、MHC II分子及/或TCR表現且逃避接受個體之免疫系統之一或多種基因及因子之可調控的調節的表現。

【0338】已驚人地發現，過表現外源多核苷酸之一些轉基因可能在iPSC及原代細胞分化成例如經改造之低免疫原性分化細胞期間變得沈默。因此，本揭示案提供允許可調控表現外源多核苷酸之細胞系統。亦已發現，在生成分化細胞(例如經改造之低免疫原性分化細胞)之前，無需減少一或多種MHC I分子、MHC II分子及/或TCR之表現。因此，本揭示案亦提供允許可調控敲除或敲低MHC I分子、MHC II分子及/或TCR之細胞系統。

【0339】基因體編輯技術實現期望基因座位點之雙股DNA斷裂。該等受控雙股斷裂促進特定基因座位點之同源重組。此過程集中於使用核酸內切酶靶向核酸分子之特定序列，例如染色體，該等核酸內切酶識別且結合至該等序列並誘導核酸分子中之雙股斷裂。雙股斷裂藉由易錯非同源末端連接(NHEJ)或藉由同源重組(HR)修復。

【0340】除非明確指示相反之情況，否則多個實施例之實踐將採用熟習此項技術者熟知之習用化學、生物化

學、有機化學、分子生物學、微生物學、重組DNA技術、遺傳學、免疫學及細胞生物學方法，該等方法中之許多出於說明目的闡述於下文中。該等技術充分解釋於文獻中。參見例如Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第3版，2001）；Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版，1989)；Maniatis等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)；Ausubel等人，Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons，於2008年7月更新)；Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience；Glover, DNA Cloning: A Practical Approach，第I卷及第II卷(IRL Press, Oxford, 1985)；Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992)；Transcription and Translation (B. Hames及S. Higgins編輯，1984)；Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)；Harlow及Lane，Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) Current Protocols in Immunology Q. E. Coligan、A. M. Kruisbeek、D. H. Margulies、E. M. Shevach及W. Strober編輯，1991)；Annual Review of Immunology；以及諸如Advances in Immunology之期刊中之專著。

II. 定義

【0341】如本揭示案中所述，將採用以下術語，且如下文所指示來定義。

【0342】如本文所用之術語「抗原」係指能夠引起免疫反應之分子。抗原包括(但不限於)細胞、細胞提取物、蛋白質、多肽、肽、多糖、多糖結合物、多糖及其他分子之肽及非肽模擬物、小分子、脂質、糖脂、碳水化合物、病毒及病毒提取物及多細胞生物體，例如寄生蟲及變應原。術語抗原廣泛地包括由宿主免疫系統識別為外源之任一類型之分子。

【0343】術語「自體免疫疾病」或「自體免疫病症」或「發炎性疾病」或「發炎性病症」係指其中個體對其自身組織及/或細胞產生先天及/或適應性免疫反應之任一疾病或病症。自體免疫病症可侵襲個體(*例如*人類)之幾乎每個器官系統，包括(但不限於)神經、胃腸及內分泌系統疾病、以及皮膚及其他結締組織、眼睛、血液及血管。自體免疫疾病之實例包括(但不限於)橋本氏甲狀腺炎、全身性紅斑狼瘡、休格倫氏症候群、格雷氏病、硬皮症、類風濕性關節炎、多發性硬化、重症肌無力及糖尿病。

【0344】如本文所用之術語「癌症」定義為細胞之過度增殖，其獨特性狀(*例如*正常對照損失)導致失調的生長、缺少分化、局部組織侵襲及轉移。關於本發明方法，癌症可為任何癌症，包括以下中之任一者：急性淋巴球癌、急性骨髓性白血病、齒槽橫紋肌肉瘤、膀胱癌、骨

癌、腦癌、乳癌、肛門、肛管或肛門直腸癌、眼癌、肝內膽管癌、關節癌、頸、膽囊或胸膜癌、鼻、鼻腔或中耳癌、口腔癌、陰戶癌、慢性淋巴球性白血病、慢性骨髓性癌、結腸癌、食管癌、子宮頸癌、纖維肉瘤、胃腸類癌腫瘤、霍奇金氏淋巴瘤、下咽癌、腎癌(kidney cancer)、喉癌、白血病、液體腫瘤、肝癌、肺癌、淋巴瘤、惡性間皮瘤、肥胖細胞瘤、黑色素瘤、多發性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金氏淋巴瘤、卵巢癌、胰臟癌、腹膜、網膜及腸系膜癌、咽癌、前列腺癌、直腸癌、腎癌(renal cancer)、皮膚癌、小腸癌、軟組織癌症、實體腫瘤、胃癌、睪丸癌、甲狀腺癌、輸尿管癌及/或尿路膀胱癌。除非另外明確指示，否則如本文所用之術語「腫瘤」係指惡性類型之細胞或組織之異常生長，且不包括良性類型之組織。

【0345】術語「慢性傳染病」係指由傳染原引起之疾病，其中感染持續存在。該疾病可包括肝炎(A型、B型或C型)、疱疹病毒(*例如*VZV、HSV-1、HSV-6、HSV-II、CMV及EBV)及HIV/AIDS。非病毒實例可包括慢性真菌疾病，例如麴菌病(Aspergillosis)、念珠菌病(Candidiasis)、球黴菌病(Coccidioidomycosis)及與隱球菌(Cryptococcus)相關之疾病及組織漿菌病(Histoplasmosis)。慢性細菌性傳染原之非限制性實例可為肺炎披衣菌(Chlamydia pneumoniae)、李斯特單胞菌(Listeria monocytogenes)及結核分枝桿菌(Mycobacterium tuberculosis)。在一些實施例中，病症係人類免疫缺乏病毒(HIV)感染。在一些實施例

中，病症係獲得性免疫缺乏症候群(AIDS)。

【0346】如本文所用之「臨床有效量」係指足以在疾病、病症或疾患之治療及/或管控中提供臨床益處之量。在一些實施例中，臨床有效量係已顯示對疾病、病症或疾患之標準護理產生至少一個改良之臨床終點之量。在一些實施例中，臨床有效量係例如已在臨床試驗中展示足以為治療疾病、病症或疾患提供統計學上顯著且有意義之有效性之量。在一些實施例中，臨床有效量亦係治療有效量。在其他實施例中，臨床有效量不為治療有效量。

【0347】如本文所用之「條件啟動子」在某些細胞條件下或在某些細胞階段下有活性。如本文所用之條件啟動子包括例如細胞特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子、發育特異性啟動子、細胞分化特異性啟動子、分化誘導之啟動子、細胞週期特異性啟動子及細胞時期特異性啟動子。「細胞特異性啟動子」、「組織特異性啟動子」及「譜系特異性啟動子」係使核苷酸序列在特定細胞、組織或譜系類型(例如呼吸細胞、前列腺細胞、胰臟細胞、乳房細胞、腎細胞、腸細胞、神經細胞、骨骼細胞、血管細胞、肝細胞、造血細胞、肌肉細胞、內皮細胞、上皮細胞或心臟細胞)中表現之啟動子。使核苷酸序列在發育或細胞分化之特定階段表現之啟動子通常稱為「發育特異性啟動子」、「細胞分化特異性啟動子」或「分化誘導之啟動子」，且包括例如當細胞自一種細胞類型過渡至另一細胞類型(例如自未分化細胞至分化細胞，

例如自幹細胞至多能祖細胞、自多能祖細胞至譜系定向祖細胞、自譜系定向祖細胞至前體細胞、或自前體細胞至成熟細胞)時活化或失活之啟動子。使核苷酸序列在細胞週期之特定階段期間表現之啟動子通常稱為「細胞週期特異性啟動子」或「細胞時期特異性啟動子」。多種標準條件啟動子將為熟習此項技術者獲知。

【0348】「組成型啟動子」在大多數條件下通常有活性，即促進轉錄。在一些實例中，組成型啟動子能夠在刺激物(*例如*熱休克、化學品等)不存在下引導可操作連接之核酸序列之轉錄。在一些實例中，組成型啟動子在大多數細胞類型中在大多數時間下有活性。多種標準條件啟動子將為熟習此項技術者獲知。本文包括組成型啟動子作為一種類型之「可調控啟動子」。

【0349】在一些實施例中，本文所述之改變或修飾(包括例如遺傳改變或修飾)可減少靶或所選多核苷酸序列之表現。在一些實施例中，本文所述之改變或修飾可減少靶或所選多肽序列之表現。在一些實施例中，本文所述之改變或修飾可增加靶或所選多核苷酸序列之表現。在一些實施例中，本文所述之改變或修飾可增加靶或所選多肽序列之表現。術語「減少(decrease)」、「減少的(reduced)」、「減少(reduction)」及「減少(decrease)」在本文中皆通常用於指減少統計學上顯著之量。然而，為避免疑問，「減少(decrease)」、「減少的(reduced)」、「減少(reduction)」、「減少(decrease)」意指與參考水準

相比減少至少10%，例如與參考水準相比減少至少約20%、或至少約30%、或至少約40%、或至少約50%、或至少約60%、或至少約70%、或至少約80%、或至少約90%、或高達且包括減少100%(*即*與參考樣品相比不存在水準)或10%-100%之間的任何減少。在一些實施例中，細胞經改造以具有相對於未經改變或未經修飾之野生型細胞減少的一或多個靶表現。

【0350】在其他或替代實施例中，本揭示案涵蓋以熟習此項技術者可獲得之任一方式(例如利用TALEN系統或RNA引導之轉座酶)改變靶多核苷酸序列。應理解，儘管本文詳細闡述利用CRISPR/Cas (*例如*Cas9及Cas12a)及TALEN之方法之實例，但本揭示案並不限於使用該等方法/系統。本文可利用熟習此項技術者已知之其他靶向方法(例如B2M)來減少或除去靶細胞中之表現。

【0351】如本文所用之「降解子元件」係指蛋白質之調控蛋白質降解之次單元。在一些情況下，降解子包含胺基酸序列，其提供引導多肽進行細胞降解之細胞降解信號。降解子可促進所連接多肽經由蛋白酶體或自噬-溶酶體路徑降解。在融合蛋白中，降解子必須可操作連接至所關注多肽，但無需與其連續，只要降解子仍發揮引導所關注多肽降解之功能即可。較佳地，降解子誘導所關注多肽之快速降解。關於降解子及其在蛋白質降解中之功能之論述參見例如Kanemaki等人(2013) Pflugers Arch. 465(3):419-425；Erales等人(2014) Biochim Biophys Acta

1843(1):216-221；Schrader等人(2009) Nat. Chem. Biol. 5(11):815-822；Ravid等人(2008) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9(9):679-690；Tasaki等人(2007) Trends Biochem Sci. 32(11):520-528；Meinnel等人(2006) Biol. Chem. 387(7):839-851；Kim等人(2013) Autophagy 9(7):1100-1103；Varshaysky (2012) Methods Mol. Biol. 832:1-11；及Fayadat等人(2003) Mol Biol Cell. 14(3):1268-1278；該等內容之全文皆以引用方式併入本文中。

【0352】在一些實施例中，所述之經改造及低免疫原性細胞衍生自iPSC或其子代。如本文所用之術語「衍生自iPSC或其子代」涵蓋生成之初始iPSC及其任一後續子代。如本文所用之術語「子代」涵蓋例如第一代子代，*即*子代藉由例如傳統繁殖方法直接自初始iPSC衍生而來、自其獲得、可自其獲得或可自其衍生而來。術語「子代」亦涵蓋其他代，例如第二代、第三代、第四代、第五代、第六代、第七代或更多代，*即*藉由例如傳統繁殖方法自前一代衍生而來、自其獲得、可自其獲得或可自其衍生而來之細胞代。術語「子代」亦涵蓋由初始iPSC或其子代之修飾或改變產生之經修飾細胞。

【0353】術語「供體個體」係指動物，例如可獲得細胞之人類。如本文可互換使用之「非人類動物」及「非人類哺乳動物」包括哺乳動物，例如大鼠、小鼠、兔、綿羊、貓、狗、牛、豬及非人類靈長類動物。術語「供體個體」亦涵蓋任一脊椎動物，包括(但不限於)哺乳動物、爬

行動物、兩棲動物及魚。然而，有利地，供體個體係哺乳動物，例如人類，或其他哺乳動物，例如家養哺乳動物，例如狗、貓、馬及諸如此類，或生產哺乳動物，例如牛、綿羊、豬及諸如此類。「供體個體」亦可指一種以上之供體，例如一或多種人類或非人類動物或非人類哺乳動物。

【0354】術語「內源」係指天然存在於細胞中之所提及分子或多肽。類似地，該術語在用於提及編碼核酸之表現時係指天然含於細胞內且非外源引入之編碼核酸之表現。類似地，該術語在用於提及啟動子序列時係指天然含於細胞內且非外源引入之啟動子序列。

【0355】如本文所用之術語「經改造細胞」係指至少以某種方式藉由人類干預改變之細胞，包括例如藉由遺傳改變或修飾，使得經改造細胞不同於野生型細胞。

【0356】如本文所用之術語「外源」在所表現之多核苷酸或多肽之上下文中欲指，將所提及分子或所提及多肽引入所關注細胞中。多肽可例如藉由將編碼核酸引入細胞之遺傳材料中(例如藉由整合至染色體中)或作為非染色體遺傳材料(例如質體或表現載體)來引入。因此，該術語在用於提及編碼核酸之表現時係指將可表現形式之編碼核酸引入細胞中。

【0357】「外源」分子係通常不存在於細胞中、但可藉由一或多種遺傳、生物化學或其他方法引入細胞中之分子、構築體、因子及諸如此類。「通常存在於細胞中」係針對細胞之特定發育階段及環境條件來確定。因此，例

如，僅存在於神經元之胚胎發育期間之分子對於成年神經元細胞而言係外源分子。外源分子可包含例如功能異常內源分子之功能形式或功能正常內源分子之功能異常形式。

【0358】外源分子或因子可尤其係例如藉由組合化學製程生成之小分子，或大分子，例如蛋白質、核酸、碳水化合物、脂質、糖蛋白、脂蛋白、多糖、上述分子之任何經修飾衍生物、或包含一或多種上述分子之任何複合物。核酸包括DNA及RNA，可為單股或雙股；可為直鏈、具支鏈或環狀；且可具有任一長度。核酸包括能夠形成雙鏈體之彼等核酸以及三鏈體形成核酸。參見例如美國專利第5,176,996號及美國專利第5,422,251號。蛋白質包括(但不限於) DNA結合蛋白、轉錄因子、染色質重塑因子、甲基化DNA結合蛋白、聚合酶、甲基酶、去甲基酶、乙醯酶、去乙醯酶、激酶、磷酸酶、整合酶、重組酶、連接酶、拓撲異構酶、迴旋酶及解旋酶。

【0359】外源分子或構築體可為與內源分子相同類型之分子，例如外源蛋白質或核酸。在該等情況下，外源分子係以高於細胞中內源分子濃度之濃度引入細胞中。在一些情況下，外源核酸可包含感染病毒基因體、引入細胞中之質體或游離基因體、或通常不存在於細胞中之染色體。將外源分子引入細胞中之方法為熟習此項技術者已知且包括(但不限於)脂質介導之轉移(*即*脂質體，包括中性及陽離子脂質)、電穿孔、直接注射、細胞融合、粒子轟擊、磷酸鈣共沈澱、DEAE-葡聚糖介導之轉移及病毒載體介導之

轉移。

【0360】如本文所用之「融合體」包括基因療法載體，其包含用經改造促融劑假型化之反轉錄病毒載體，該經改造促融劑包含經修飾以包括靶向部分之G蛋白及經盲化以不再識別其同族受體之F蛋白。在一些實施例中，促融劑蛋白質複合物來自副黏液病毒(paraymyxovirus)，視情況地其中副黏液病毒係立百病毒(Nipah virus)。在一些實施例中，反轉錄病毒載體係慢病毒載體。

【0361】出於本揭示案之目的，「基因」包括編碼基因產物之DNA區域以及調控基因產物產生之所有DNA區域，無論該等調控序列係鄰近編碼序列及/或轉錄序列。因此，基因包括(但不必限於)啟動子序列、終止子、轉譯調控序列(例如核糖體結合位點及內部核糖體進入位點)、增強子、沈默子、絕緣子、邊界元件、複製起點、基質附著位點及/或基因座控制區域。

【0362】「基因表現」係指基因中所含之資訊轉化成基因產物。基因產物可為基因(*例如*mRNA、tRNA、rRNA、反義RNA、核酶、結構RNA或任何其他類型之RNA)之直接轉錄產物或藉由mRNA轉譯產生之蛋白質。基因產物亦包括藉由諸如封端、多腺苷酸化、甲基化及編輯之過程修飾之RNA，及藉由例如甲基化、乙醯化、磷酸化、泛素化、ADP核糖基化、肉豆蔻醯化及/或糖基化修飾之蛋白質。

【0363】如本文所用之術語「遺傳修飾」及其語法等

效形式可指核酸(例如生物體之基因體內之核酸)之一或多種改變。舉例而言，遺傳修飾可指改變、添加及/或缺失基因或基因之部分或其他核酸序列。經遺傳修飾之細胞亦可指添加、缺失及/或改變基因或基因之一部分的細胞。經遺傳修飾之細胞亦可指添加不為基因或基因部分之核酸序列之細胞。遺傳修飾包括例如短暫性敲入或敲低機制及可永久敲入、敲低或敲除靶基因或基因之部分或核酸序列之機制。遺傳修飾包括例如短暫性敲入及可永久敲入核酸序列之機制。遺傳修飾亦包括例如減少或增加轉錄、降低或增加mRNA穩定性、減少或增加轉譯、及降低或增加蛋白質穩定性。

【0364】如本文所用之術語「移植(grafting)」、「投與」、「引入」、「植入」及「移植(transplanting)」以及其語法變化形式在藉由方法或途徑將細胞(*例如*本文所述之細胞)置於個體中之上下文中可互換使用，該方法或途徑可將所引入細胞定位或至少部分定位於期望位點或全身性引入(*例如*引入至循環中)。細胞可直接植入期望位點，或替代地藉由可遞送至個體中之期望位置之任一適當途徑投與，其中所植入細胞或細胞組分之至少一部分保持為活的。投與個體後細胞活力之時段可短至幾小時(例如24小時)、短至幾天、長達幾年。在一些實施例中，亦可將細胞投與(*例如*注射)除期望位點外之位置，例如腦中或皮下，例如在膠囊中，以將所植入細胞維持在植入位置且避免所植入細胞遷移。

【0365】「HLA」或「人類白血球抗原」或「HLA分子」或「人類白血球抗原分子」複合物係編碼人類MHC蛋白之基因複合物。構成HLA複合物之該等細胞表面蛋白負責調控針對抗原之免疫反應。在人類中，存在兩種MHC，I類分子及II類分子，「HLA-I」及「HLA-II」或「HLA-I分子」及「HLA-II分子」。HLA-I包括三種蛋白質，HLA-A、HLA-B及HLA-C，其呈遞來自細胞內部之肽，且由HLA-I複合物呈遞之抗原吸引殺手T細胞(亦稱為CD8+ T細胞或細胞毒性T細胞)。HLA-I蛋白與β-2微球蛋白(B2M)相關。HLA-II包括五種蛋白質，HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOB、HLA-DQ及HLA-DR，其將細胞外部之抗原呈遞至T淋巴球。此會刺激CD4+細胞(亦稱為T輔助細胞)。應理解，使用「MHC」或「HLA」不欲具有限制性，此乃因其取決於基因係來自人類(HLA)抑或鼠類(MHC)。因此，當其與哺乳動物細胞相關時，該等術語在本文中可互換使用。

【0366】如本文用於表徵細胞之術語「免疫特權」及「低免疫原性」可互換使用且通常意指，該細胞不太傾向於被移植有該等細胞之個體先天或適應性免疫排斥，例如，細胞不太傾向於被移植有該等細胞之個體同種排斥。舉例而言，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，移植有該等細胞之個體對該低免疫原性細胞之先天或適應性免疫排斥的傾向可能小於約2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、

97.5%、99%或更小。在一些實施例中，基因體編輯技術用於調節一或多種MHC I及MHC II基因之表現，且因此有助於生成低免疫原性細胞。在一些實施例中，低免疫原性細胞逃避MHC錯配之同種異體接受者之免疫排斥。在某種情況下，自本文所概述之低免疫原性幹細胞產生之分化細胞在投與(*例如*移植(transplanted或grafted)) MHC錯配之同種異體接受者時逃避免疫排斥。在一些實施例中，低免疫原性細胞經保護免於T細胞介導之適應性免疫排斥及/或先天免疫細胞排斥。低免疫原性細胞、產生其之方法及使用其之方法的詳細描述參見於2015年5月9日提出申請之WO2016183041；於2018年1月14日提出申請之WO2018132783；於2018年3月20日提出申請之WO2018176390；於2019年7月17日提出申請之WO2020018615；於2019年7月17日提出申請之WO2020018620；於2020年7月31日提出申請之PCT/US2020/44635；於2020年7月31日提出申請之WO2021022223；於2020年8月24日提出申請之WO2021041316；於2021年4月27日提出申請之WO2021222285；及於2021年4月27日提出申請之WO2021222285，該等揭示內容(包括實例、序列表及圖)之全文皆以引用方式併入本文中。

【0367】細胞之低免疫原性可藉由評估細胞之免疫原性(例如細胞引發適應性及先天免疫反應或避免發該等適應性及先天免疫反應的能力)來確定。該免疫反應可使用

熟習此項技術者所意識到之分析來量測。在一些實施例中，先天及/或適應性免疫反應分析量測低免疫原性細胞對T細胞增殖、T細胞活化、T細胞殺傷、供體特異性抗體生成、NK細胞增殖、NK細胞活化及巨噬細胞活性之效應。在一些情形下，低免疫原性細胞及其衍生物在投與個體後經受減輕的T細胞及/或NK細胞殺傷。在一些情況下，與未經修飾之細胞或野生型細胞相比，細胞及其衍生物顯示減少的巨噬細胞吞噬。在一些實施例中，與相應未經修飾之野生型細胞相比，低免疫原性細胞在接受個體中引發降低或減弱的免疫反應。在一些實施例中，低免疫原性細胞係非免疫原性的或無法在接受個體中引發先天及/或適應性免疫反應。

【0368】術語「一致性」%在兩條或更多條核酸或多肽序列之上下文中係指在比較及比對最大對應性時，兩條或更多條序列或子序列具有指定百分比之相同核苷酸或胺基酸殘基，如使用下文所述序列比較算法中之一者(*例如*熟習此項技術者可獲得之BLASTP及BLASTN或其他算法)或藉由目視檢查所量測。端視應用，「一致性」%可存在於所比較之序列區域內(例如功能結構域內)，或替代地存在於欲比較之兩條序列之全長內。就序列比較而言，一條序列通常用作與測試序列進行比較之參考序列。當使用序列比較算法時，將測試序列及參考序列輸入電腦中，必要時指定子序列座標，並指定序列算法程式參數。然後，序列比較算法基於所指定之程式參數計算測試序列相對於參

考序列之序列一致性%。

【0369】可藉由例如以下方法實施序列之最佳比對以供比較：Smith及Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)之局部同源性算法；Needleman及Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)之同源性比對算法；Pearson及Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)之相似性方法之探索；該等算法之電腦化實施方案(Wisconsin Genetics軟體包中之GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA，Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)或目視檢查(通常參見Ausubel等人，見上文)。

【0370】適於測定序列一致性及序列相似性%之算法之一個實例係BLAST算法，其闡述於Altschul等人，J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)中。用於實施BLAST分析之軟體可經由國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information)公開獲得。

【0371】如本文所用之「免疫信號傳導因子」係指在一些情形下活化免疫信號傳導路徑之分子、蛋白質、肽及諸如此類。

【0372】如本文所用之「免疫阻抑因子」或「免疫調控因子」或「耐受原性因子」包括調節或影響細胞在投與、移植或植入後由宿主或接受個體之免疫系統識別之能力的低免疫性因子、補體抑制劑及其他因子。該等因子可與其他遺傳修飾組合。

【0373】術語「增加的」、「增加」或「增強」或

「活化」皆用於本文中且通常意指增加統計學上顯著之量；為避免任何疑問，術語「增加的」、「增加」或「增強」或「活化」意指與參考水準相比增加至少10%，例如與參考水準相比增加至少約20%、或至少約30%、或至少約40%、或至少約50%、或至少約60%、或至少約70%、或至少約80%、或至少約90%、或高達且包括增加100%、或10%-100%之間的任何增加，或與參考水準相比增加至少約2倍、或至少約3倍、或至少約4倍、或至少約5倍或至少約10倍、或2倍與10倍之間的任何增加或更大。在一些實施例中，參考水準(亦稱為基礎水準)係0。

【0374】在一些實施例中，改變係插入缺失。如本文所用之「插入缺失」係指由插入、缺失或其組合引起之突變。如熟習此項技術者應瞭解，除非插入缺失之長度係3之倍數，否則基因體序列編碼區中之插入缺失將引起框移突變。在一些實施例中，改變係點突變。如本文所用之「點突變」係指替代一個核苷酸之取代。可使用本揭示案之基因編輯(*例如*CRISPR/Cas)系統在靶多核苷酸序列中誘導任一長度之插入缺失或點突變。

【0375】「可誘導啟動子」僅在某些條件下有活性，例如(但不限於)在給定分子因子(*例如*劑、生物分子、化學品、配位體或諸如此類)或給定環境條件(*例如*特定CO_2濃度、營養素水準、光、熱)存在下。在該條件不存在下，可誘導啟動子通常不允許顯著或可量測水準之轉錄活性。舉例而言，可誘導啟動子可根據溫度、pH、激素、代謝物

(*例如*乳糖、甘露醇、胺基酸)、光(*例如*特定波長)、滲透電位(*例如*鹽誘導)、重金屬或抗生素來誘導。多種標準可誘導啟動子將為熟習此項技術者獲知。本文包括可誘導啟動子作為一種類型之「可調控啟動子」。

【0376】在一些情形下，可誘導基因表現系統可在配位體、小分子、肽、因子、劑及諸如此類存在下打開或關閉轉錄。在一些情形下，可誘導基因表現系統可因應配位體、小分子、肽、因子、劑及諸如此類之存在來活化蛋白質降解路徑。

【0377】如本文所用之「敲低」係指減少靶mRNA或相應靶蛋白之表現。敲低通常係相對於在投與或表現非對照分子後存在之水準來報告，該非對照分子並不調介RNA(*例如*非靶向對照shRNA、siRNA或miRNA)表現水準之降低。在一些實施例中，靶基因之敲低係藉助條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA、或條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)來達成。在一些實施例中，靶基因之敲低係藉助基於蛋白質之組分(例如條件或可誘導降解子方法)來達成。在一些實施例中，靶基因之敲低係藉由遺傳修飾(包括shRNA、siRNA、miRNA)或使用基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)來達成。

【0378】敲低通常係藉由使用定量聚合酶鏈反應(qPCR)擴增量測mRNA水準或藉由西方墨點(western blot)或酶聯免疫吸附分析(ELISA)量測蛋白質水準來評價。分析蛋白質水準提供mRNA裂解以及轉譯抑制之細胞評價。

用於量測敲低之其他技術包括RNA溶液雜交、核酸酶保護、北方雜交(northern hybridization)、使用微陣列進行基因表現監測、抗體結合、放射免疫分析及螢光活化細胞分析。熟習此項技術者將容易地瞭解，基於本文所述之細節使用本揭示案之基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)敲除靶多核苷酸序列或其一部分的方法。

【0379】「敲入(knock in)」或「敲入(knock-in)」在本文中意指由將DNA序列插入宿主細胞之染色體基因座中產生之遺傳修飾。此使得敲入基因、基因之一部分或核酸序列插入之產物之表現起始或水準增加，例如RNA轉錄物水準及/或經編碼蛋白質水準增加。如熟習此項技術者將瞭解，此可以若干方式完成，包括將一或多個額外拷貝之基因或其一部分插入或添加至宿主細胞中，或改變增加蛋白質表現之內源基因之調控組分，或插入期望表現之特定核酸序列。此可藉由修飾啟動子、添加不同啟動子、添加增強子、添加其他調控元件或修飾其他基因表現序列來完成。

【0380】如本文所用之「敲除(knock out)」或「敲除(knock-out)」包括以干擾靶多核苷酸序列之轉譯或功能之方式缺失靶多核苷酸序列之全部或一部分。舉例而言，敲除可藉由在靶多核苷酸序列中(包括在靶多核苷酸序列之功能結構域(*例如*DNA結合結構域)中)誘導插入或缺失(「插入缺失」)改變靶多核苷酸序列來達成。熟習此項技術者將容易地瞭解，基於本文所述之細節使用本揭示案之

基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)敲除靶多核苷酸序列或其一部分的方法。

【0381】在一些實施例中，遺傳修飾或改變可敲除或敲低靶多核苷酸序列或其一部分。使用本揭示案之基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)敲除靶多核苷酸序列或其一部分可用於多種應用。舉例而言，敲除細胞中之靶多核苷酸序列可出於研究目的在活體外實施。出於離體目的，敲除細胞中之靶多核苷酸序列可用於治療或預防與靶多核苷酸序列之表現相關之病症(*例如*，藉由敲除離體細胞中之突變體對偶基因並將包含敲除突變體對偶基因之彼等細胞引入個體中)或用於改變細胞之基因型或表型。

【0382】基因表現之「調節」係指改變基因之表現水準。表現之調節可包括(但不限於)基因活化及基因抑制。調節亦可為完全的，即其中基因表現完全失活或活化至野生型水準或以上；或其可為部分的，其中基因表現部分減少、或部分活化至野生型水準之某一分數。如本文所用之術語「修飾基因表現」係指將本文所揭示之任一修飾引入細胞中來製造本文所揭示之經改造細胞。

【0383】在其他或替代態樣中，本揭示案涵蓋以熟習此項技術者可獲得之任一方式改變靶多核苷酸序列，例如，利用核酸酶系統，例如TAL效應核酸酶(TALEN)或鋅指核酸酶(ZFN)系統。應理解，儘管本文詳細闡述利用CRISPR/Cas (*例如*Cas9及Cas12a)及TALEN之方法之實例，但本揭示案並不限於使用該等方法/系統。本文可利

用熟習此項技術者已知之其他靶向方法來減少或除去靶細胞中之表現。本文所提供之方法可用於改變細胞中之靶多核苷酸序列。本揭示案涵蓋出於任一目的改變細胞中之靶多核苷酸序列。在一些實施例中，改變細胞中之靶多核苷酸序列以產生突變體細胞。如本文所用之「突變體細胞」係指所得基因型不同於其原始基因型之細胞。在一些情況下，「突變體細胞」展現突變體表型，例如在使用本揭示案之基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas系統)改變功能正常之基因時。在其他情況下，「突變體細胞」展現野生型表型，例如在使用本揭示案之基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas系統)校正突變體基因型時。在一些實施例中，改變細胞中之靶多核苷酸序列以校正或修復遺傳突變(*例如*，以恢復細胞之正常表型)。在一些實施例中，改變細胞中之靶多核苷酸序列以誘導遺傳突變(*例如*，以破壞基因或基因體元件之功能)。

【0384】如本文所用之術語「天然細胞」係指原本未經修飾(例如改造)之細胞。在一些實施例中，天然細胞係天然野生型或對照細胞。

【0385】術語「可操作連接(operatively linked)」或「可操作連接(operably linked)」可互換使用且係指兩種或更多種組分(例如序列元件)之並置，其中各組分經排列使得各組分發揮正常功能且允許至少一種組分可調介對至少一種其他組分發揮之功能的可能性。藉助說明，若轉錄調控序列因應一或多種轉錄調控因子之存在或不存在來控制

編碼序列之轉錄水準，則轉錄調控序列(例如啟動子)可操作連接至編碼序列。轉錄調控序列通常與編碼序列順式可操作連接，但無需與其直接鄰近。舉例而言，增強子係可操作連接至編碼序列之轉錄調控序列，即使其並非連續的。

【0386】如本文所用之「多能幹細胞」具有分化成三種胚層中之任一者之潛能：內胚層(*例如*胃黏膜、胃腸道、肺等)、中胚層(*例如*肌肉、骨、血液、泌尿生殖組織等)或外胚層(*例如*表皮組織及神經系統組織)。如本文所用之術語「多能幹細胞」亦涵蓋「誘導性多能幹細胞」或「iPSC」或衍生自非多能細胞之一種類型之多能幹細胞。在一些實施例中，多能幹細胞係自不為多能細胞之細胞產生或生成。換言之，多能幹細胞可為非多能細胞之直接或間接子代。母體細胞之實例包括已藉由多種方法再程式化以誘導多能未分化表型之體細胞。該等「iPS」或「iPSC」細胞可藉由誘導某些調控基因之表現或藉由外源施加某些蛋白質來產生。用於誘導iPS細胞之方法為此項技術中已知且進一步闡述於下文中。(參見例如Zhou等人，Stem Cells 27 (11): 2667-74 (2009)；Huangfu等人，Nature Biotechnol. 26 (7): 795 (2008)；Woltjen等人，Nature 458 (7239): 766-770 (2009)；及Zhou等人，Cell Stem Cells 8:381-384 (2009)；該等文獻中之每一者之全文皆以引用方式併入本文中)。誘導性多能幹細胞(iPSC)之生成概述於下文中。如本文所用之「hiPSC」係人類誘導性

多能幹細胞。在一些實施例中，如本文所用之「多能幹細胞」亦涵蓋間質幹細胞(MSC)、造血幹細胞(HSC)及/或胚胎幹細胞(ESC)。

【0387】如本文所用之「啟動子」、「啟動子序列」或「啟動子區域」係指能夠結合RNA聚合酶且參與起始下游編碼或非編碼序列之轉錄之DNA調控區域/序列。在一些實例中，啟動子序列包括轉錄起始位點且向上游延伸以包括以高於背景之可偵測水準起始轉錄所需之最小數量之鹼基或元件。在一些實施例中，啟動子序列包括轉錄起始位點以及負責結合RNA聚合酶之蛋白質結合結構域。真核啟動子通常將但不始終含有「TATA」盒及「CAT」盒。

【0388】在一些實施例中，所述之經改造及低免疫原性細胞係自原代T細胞或其子代繁殖而來。如本文所用之術語「自原代T細胞或其子代繁殖而來」涵蓋自供體個體分離之初始原代T細胞及其任一後續子代。如本文所用之術語「子代」涵蓋例如第一代子代，*即*子代藉由例如傳統繁殖方法直接自初始原代T細胞衍生而來、自其獲得、可自其獲得或可自其衍生而來。術語「子代」亦涵蓋其他代，例如第二代、第三代、第四代、第五代、第六代、第七代或更多代，*即*藉由例如傳統繁殖方法自前一代衍生而來、自其獲得、可自其獲得或可自其衍生而來之細胞代。術語「子代」亦涵蓋由初始原代T細胞或其子代之修飾或改變產生之經修飾細胞。

【0389】術語「接受患者」係指使用如本文所述之細

胞向其提供治療(包括預防性治療)之動物，例如人類。對於特異性針對特定動物(例如人類患者)之彼等感染、疾患或疾病狀態之治療，術語患者係指該特定動物。術語「接受患者」亦涵蓋任何脊椎動物，包括(但不限於)哺乳動物、爬行動物、兩棲動物及魚。然而，有利地，接受患者係哺乳動物，例如人類，或其他哺乳動物，例如家養哺乳動物，例如狗、貓、馬及諸如此類，或生產哺乳動物，例如牛、綿羊、豬及諸如此類。在一些實施例中，接受患者患有感染、疾患、疾病或病症。在一些實施例中，接受患者疑似患有感染、疾患、疾病或病症。

【0390】如本文所用之「可調控修飾」係指在某些條件(例如但不限於細胞條件或階段、或外部條件)下進行之細胞之任何修飾。在實施例中，可調控修飾包含靶基因之可調控敲除。在實施例中，可調控修飾包含一或多種靶基因之可調控減少的表現。在實施例中，可調控修飾包含一或多種內源或外源基因之可調控的增加的表現。在實施例中，可調控修飾包含基於DNA之條件或可誘導組分、基於RNA之條件或可誘導組分、或基於蛋白質之條件或可誘導組分，以增加、減少或敲除靶基因之表現。

【0391】如本文所用之「可調控啟動子」僅在某些條件下有活性，例如(但不限於)細胞條件或階段或外部條件。如本文所用之可調控啟動子包括條件啟動子及可誘導啟動子。在一些情形下，可誘導可調控基因表現系統可在配位體、小分子、肽、因子、劑及諸如此類存在下打開或

關閉轉錄。在一些情形下，可調控基因表現系統可因應配位體、小分子、肽、因子、劑及諸如此類之存在來活化蛋白質降解路徑。

【0392】如本文所用之術語「調控序列」、「調控元件」及「控制元件」係可互換的且係指欲表現之多核苷酸靶之上游(5'非編碼序列)、其內或下游(3'非轉譯序列)的多核苷酸序列。調控序列影響例如(但不限於)轉錄之時間、轉錄之量或水準、RNA處理或穩定性、及/或相關結構核苷酸序列之轉譯。調控序列可包括活化劑結合序列、增強子、內含子、多腺苷酸化識別序列、啟動子、抑制子結合序列、莖-環結構、轉譯起始序列、轉譯前導序列、轉錄終止序列、轉譯終止序列、引子結合位點及諸如此類。意識到，由於在大多數情形下尚未完全定義調控序列之確切邊界，故不同長度之核苷酸序列可具有一致的調控或啟動子活性。

【0393】如本文所用之「安全港基因座」係指允許轉基因或外源基因表現之基因座，其方式使得新插入之遺傳元件能夠可預測地發揮功能且亦可能不會以對宿主細胞造成風險之方式引起宿主基因體改變。例示性「安全港」基因座包括(但不限於) CCR5基因、PPP1R12C (亦稱為AAVS1)基因、CLYBL基因及/或Rosa基因(*例如*ROSA26)。如本文所用之「靶基因座」係指允許轉基因或外源基因表現之基因座。例示性「靶基因座」包括(但不限於) CXCR4基因、白蛋白基因、SHS231基因座、F3基因(亦稱為

CD142)、MICA基因、MICB基因、LRP1基因(亦稱為CD91)、HMGB1基因、ABO基因、RHD基因、FUT1基因及/或KDM5D基因(亦稱為HY)。編碼外源基因之外源多核苷酸可插入B2M、CIITA、TRAC、TRBC、CCR5、F3(*即*CD142)、MICA、MICB、LRP1、HMGB1、ABO、RHD、FUT1、KDM5D(*即*HY)、PDGFRa、OLIG2及/或GFAP之CDS區域中。編碼外源基因之外源多核苷酸可插入PPP1R12C(*即*AAVS1)或CCR5之內含子1或2中。編碼外源基因之外源多核苷酸可插入CCR5之外顯子1或2或3中。編碼外源基因之外源多核苷酸可插入CLYBL之內含子2中。編碼外源基因之外源多核苷酸可插入Ch-4:58,976,613(*即*SHS231)之500 bp窗口中。編碼外源基因之外源多核苷酸可插入前述安全港或靶基因座之允許外源基因表現之任一適宜區域中，包括例如安全港或靶基因座中之內含子、外顯子或編碼序列區域。

【0394】如本文所用之「靶」可指藉由本文所述之方法經歷可調控減少的表現之基因、基因之一部分、基因體之一部分或蛋白質。

【0395】如本文所用之「治療有效量」係指足以在疾病、病症或疾患之治療及/或管控中提供治療益處之量。在一些實施例中，治療有效量係足以改善、減輕、穩定、逆轉、減緩、減弱或延遲疾病、病症或疾患之進展、或疾病、病症或疾患之症狀或副作用之進展的量。在一些實施例中，治療有效量亦係臨床有效量。在其他實施例中，治

療有效量不為臨床有效量。

【0396】如本文所用之術語「治療(treating)」及「治療(treatment)」包括向個體投與治療或臨床有效量之本文所述之細胞，以使得個體疾病之至少一個症狀減輕或疾病改良，例如有益或期望之治療或臨床結果。出於此技術之目的，有益或期望之治療或臨床結果包括(但不限於)緩和一或多個症狀、降低疾病之程度、穩定(*即*不惡化)疾病之狀態、延遲或減緩疾病進展、改善或減輕疾病狀態及緩解(無論係部分抑或完全)，無論係可偵測抑或不可偵測的。治療可指與未接受治療時之預期存活期相比，延長存活期。因此，熟習此項技術者意識到，治療可改良疾病病狀，但可能並非完全治愈疾病。在一些實施例中，在治療疾患、疾病或病症後，疾患、疾病或病症之一或多個症狀緩和至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。

【0397】出於此技術之目的，疾病治療之有益或期望之治療或臨床結果包括(但不限於)緩和一或多個症狀、降低疾病之程度、穩定(*即*不惡化)疾病之狀態、延遲或減緩疾病進展、改善或減輕疾病狀態及緩解(無論係部分抑或完全)，無論係可偵測抑或不可偵測的。

【0398】「載體」或「構築體」能夠將基因序列轉移至靶細胞。通常，「載體構築體」、「表現載體」及「基因轉移載體」意指能夠引導所關注基因之表現且可將基因序列轉移至靶細胞之任一核酸構築體。因此，該術語包括

選殖及表現媒劑以及整合載體。將載體或構築體引入細胞中之方法為熟習此項技術者已知且包括(但不限於)脂質介導之轉移(*即*脂質體，包括中性及陽離子脂質)、電穿孔、直接注射、細胞融合、粒子轟擊、磷酸鈣共沈澱、DEAE-葡聚糖介導之轉移及病毒載體介導之轉移。

【0399】在一些實施例中，細胞經改造以具有相對於未經改變或未經修飾之野生型細胞減少或增加的一或多個靶表現。在一些實施例中，細胞經改造以具有相對於未經改變或未經修飾之野生型細胞組成型減少或增加的一或多個靶表現。在一些實施例中，細胞經改造以具有相對於未經改變或未經修飾之野生型細胞可調控減少或增加的一或多個靶表現。在一些實施例中，細胞包含相對於相同細胞類型之野生型細胞或對照細胞增加的CD47表現。「野生型」或「wt」或「對照」在細胞之上下文中意指在自然界中發現之任一細胞。野生型或對照細胞之實例包括在自然界中發現之原代細胞及T細胞。然而，藉助實例，在經改造細胞之上下文中，如本文所用之「野生型」或「對照」亦可意指可含有可減少一或多種MHC I類分子及/或II類分子及/或T細胞受體之表現的核酸變化、但不會經受使CD47蛋白過表現之基因編輯程序之經改造細胞。舉例而言，如本文所用之「野生型」或「對照」意指包含減少或敲除之B2M、CIITA及/或TRAC表現之經改造細胞。亦如本文所用之「野生型」或「對照」意指包含減少或敲除之B2M、CIITA、TRAC及/或TRBC表現之經改造細胞。如本

文所用之「野生型」或「對照」亦意指可含有使CD47蛋白過表現之核酸變化、但不會經受減少一或多種MHC I類及/或II類分子及/或T細胞受體之表現的基因編輯程序之經改造細胞。在iPSC或其子代之上下文中，「野生型」或「對照」亦意指可含有產生多能性之核酸變化、但不會經受達成一或多種MHC I類及/或II類分子及/或T細胞受體之減少的表現及/或CD47蛋白過表現的本揭示案之基因編輯程序之iPSC或其子代。舉例而言，如本文所用之「野生型」或「對照」意指包含減少或敲除之B2M、CIITA及/或TRAC表現之iPSC或其子代。亦如本文所用之「野生型」或「對照」意指包含減少或敲除之B2M、CIITA、TRAC及/或TRBC表現之iPSC或其子代。在原代T細胞或其子代之上下文中，「野生型」或「對照」亦意指可含有可減少一或多種MHC I類及/或II類分子及/或T細胞受體之表現的核酸變化、但不會經受使CD47蛋白過表現之基因編輯程序之原代T細胞或其子代。舉例而言，如本文所用之「野生型」或「對照」意指包含減少或敲除之B2M、CIITA及/或TRAC表現之原代T細胞或其子代。亦如本文所用之「野生型」或「對照」意指包含減少或敲除之B2M、CIITA、TRAC及/或TRBC表現之原代T細胞或其子代。亦在原代T細胞或其子代之上下文中，「野生型」或「對照」亦意指可含有使CD47蛋白過表現之核酸變化、但不會經受可減少一或多種MHC I類及/或II類分子及/或T細胞受體之表現的基因編輯程序之原代T細胞或其子代。在一些實施例

中，細胞經改造以具有相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞可調控減少或增加的一或多個靶表現。在一些實施例中，野生型細胞或對照細胞係起始材料。在一些實施例中，起始材料以其他方式經修飾或經改造以改變一或多種基因之表現以生成經改造細胞。在一些實施例中，對照細胞來自與本文所述之細胞相同之起始材料。在一些實施例中，對照細胞來自參考起始材料。在一些實施例中，起始材料來自單一供體。在一些實施例中，起始材料來自供體之集合。

【0400】在一些實施例中，細胞經改造以表現相對於對照更高量之耐受原性因子。如本文所用之術語「對照」可用於細胞、細胞群體、樣品或量測之上下文中。在一些實施例中，細胞經改造以表現相對於對照細胞更高量之耐受原性因子。在一些實施例中，細胞經改造以表現相對於對照細胞群體更高量之耐受原性因子。在一些實施例中，細胞經改造以表現相對於對照樣品更高量之耐受原性因子。在一些實施例中，細胞經改造以表現相對於對照量測(包括但不限於分析或測試中之基線參考或對照信號)更高量之耐受原性因子。如本文所用之「基線參考」係指熟習此項技術者根據本揭示案已知之任一適宜參考值或信號水準，包括本文所呈現實例中所用之彼等參考值或信號水準。在一些實施例中，基線參考係指對照水準，且在一些水準中係指可與測試表現水準進行比較之正常表現水準。在一些實施例中，基線參考係指適於所用特定測試或分析

之對照或背景水準。在一些實施例中，基線參考係指對照信號，包括(但不限於)來自可用於評估表現水準之此項技術中已知之任一適宜測試或分析的同型對照值。在一些實施例中，基線參考係指來自可用於評估表現水準之此項技術中已知之任一適宜測試或分析之背景信號。在一些實施例中，細胞經改造以臨限值水準或更高水準表現耐受原性因子。在一些實施例中，細胞經改造以臨限值水準或更高水準表現CD47。臨限值可使用熟習此項技術者根據本說明書已知之任一適宜方法(包括例如本文所揭示之彼等方法)來確定。在一些實施例中，基線參考特異性針對經改造細胞或包含經改造細胞之細胞群體。

【0401】應注意，可起草申請專利範圍以排除任何視情況存在之要素。因此，此陳述意欲用作結合申請專利範圍要素之列舉使用諸如「唯一」、「僅」及諸如此類排他性術語或使用「負面」限制之先行基礎。如熟習此項技術者在閱讀本揭示案後應明瞭，本文闡述及說明之每一個別實施例具有離散組分及特性，其可容易地與其他若干實施例中任一者之特性分離或組合而不背離本揭示案之範圍或精神。可以所列舉事件之順序或以邏輯上可能之任何其他順序來實施任一所列舉方法。儘管類似或等效於本文所述方法及材料之任何方法及材料亦可用於本揭示案之實踐或測試中，但現闡述代表性說明方法及材料。

【0402】除非另有定義，否則本文所用之所有技術及科學術語皆具有與本揭示案所屬領域之普通技術人員通常

理解之含義相同之含義。當提供值範圍時，應理解，除非上下文另有明確說明，否則在該範圍之上限及下限與該所述範圍中之任何其他所述值或中間值之間的每個中間值，至下限單位之十分之一，皆涵蓋於本揭示案內。該等較小範圍之上限及下限可獨立地包括在較小範圍內，且亦涵蓋於本揭示案內，服從所述範圍中之任何明確排除之限值。當所述範圍包括一或兩個限值時，排除彼等所包括限值中之任一者或兩者之範圍亦包括在本揭示案中。本文呈現某些範圍，其中數值之前面具有術語「約」。術語「約」在本文中用於為其前面之確切數字以及接近或近似該術語前面之數字之數字提供文字支持。在確定數字是否接近或近似具體列舉之數字中，接近或近似未列舉之數字可為在所呈現之上下文中向細胞提供該具體列舉之數字之實質性等效物的數字。術語約在本文中用於意指加或減值之百分之十(10%)。舉例而言，「約100」係指介於90與110之間的任一數字。

【0403】本說明書中所引用之所有公開案、專利及專利申請案皆以引用方式併入本文中，其併入程度如同將每一個別公開案、專利或專利申請案特定且個別地指示以引用方式併入一般。另外，每一引用之公開案、專利或專利申請案以引用方式併入本文中以揭示並闡述與公開案結合引用之標的物。任一公開案之引用係為其在提出申請日之前揭示且不應理解為承認本文所述之技術由於先前技術而無權先於該公開案。另外，所提供公開案之日期可不同於

實際公開日期，其可能需要獨立確認。

【0404】在進一步闡述該技術之前應理解，該技術並不限於所述之特定實施例，因此其當然可發生變化。亦應理解，本文所用之術語僅用於闡述特定實施例之目的，而不欲具有限制性，此乃因本揭示案之範圍將僅受所附申請專利範圍的限制。亦應理解，本文所用之標題不具限制性且僅意欲對讀者定向，但標的物通常適用於本文所揭示之技術。

III. 詳細描述

A. 低免疫原性細胞

【0405】在一些實施例中，本揭示案提供經改造(*例如*經修飾及經遺傳修飾)之細胞，其包含以下可調控修飾：i)相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，減少一或多種MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之表現，其中可調控減少的表現係藉助基於RNA之組分、基於DNA之組分或基於蛋白質之組分，及/或ii)相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，增加編碼一或多種耐受原性因子之第一外源多核苷酸之表現，其中可調控過表現係藉助條件或可誘導啟動子。在一些實施例中，細胞能夠逃避活化NK細胞介導之及/或基於抗體之免疫反應。

【0406】在一些實施例中，細胞係誘導性多能幹細胞、其任一類型之分化細胞、原代免疫細胞及任一組織之其他原代細胞。在一些實施例中，分化細胞係心臟細胞及

其亞群、神經細胞及其亞群、大腦內皮細胞及其亞群、多巴胺能神經元及其亞群、神經膠質祖細胞及其亞群、內皮細胞及其亞群、甲狀腺細胞及其亞群、肝細胞及其亞群、胰島細胞及其亞群、或視網膜色素上皮細胞及其亞群。在一些實施例中，分化細胞係T細胞及其亞群、NK細胞及其亞群。在一些實施例中，原代免疫細胞係T細胞及其亞群、及NK細胞及其亞群。在一些實施例中，原代組織細胞包括原代內皮細胞及其亞群。

【0407】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，本文所述之細胞包含一或多種MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現，其中可調控減少的表現係藉助基於RNA之組分。在一些實施例中，基於RNA之組分選自由以下組成之群：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。在一些實施例中，基於RNA之組分處於條件啟動子之控制下，其中條件啟動子係細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。在一些實施例中，基於RNA之組分處於可誘導啟動子之控制下，其中可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【0408】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，本文所述之細胞包含一或多種MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之可調控減少的表

現，其中可調控減少的表現係藉助基於DNA之組分。在一些實施例中，基於DNA之組分係使用選自由以下組成之群之方法敲除或敲低：條件或可誘導CRISPR、條件或可誘導TALEN、條件或可誘導鋅指核酸酶、條件或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件或可誘導大範圍核酸酶。在一些實施例中，基於DNA之組分處於條件啟動子之控制下，其中條件啟動子係細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。在一些實施例中，基於DNA之組分處於可誘導啟動子之控制下，其中可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【0409】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，本文所述之細胞包含一或多種MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現，其中可調控減少的表現係藉助基於蛋白質之組分。在一些實施例中，基於蛋白質之組分係條件或可誘導降解子方法。在一些實施例中，降解子方法選自由以下組成之群：使用SMASH標籤之配位體誘導之降解(LID)、使用Shield-1之LID、使用生長素之LID、使用雷帕黴素之LID、條件或可誘導肽降解子(*例如*基於IKZF3之降解子)及條件或可誘導蛋白水解靶向嵌合體(PROTAC)。在一些實施例中，基於蛋白質之組分處於條件啟動子之控制下，其中條件啟動子係細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。在一些實施

例中，基於蛋白質之組分處於可誘導啟動子之控制下，其中可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【0410】在一些實施例中，本文所述之細胞包含編碼一或多種耐受原性因子之第一外源多核苷酸之可調控過表現，其中可調控過表現係藉助條件或可誘導啟動子。在一些實施例中，可調控過表現係藉助條件啟動子，其中條件啟動子係細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。在一些實施例中，可調控過表現係藉助可誘導啟動子，該可誘導啟動子由小分子、配位體或生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【0411】在一些實施例中，本揭示案係關於多能幹細胞(*例如*多能幹細胞及誘導性多能幹細胞(iPSC))、衍生自該等多能幹細胞之分化細胞(例如但不限於T細胞、NK細胞、心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞及視網膜色素上皮細胞)及原代細胞(例如但不限於原代T細胞及原代NK細胞)。在一些實施例中，多能幹細胞、衍生自其之分化細胞(例如T細胞、NK細胞、心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞及視網膜色素上皮細胞)及原代細胞(例如原代T細胞及原代NK細胞)經改造用於一或多種MHC I類及/或MHC II類人

類白血球抗原分子之可調控減少的表現或可調控的缺乏表現，且在一些情況下用於T細胞受體(TCR)複合物之可調控減少的表現或可調控的缺乏表現。在一些實施例中，除(i)一或多種MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現或可調控的缺乏表現，及(ii) T細胞受體(TCR)複合物之可調控減少的表現或可調控的缺乏表現外，低免疫T細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47且視情況地可調控地過表現嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，CAR包含結合至選自由以下組成之群之任一者之抗原結合結構域：CD19、CD22、CD38、CD123、CD138及BCMA。在一些實施例中，CAR係CD19特異性CAR。在一些實施例中，CAR係CD22特異性CAR。在一些情況下，CAR係CD38特異性CAR。在一些實施例中，CAR係CD123特異性CAR。在一些實施例中，CAR係CD138特異性CAR。在一些情況下，CAR係BCMA特異性CAR。在一些實施例中，CAR係雙特異性CAR。在一些實施例中，雙特異性CAR係CD19/CD22雙特異性CAR。在一些實施例中，雙特異性CAR係BCMA/CD38雙特異性CAR。在一些實施例中，所述細胞表現CD19特異性CAR及不同CAR，例如(但不限於) CD22特異性CAR、CD38特異性CAR、CD123特異性CAR、CD138特異性CAR及BCMA特異性CAR。在一些實施例中，所述細胞表現CD22特異性CAR及不同CAR，例如(但不限於) CD19特異性CAR、CD38特異性CAR、CD123特異性CAR、CD138特異性CAR及BCMA特異

性CAR。在一些實施例中，所述細胞表現CD38特異性CAR及不同CAR，例如(但不限於) CD22特異性CAR、CD18特異性CAR、CD123特異性CAR、CD138特異性CAR及BCMA特異性CAR。在一些實施例中，所述細胞表現CD123特異性CAR及不同CAR，例如(但不限於) CD22特異性CAR、CD38特異性CAR、CD19特異性CAR、CD138特異性CAR及BCMA特異性CAR。在一些實施例中，所述細胞表現CD138特異性CAR及不同CAR，例如(但不限於) CD22特異性CAR、CD38特異性CAR、CD123特異性CAR、CD19特異性CAR及BCMA特異性CAR。在一些實施例中，所述細胞表現BCMA特異性CAR及不同CAR，例如(但不限於) CD22特異性CAR、CD38特異性CAR、CD123特異性CAR、CD138特異性CAR及CD19特異性CAR。

【0412】在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫細胞(例如但不限於T細胞、NK細胞、心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞及視網膜色素上皮細胞)可調控地過表現CD47，且包括B2M基因之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低。在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫細胞(例如但不限於T細胞、NK細胞、心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞及視網膜色素上皮細胞)可調控地過表現CD47，且包括CIITA基因之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低。在

一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{敲低}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一

些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之

B2M$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*

敲低、*TRBC*敲低、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*敲低、*TRBC*敲低、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*插入缺失/插入缺失、*CIITA*插入缺失/插入缺失、*TRAC*插入缺失/插入缺失、*TRBC*插入缺失/插入缺失細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*插入缺失/插入缺失、*TRAC*插入缺失/插入缺失、*TRBC*插入缺失/插入缺失、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*插入缺失/插入缺失、*TRAC*插入缺失/插入缺失、*TRBC*插入缺失/插入缺失、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*敲低、*CIITA*敲低、*TRAC*敲低、*TRBC*敲低細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*敲低、*TRAC*敲低、*TRBC*敲低、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*敲低、*TRAC*敲低、*TRBC*敲低、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*插入缺失/插入缺失、*CIITA*插入缺失/插入缺失、*TRAC*插入缺失/插入缺失、

TRBC$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。

【0413】在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫細胞係由分化誘導性多能幹細胞(例如低免疫原性誘導性多能幹細胞)產生。

【0414】在一些實施例中，衍生自ESC之低免疫細胞(例如但不限於T細胞、NK細胞、心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞及視網膜色素上皮細胞)可調控地過表現CD47，且包括B2M基因之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低。在一些實施例中，衍生自ESC之低免疫細胞(例如但不限於T細胞、NK細胞、心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞及視網膜色素上皮細胞)可調控地過表現CD47，且包括CIITA基因之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$細胞。在一些實施

例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*

細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$CIITA^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$CIITA^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、$TRBC^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$TRBC^{-/-}$、

*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*^{敲低}、

TRBC^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、

TRBC$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫細胞係由分化多能幹細胞(例如低免疫原性胚胎幹細胞)產生。

【0415】在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫T細胞及原代T細胞可調控地過表現一或多種耐受原性因子及嵌合抗原受體(CAR)，且包括B2M基因之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低。在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫T細胞及原代T細胞可調控地過表現一或多種耐受原性因子，且包括CIITA基因之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低。在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫T細胞及原代T細胞可調控地過表現一或多種耐受原性因子及CAR，且包括TRAC基因之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低。在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫T細胞及原代T細胞可調控地過表現一或多種耐受原性因子及CAR，且包括TRB基因之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低。在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫T細胞及原代T細胞可調控地過表現一或多種耐受原性因子及CAR，且包括一或多種選自由以下組成之群之可調控基因

體修飾或可調控敲除或敲低：B2M、CIITA、TRAC及TRB基因。在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫T細胞及原代T細胞可調控地過表現一或多種耐受原性因子及CAR，且包括B2M、CIITA、TRAC及TRB基因之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低。在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫T細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47及嵌合抗原受體(CAR)，且包括B2M基因之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低。在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫T細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47，且包括CIITA基因之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低。在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫T細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47及CAR，且包括TRAC基因之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低。在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫T細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47及CAR，且包括TRB基因之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低。在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫T細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47及CAR，且包括一或多種選自由以下組成之群之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低：B2M、CIITA、TRAC及TRB基因。在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫T細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47及CAR，且包括B2M、CIITA、TRAC及TRB基因之可調控基因體修飾或可調控敲除或敲低。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控

之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、

CIITA$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施

例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一

些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、$TRBC^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、$TRBC^{-/-}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$CIITA^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、$TRBC^{-/-}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、$TRBC^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、$TRBC^{插入缺失/插入缺失}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、$TRBC^{插入缺失/插入缺失}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$、$TRBC^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$、$TRBC^{敲低}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$CIITA^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$、$TRBC^{敲低}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、$TRBC^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、$TRBC^{-/-}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、$TRBC^{-/-}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、$TRBC^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、$TRBC^{插入缺失/插入缺失}$、$CD47tg$細胞。在

一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，低免疫T細胞係由分化誘導性多能幹細胞(例如低免疫原性誘導性多能幹細胞)產生。

【0416】在一些實施例中，衍生自iPSC之低免疫T細胞及原代T細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例

中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、

TRBC$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。

【0417】在一些實施例中，所述之經改造或經修飾細胞係多能幹細胞、誘導性多能幹細胞、自多能幹細胞及誘導性多能幹細胞分化之NK細胞、自該等多能幹細胞及誘導性多能幹細胞分化之T細胞、或原代T細胞。原代T細胞之非限制性實例包括CD3+ T細胞、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、幼稚T細胞、調控T (Treg)細胞、非調控T細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th9細胞、Th17細胞、T濾泡性輔助(Tfh)細胞、細胞毒性T淋巴球(CTL)、效應T (Teff)細胞、中央記憶T (Tcm)細胞、效應記憶T (Tem)細胞、表現CD45RA之效應記憶T細胞(TEMRA細胞)、組織駐留記憶(Trm)細胞、虛擬記憶T細胞、先天記憶T細胞、記憶幹細胞(Tsc)、γδ T細胞及T細胞之任何其他亞型。在一些實施例中，原代T細胞選自包括細胞毒性T細胞、輔助T細胞、記憶T細胞、調控T細胞、腫瘤浸潤淋巴球及其組合之群。NK細胞及原代NK細胞之非限制性實例包括不成熟NK細胞及成熟NK細胞。在一些實施例中，與野生型或對照細胞(包括未經改變或未經修飾之野生型細胞或對照細胞)相比，細胞經修飾或改造。在一些實施例中，野生型細胞或

對照細胞係起始材料。在一些實施例中，起始材料以其他方式經修飾或經改造以改變一或多種基因之表現以生成經改造細胞。

【0418】在一些實施例中，原代T細胞來自一或多個供體個體之原代T細胞之集合，該一或多個供體個體不同於接受個體(*例如*投與細胞之患者)。原代T細胞可自1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、50個、100個或更多個供體個體獲得且集合在一起。原代T細胞可自1或多個、2個或更多個、3個或更多個、4個或更多個、5個或更多個、6個或更多個、7個或更多個、8個或更多個、9個或更多個、10個或更多個、20個或更多個、50個或更多個、或100個或更多個供體個體獲得且集合在一起。在一些實施例中，原代T細胞係自一個或複數個個體收穫，且在一些情況下，在活體外培養原代T細胞或原代T細胞之集合。在一些實施例中，原代T細胞或原代T細胞之集合經改造以可調控地外源表現CD47且在活體外培養。

【0419】在許多實施例中，原代T細胞或原代T細胞之集合經改造以可調控地表現嵌合抗原受體(CAR)。CAR可為熟習此項技術者已知之任一CAR。有用的CAR包括結合選自包括CD19、CD20、CD22、CD38、CD123、CD138及BCMA之群之抗原的彼等CAR。在一些情形下，CAR與FDA批準之CAR-T細胞療法中所用之彼等CAR (例如但不限於替沙崙賽(tisagenlecleucel)及利基邁崙賽

(lisocabtagene maraleucel)中所用之彼等CAR)或在臨床試驗中處於研究下之其他CAR相同或等效。

【0420】在一些實施例中，原代T細胞或原代T細胞之集合經改造以可調控地展現與未經修飾之原代T細胞相比減少的內源T細胞受體表現。在某些實施例中，原代T細胞或原代T細胞之集合經改造以展現與未經修飾之原代T細胞相比減少的CTLA-4、PD-1或CTLA-4及PD-1表現。遺傳修飾細胞(包括T細胞)之方法詳細闡述於例如WO2020/018620及WO2016/183041中，該等專利之揭示內容之全文皆以引用方式併入本文中，包括表、附錄、序列表及圖。

【0421】在一些實施例中，CAR-T細胞包含選自包括以下之群之CAR：(a)第一代CAR，其包含抗原結合結構域、跨膜結構域及信號傳導結構域；(b)第二代CAR，其包含抗原結合結構域、跨膜結構域及至少兩個信號傳導結構域；(c)第三代CAR，其包含抗原結合結構域、跨膜結構域及至少三個信號傳導結構域；及(d)第四代CAR，其包含抗原結合結構域、跨膜結構域、三個或四個信號傳導結構域及在CAR之成功信號傳導後誘導細胞介素基因表現之結構域。

【0422】在一些實施例中，CAR-T細胞包含CAR，其包含抗原結合結構域、跨膜結構域及一或多個信號傳導結構域。在一些實施例中，CAR亦包含連接體。在一些實施例中，CAR包含CD19抗原結合結構域。在一些實施例中，CAR包含CD28或CD8α跨膜結構域。在一些實施例

中，CAR包含CD8α信號肽。在一些實施例中，CAR包含Whitlow連接體GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 15)。在一些實施例中，CAR之抗原結合結構域選自包括(但不限於)以下之群：(a)靶向贅瘤細胞所特有之抗原之抗原結合結構域；(b)靶向T細胞所特有之抗原之抗原結合結構域；(c)靶向自體免疫或發炎性病症所特有之抗原之抗原結合結構域；(d)靶向衰老細胞所特有之抗原之抗原結合結構域；(e)靶向傳染病所特有之抗原之抗原結合結構域；及(f)結合至細胞之細胞表面抗原之抗原結合結構域。

【0423】在一些實施例中，CAR進一步包含一或多個連接體。scFv之格式通常係藉由撓性肽序列或「連接體」連接之兩個可變結構域，取向呈VH-連接體-VL或VL-連接體-VH。熟習此項技術者根據本說明書已知之任一適宜連接體可用於CAR中。適宜連接體之實例包括(但不限於)基於GS之連接體序列及Whitlow連接體GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:15)。在一些實施例中，連接體係GS或gly-ser連接體。例示性gly-ser多肽連接體包含胺基酸序列$Ser(Gly_4Ser)_n$以及$(Gly_4Ser)_n$及/或$(Gly_4Ser_3)_n$。在一些實施例中，n=1。在一些實施例中，n=2。在一些實施例中，n=3，即$Ser(Gly_4Ser)_3$。在一些實施例中，n=4，即$Ser(Gly_4Ser)_4$。在一些實施例中，n=5。在一些實施例中，n=6。在一些實施例中，n=7。在一些實施例中，n=8。在一些實施例中，n=9。在一些實施例中，n=10。另一例示性gly-ser多肽連接體包含胺基酸序列

$Ser(Gly_4Ser)_n$。在一些實施例中，n=1。在一些實施例中，n=2。在一些實施例中，n=3。在另一實施例中，n=4。在一些實施例中，n=5。在一些實施例中，n=6。另一例示性gly-ser多肽連接體包含(Gly4Ser)n。在一些實施例中，n=1。在一些實施例中，n=2。在一些實施例中，n=3。在一些實施例中，n=4。在一些實施例中，n=5。在一些實施例中，n=6。另一例示性gly-ser多肽連接體包含$(Gly_3Ser)_n$。在一些實施例中，n=1。在一些實施例中，n=2。在一些實施例中，n=3。在一些實施例中，n=4。在另一實施例中，n=5。在另一實施例中，n=6。另一例示性gly-ser多肽連接體包含$(Gly_4Ser_3)_n$。在一些實施例中，n=1。在一些實施例中，n=2。在一些實施例中，n=3。在一些實施例中，n=4。在一些實施例中，n=5。在一些實施例中，n=6。另一例示性gly-ser多肽連接體包含$(Gly_3Ser)_n$。在一些實施例中，n=1。在一些實施例中，n=2。在一些實施例中，n=3。在一些實施例中，n=4。在另一實施例中，n=5。在另一實施例中，n=6。

【0424】在一些實施例中，抗原結合結構域選自包括以下之群：抗體、抗原結合部分或其片段、scFv及Fab。在一些實施例中，抗原結合結構域結合至CD19、CD20、CD22、CD38、CD123、CD138或BCMA。在一些實施例中，抗原結合結構域係抗CD19 scFv，例如(但不限於)FMC63。

【0425】在一些實施例中，跨膜結構域包含選自包括

以下之群之一者：TCRα、TCRβ、TCRζ、CD3ε、CD3γ、CD3δ、CD3ζ、CD4、CD5、CD8α、CD8β、CD9、CD16、CD28、CD45、CD22、CD33、CD34、CD37、CD40、CD40L/CD154、CD45、CD64、CD80、CD86、OX40/CD134、4-1BB/CD137、CD154、FcεRIγ、VEGFR2、FAS、FGFR2B及其功能變異體之跨膜區。

【0426】在一些實施例中，CAR之信號傳導結構域包含共刺激結構域。例如，信號傳導結構域可含有共刺激結構域。或，信號傳導結構域可含有一或多個共刺激結構域。在某些實施例中，信號傳導結構域包含共刺激結構域。在其他實施例中，信號傳導結構域包含共刺激結構域。在一些情形下，當CAR包含兩個或更多個共刺激結構域時，兩個共刺激結構域並不相同。在一些實施例中，共刺激結構域包含並不相同之兩個共刺激結構域。在一些實施例中，共刺激結構域在T細胞活化期間增強細胞介素產生、CAR-T細胞增殖及/或CAR-T細胞持久性。在一些實施例中，共刺激結構域在T細胞活化期間增強細胞介素產生、CAR-T細胞增殖及/或CAR-T細胞持久性。

【0427】如本文所述，第四代CAR可含有抗原結合結構域、跨膜結構域、三個或四個信號傳導結構域及在CAR之成功信號傳導後誘導細胞介素基因表現之結構域。在一些情況下，細胞介素基因係低免疫原性細胞之內源或外源細胞介素基因。在一些情形下，細胞介素基因編碼促發炎細胞介素。在一些實施例中，促發炎細胞介素選自包括以

下之群：IL-1、IL-2、IL-9、IL-12、IL-18、TNF、IFN-γ及其功能片段。在一些實施例中，在CAR之成功信號傳導後誘導細胞介素基因表現之結構域包含轉錄因子或其功能結構域或片段。

【0428】在一些實施例中，CAR包含CD3 zeta (CD3ζ)結構域或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)或其功能變異體。在一些實施例中，CAR包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；及(ii) CD28結構域、或4-1BB結構域、或其功能變異體。在其他實施例中，CAR包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；(ii) CD28結構域或其功能變異體；及(iii) 4-1BB結構域、或CD134結構域、或其功能變異體。在某些實施例中，CAR包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；(ii) CD28結構域或其功能變異體；(iii) 4-1BB結構域、或CD134結構域、或其功能變異體；及(iv)細胞介素或共刺激配位體轉基因。在一些實施例中，CAR包含(i)抗CD19 scFv；(ii) CD8α鉸鏈及跨膜結構域或其功能變異體；(iii) 4-1BB共刺激結構域或其功能變異體；及(iv) CD3ζ信號傳導結構域或其功能變異體。

【0429】用於引入CAR構築體或產生CAR-T細胞之方法為熟習此項技術者所熟知。詳細描述參見例如Vormittag等人，Curr Opin Biotechnol, 2018, 53, 162-181；及Eyquem

等人，Nature, 2017, 543, 113-117。

【0430】在一些實施例中，衍生自原代T細胞之細胞包含減少的內源T細胞受體表現，例如藉由破壞內源T細胞受體基因(*例如*T細胞受體α恆定區(TRAC)或T細胞受體β恆定區(TRB))。在一些實施例中，編碼如本文所揭示之多肽(*例如*嵌合抗原受體、CD47或本文所揭示之另一耐受原性因子)之外源核酸插入破壞的T細胞受體基因處。在一些實施例中，編碼多肽之外源核酸插入TRAC或TRB基因座處。

【0431】在一些實施例中，衍生自原代T細胞之細胞包含減少的細胞毒性T淋巴球相關蛋白4 (CTLA4)及/或程式化細胞死亡(PD1)表現。減少或消除CTLA4、PD1以及CTLA4及PD1二者之表現之方法可包括熟習此項技術者意識到之任一方法，例如(但不限於)利用稀切核酸內切酶之遺傳修飾技術及RNA沈默或RNA干擾技術。稀切核酸內切酶之非限制性實例包括任一Cas蛋白、TALEN、鋅指核酸酶、大範圍核酸酶及/或歸巢核酸內切酶。在一些實施例中，編碼如本文所揭示之多肽(*例如*嵌合抗原受體、CD47或本文所揭示之另一耐受原性因子)之外源核酸插入CTLA4及/或PD1基因座處。

【0432】在一些實施例中，編碼具有可調控表現之一或多種耐受原性因子之轉基因插入細胞之預選基因座中。在一些實施例中，編碼CAR之轉基因插入細胞之預選基因座中。在某些實施例中，編碼具有可調控表現之一或多種

耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因插入細胞之預選基因座中。預選基因座可為安全港基因座或靶基因座。安全港基因座之非限制性實例包括(但不限於) CCR5基因座、PPP1R12C (亦稱為AAVS1)基因座及CLYBL基因座、Rosa基因座(*例如*ROSA26基因座)。靶基因座之非限制性實例包括(但不限於) CXCR4基因座、白蛋白基因座、SHS231基因座、F3基因座(亦稱為CD142)、MICA基因座、MICB基因座、LRP1基因座(亦稱為CD91基因座)、HMGB1基因座、ABO基因座、RHD基因座、FUT1基因座及KDM5D基因座。編碼一或多種耐受原性因子之轉基因可插入PPP1R12C (*即*AAVS1)或CCR5之內含子1或2中。編碼一或多種耐受原性因子之轉基因可插入PPP1R12C (*即*AAVS1)或CCR5之內含子1或2中。編碼一或多種耐受原性因子之轉基因可插入CCR5之外顯子1或2或3中。編碼一或多種耐受原性因子之轉基因可插入CLYBL之內含子2中。編碼一或多種耐受原性因子之轉基因可插入Ch-4:58,976,613 (*即*SHS231)之500 bp窗口中。編碼一或多種耐受原性因子之轉基因可插入前述安全港或靶基因座之允許外源基因表現之任一適宜區域中，包括例如安全港或靶基因座中之內含子、外顯子或編碼序列區域。在一些實施例中，預選基因座選自由以下組成之群：*B2M*基因座、*CIITA*基因座、*TRAC*基因座及*TRB*基因座。在一些實施例中，預選基因座係*B2M*基因座。在一些實施例中，預選基因座係*CIITA*基因座。在一些實施例中，預選基因座係

*TRAC*基因座。在一些實施例中，預選基因座係*TRB*基因座。

【0433】在一些實施例中，編碼具有可調控表現之一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因插入同一基因座中。在一些實施例中，編碼具有可調控表現之一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因插入不同基因座中。在許多情況下，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因插入安全港或靶基因座中。在許多情況下，編碼CAR之轉基因插入安全港或靶基因座中。在一些情況下，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因插入*B2M*基因座中。在一些情況下，編碼CAR之轉基因插入*B2M*基因座中。在某些情況下，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因插入*CIITA*基因座中。在某些情況下，編碼CAR之轉基因插入*CIITA*基因座中。在特定情況下，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因插入*TRAC*基因座中。在特定情況下，編碼CAR之轉基因插入*TRAC*基因座中。在許多其他情況下，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因插入*TRB*基因座中。在許多其他情況下，編碼CAR之轉基因插入*TRB*基因座中。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因插入安全港或靶基因座(*例如*CCR5基因座、CXCR4基因座、PPP1R12C基因座、白蛋白基因座、SHS231基因座、CLYBL基因座、Rosa基因座、F3(CD142)基因座、MICA基因座、MICB基因座、LRP1(CD91)基因座、HMGB1基因座、ABO基因座、RHD基因

座、FUT1基因座及KDM5D基因座)中。

【0434】在許多實施例中，編碼具有可調控表現之一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因插入安全港或靶基因座中。在某些實施例中，編碼具有可調控表現之一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因受單一啟動子控制且插入安全港或靶基因座中。在某些實施例中，編碼具有可調控表現之一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因受其自身啟動子控制且插入安全港或靶基因座中。在某些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因插入*TRAC*基因座中。在某些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因受單一啟動子控制且插入*TRAC*基因座中。在某些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因受其自身啟動子控制且插入*TRAC*基因座中。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因插入*TRB*基因座中。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因受單一啟動子控制且插入*TRB*基因座中。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因受其自身啟動子控制且插入*TRB*基因座中。在其他實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因插入*B2M*基因座中。在其他實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因受單一啟動子控制且插入*B2M*基因座中。在其他

實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因受其自身啟動子控制且插入*B2M*基因座中。在多個實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因插入*CIITA*基因座中。在多個實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因受單一啟動子控制且插入*CIITA*基因座中。在多個實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因受其自身啟動子控制且插入*CIITA*基因座中。

【0435】在一些情況下，控制所述任一轉基因之表現之啟動子係組成型啟動子。在一些情況下，控制所述任一轉基因之表現之啟動子係條件啟動子。在其他情況下，用於所述任一轉基因之啟動子係可誘導啟動子。在一些實施例中，啟動子係EF1α啟動子。在一些實施例中，啟動子係CAG啟動子。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受組成型啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受條件啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受細胞週期特異性啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受組織特異性啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受譜系特異性啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受分化誘導之啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受可誘導啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉

基因受由小分子調控之可誘導啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受由配位體調控之可誘導啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受由生物劑調控之可誘導啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受由適配體介導之多腺苷酸化調節劑調控之可誘導啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受由適配體調控之核糖開關調控之可誘導啟動子控制。在一些實施例中，CAR轉基因受組成型啟動子控制。在一些實施例中，CAR轉基因受條件啟動子控制。在一些實施例中，CAR轉基因受細胞週期特異性啟動子控制。在一些實施例中，CAR轉基因受組織特異性啟動子控制。在一些實施例中，CAR轉基因受譜系特異性啟動子控制。在一些實施例中，CAR轉基因受分化誘導之啟動子控制。在一些實施例中，CAR轉基因受可誘導啟動子控制。在一些實施例中，CAR轉基因受由小分子調控之可誘導啟動子控制。在一些實施例中，CAR轉基因受由配位體調控之可誘導啟動子控制。在一些實施例中，CAR轉基因受由生物劑調控之可誘導啟動子控制。在一些實施例中，CAR轉基因受由適配體介導之多腺苷酸化調節劑調控之可誘導啟動子控制。在一些實施例中，CAR轉基因受由適配體調控之核糖開關調控之可誘導啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因皆受條件啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原

性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因皆受可誘導啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受組成型啟動子控制且編碼CAR之轉基因受可誘導啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受組成型啟動子控制且編碼CAR之轉基因受條件啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受條件啟動子控制且編碼CAR之轉基因受可誘導啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受條件啟動子控制且編碼CAR之轉基因受組成型啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受可誘導啟動子控制且編碼CAR之轉基因受條件啟動子控制。在多個實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受EF1α啟動子控制且編碼CAR之轉基因受EF1α啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受CAG啟動子控制且編碼CAR之轉基因受CAG啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受CAG啟動子控制且編碼CAR之轉基因受EF1α啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因受EF1α啟動子控制且編碼CAR之轉基因受CAG啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因之表現受單一EF1α啟動子控制。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因及編碼CAR之轉基因之表現受單一CAG啟動子控制。

【0436】在另一實施例中，本文所揭示之本揭示案係關於多能幹細胞(*例如*多能幹細胞及誘導性多能幹細胞(iPSC))、衍生自該等多能幹細胞之分化細胞(*例如*低免疫T細胞、心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞及視網膜色素上皮細胞)及原代T細胞，其可調控地過表現CD47 (例如可調控地外源表現CD47蛋白)，具有一或多種MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現或缺乏其表現，且具有T細胞受體(TCR)複合物之可調控減少的表現或缺乏其表現。在一些實施例中，低免疫T細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47 (例如可調控地外源表現CD47蛋白)，具有一或多種MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現或缺乏其表現，且具有T細胞受體(TCR)複合物之可調控減少的表現或缺乏其表現。

【0437】在一些實施例中，多能幹細胞(*例如*多能幹細胞及誘導性多能幹細胞(iPSC))、衍生自該等多能幹細胞之分化細胞(*例如*低免疫T細胞、心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞及視網膜色素上皮細胞)及原代T細胞可調控地過表現CD47且包括B2M基因之可調控基因體修飾。在一些實施例中，多能幹細胞、衍生自該等多能幹細胞之分化細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47且包括CIITA基因之可調控基因體修飾。在一些實施

例中，多能幹細胞、衍生自該等多能幹細胞之分化細胞(例如但不限於T細胞、NK細胞、心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞及視網膜色素上皮細胞)係可調控之$B2M^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細

胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、

*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，多能幹細胞、自該等多能幹細胞分化之T細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47且包括TRAC基因之可調控基因體修飾。在一些實施例中，多能幹細胞、自該等多能幹細胞分化之T細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47且包括TRB基因之可調控基因體修飾。在一些實施例中，多能幹細胞、自該等多能幹細胞分化之T細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47且包括一或多種選自由以下組成之群之可調控基因體修飾：B2M、CIITA、TRAC及TRB基因。在一些實施例中，多能

幹細胞、自該等多能幹細胞分化之T細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47且包括B2M、CIITA及TRAC基因之可調控基因體修飾。在一些實施例中，多能幹細胞、自該等多能幹細胞分化之T細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47且包括B2M、CIITA及TRB基因之可調控基因體修飾。在一些實施例中，多能幹細胞、自該等多能幹細胞分化之T細胞及原代T細胞可調控地過表現CD47且包括B2M、CIITA、TRAC及TRB基因之可調控基因體修飾。在某些實施例中，多能幹細胞、衍生自該等多能幹細胞之分化細胞及原代T細胞係可調控之$B2M^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施

例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{敲低}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、$CD47tg$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$CIITA^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、$CD47tg$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之

$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、$CD47tg$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、$CD47tg$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$、$CD47tg$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$CIITA^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$、$CD47tg$。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、$TRBC^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$TRBC^{-/-}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$、$TRBC^{-/-}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRBC^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$TRBC^{插入缺失/插入缺失}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRBC^{插入缺失/插入缺失}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$、$TRBC^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$TRBC^{敲低}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{敲低}$、$TRBC^{敲低}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、$TRBC^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{-/-}$、$TRBC^{-/-}$、$CD47tg$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現

CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細

胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，所述之經改造或經修飾細胞係多能幹細胞(*例如*胚胎幹細胞或誘導性多能幹細胞)、自該等多能幹細胞分化之T細胞或原代T細胞。原代T細胞之非限制性實例包括CD3+ T細胞、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、幼稚T細胞、調控T (Treg)細胞、非調控T細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th9細胞、Th17細胞、T濾泡性輔助(Tfh)細胞、細胞毒性T淋巴球(CTL)、效應T (Teff)細胞、中央記憶T

(Tcm)細胞、效應記憶T (Tem)細胞、表現CD45RA之效應記憶T細胞(TEMRA細胞)、組織駐留記憶(Trm)細胞、虛擬記憶T細胞、先天記憶T細胞、記憶幹細胞(Tsc)、γδ T細胞及T細胞之任何其他亞型。在一些實施例中，與野生型或對照細胞(包括未經改變或未經修飾之野生型細胞或對照細胞)相比，細胞經修飾或改造。在一些實施例中，野生型細胞或對照細胞係起始材料。在一些實施例中，起始材料以其他方式經修飾或經改造以改變一或多種基因之表現以生成經改造細胞。

【0438】在一些實施例中，編碼具有可調控表現之一或多種耐受原性因子之轉基因插入細胞之預選基因座中。預選基因座可為安全港或靶基因座。安全港基因座之非限制性實例包括CCR5基因座、PPP1R12C基因座及CLYBL基因座、Rosa基因座。靶基因座之非限制性實例包括CXCR4基因座、白蛋白基因座、SHS231基因座、F3 (CD142)基因座、MICA基因座、MICB基因座、LRP1 (CD91)基因座、HMGB1基因座、ABO基因座、RHD基因座、FUT1基因座及KDM5D基因座。在一些實施例中，預選基因座係*TRAC*基因座。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因插入安全港或靶基因座(*例如*CCR5基因座、CXCR4基因座、PPP1R12C基因座、白蛋白基因座、SHS231基因座、CLYBL基因座、Rosa基因座、F3 (CD142)基因座、MICA基因座、MICB基因座、LRP1 (CD91)基因座、HMGB1基因座、ABO基因座、RHD基因座、FUT1基因座

及KDM5D基因座)中。在某些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因插入*B2M*基因座中。在某些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因插入*B2M*基因座中。在某些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因插入*TRAC*基因座中。在某些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因插入*TRB*基因座中。

【0439】在一些情況下，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因之表現受條件啟動子控制。在其他情況下，編碼一或多種耐受原性因子之轉基因之表現受可誘導啟動子控制。

【0440】在另一實施例中，本文所揭示之本揭示案係關於多能幹細胞(*例如*多能幹細胞及誘導性多能幹細胞(iPSC))、衍生自該等多能幹細胞之T細胞(*例如*低免疫T細胞)及原代T細胞，其具有一或多種MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現或可調控的缺乏表現且具有T細胞受體(TCR)複合物之可調控減少的表現或可調控的缺乏表現。在一些實施例中，細胞具有一或多種MHC I類抗原分子、MHC II類抗原分子及TCR複合物之可調控減少的表現或可調控的缺乏表現。

【0441】在一些實施例中，多能幹細胞(*例如*iPSC)、衍生自其之分化細胞(*例如*自其分化之T細胞、心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞及視網膜色素上皮細胞)及原代T細胞包括B2M基因之可調控基因

體修飾或可調控敲低。在一些實施例中，多能幹細胞(*例如*iPSC)、衍生自其之分化細胞(*例如*自其分化之T細胞、心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞及視網膜色素上皮細胞)及原代T細胞包括CIITA基因之可調控基因體修飾或可調控敲低。在一些實施例中，細胞(包括iPSC及衍生自該等多能幹細胞之分化細胞，例如但不限於T細胞、NK細胞、心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞及視網膜色素上皮細胞)係可調控之$B2M^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例

中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、

CIITA$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，多能幹細胞(*例如*ESC或iPSC)、自其分化之T細胞及原代T細胞包括TRAC基因之可調控基因體修飾或可調控

敲低。在一些實施例中，多能幹細胞(*例如*iPSC)、自其分化之T細胞及原代T細胞包括TRB基因之可調控基因體修飾或可調控敲低。在一些實施例中，多能幹細胞(*例如*iPSC)、自其分化之T細胞及原代T細胞包括一或多種選自由以下組成之群之可調控基因體修飾或可調控敲低：B2M、CIITA及TRAC基因。在一些實施例中，多能幹細胞(*例如*iPSC)、自其分化之T細胞及原代T細胞包括一或多種選自由以下組成之群之可調控基因體修飾或可調控敲低：B2M、CIITA及TRB基因。在一些實施例中，多能幹細胞(*例如*iPSC)、自其分化之T細胞及原代T細胞包括一或多種選自由以下組成之群之可調控基因體修飾或可調控敲低：B2M、CIITA、TRAC及TRB基因。在某些實施例中，細胞(包括iPSC、自其分化之T細胞及原代T細胞)係可調控之$B2M^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$、

*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{敲低}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$CIITA^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$B2M^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之$CIITA^{敲低}$、$TRAC^{敲低}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、$TRAC^{-/-}$。在一些實施例中，細胞

係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*CD47tg*。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一

些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR

之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之亦表現CAR之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{-/-}$、*TRAC*$^{-/-}$、*TRBC*$^{-/-}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRBC*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*B2M*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，細胞係可調控之*CIITA*^{敲低}、*TRAC*^{敲低}、*TRBC*^{敲低}、*CD47tg*細胞。在一些實施例中，所述經修飾細胞係多能幹細胞、誘導性多能幹細胞、自該等多能幹細胞及誘導性多能幹細胞分化之T細胞或原代T細胞。原代T細胞之非限制性實例包括CD3+ T細胞、CD4+ T細胞、CD8+

T細胞、幼稚T細胞、調控T (Treg)細胞、非調控T細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th9細胞、Th17細胞、T濾泡性輔助(Tfh)細胞、細胞毒性T淋巴球(CTL)、效應T (Teff)細胞、中央記憶T (Tcm)細胞、效應記憶T (Tem)細胞、表現CD45RA之效應記憶T細胞(TEMRA細胞)、組織駐留記憶(Trm)細胞、虛擬記憶T細胞、先天記憶T細胞、記憶幹細胞(Tsc)、γδ T細胞及T細胞之任何其他亞型。在一些實施例中，與野生型或對照細胞(包括未經改變或未經修飾之野生型細胞或對照細胞)相比，細胞經修飾或改造。在一些實施例中，野生型細胞或對照細胞係起始材料。在一些實施例中，起始材料以其他方式經修飾或經改造以改變一或多種基因之表現以生成經改造細胞。

【0442】本揭示案之細胞展現一或多種MHC I類抗原分子、MHC II類抗原分子及/或TCR複合物之可調控地減少的表現或可調控的缺乏表現。減少MHC I及/或MHC II表現可例如藉由以下中之一或多者來完成：(1)直接靶向多型性HLA對偶基因(HLA-A、HLA-B、HLA-C)及MHC-II基因；(2)移除B2M，其將防止所有MHC-I分子之表面輸送；(3)移除CIITA，其將防止所有MHC-II分子之表面輸送；及/或(4)缺失MHC增強體之對HLA表現至關重要之組分，例如LRC5、RFX5、RFXANK、RFXAP、IRF1、NF-Y (包括NFY-A、NFY-B、NFY-C)及CIITA。

【0443】在一些實施例中，藉由以下方式干擾HLA表現：靶向個別HLA (*例如*敲除、敲低或減少HLA-A、HLA-

B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DQ及/或HLA-DR之表現)、靶向HLA表現之轉錄調控劑(*例如*敲除或減少NLRC5、CIITA、RFX5、RFXAP、RFXANK、NFY-A、NFY-B、NFY-C及/或IRF-1之表現)、阻斷MHC I類分子之表面輸送(*例如*敲除或減少B2M及/或TAP1之表現)及/或用HLA剃刀靶向(參見例如WO2016183041)。

【0444】在一些實施例中，本文所揭示之細胞包括(但不限於多能幹細胞、誘導性多能幹細胞、衍生自該等幹細胞之分化細胞及原代T細胞)可調控地不表現對應於MHC-I及/或MHC-II之一或多種人類白血球抗原分子(*例如*HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DQ及/或HLA-DR)且因此表徵為低免疫原性。舉例而言，在某些實施例中，所揭示之多能幹細胞及誘導性多能幹細胞已經修飾使得幹細胞或自其製備之分化幹細胞可調控地不表現或可調控地展現以下MHC-I分子中之一或多者之減少的表現：HLA-A、HLA-B及HLA-C。在一些實施例中，HLA-A、HLA-B及HLA-C中之一或多者可能可調控地自細胞「敲除」。具有可調控敲除的HLA-A基因、HLA-B基因及/或HLA-C基因之細胞可能可調控地展現每一敲除基因之減少或消除的表現。在一些實施例中，HLA-A、HLA-B及HLA-C中之一或多者可在細胞中可調控地敲低或敲除。具有敲低的HLA-A基因、HLA-B基因及/或HLA-C基因之細胞可能可調控地展現每一敲低基因之減少或消除的表現。

【0445】在一些實施例中，藉由靶向HLA基因中之保

守區域允許同時缺失所有MHC I類對偶基因之引導RNA、shRNA、siRNA或miRNA鑑別為HLA剃刀。在一些實施例中，gRNA係CRISPR系統(例如可調控CRISPR系統，例如條件或可誘導CRISPR系統)之一部分。在替代實施例中，gRNA係TALEN系統(例如可調控TALEN系統，例如條件或可誘導TALEN系統)之一部分。在一些實施例中，shRNA、siRNA或mRNA係可調控RNAi系統(例如條件或可誘導RNAi系統)之一部分。在一些實施例中，靶向HLA中之所鑑別保守區域之HLA剃刀闡述於WO2016183041中。在一些實施例中，利用靶向所鑑別保守區域之多種HLA剃刀。通常應理解，靶向HLA中之保守區域之任何引導物、siRNA、shRNA或miRNA分子可用作HLA剃刀。

【0446】所提供方法可用於可調控失活或除去細胞(例如但不限於多能幹細胞、分化細胞及原代T細胞)中之MHC I類表現及/或MHC II類表現。在一些實施例中，亦使用利用稀切核酸內切酶(*例如*CRISPR/Cas、TALEN、鋅指核酸酶大範圍核酸酶及歸巢核酸內切酶系統)之可調控基因體編輯技術來減少或消除細胞中參與先天及/或適應性免疫反應之基因之表現(*例如*，藉由缺失參與先天及/或適應性免疫反應之基因之基因體DNA或藉由將基因體DNA插入該等基因中，使得影響基因表現)。在某些實施例中，使用可調控基因體編輯技術或其他基因調節技術在人類細胞中插入耐受誘導因子，使其及自其製備之分化細胞為低免疫原性細胞。因此，低免疫原性細胞具有減少或消除的

一或多種MHC I及MHC II表現。在一些實施例中，細胞在接受個體中為非免疫原性(*例如*不會誘導先天及/或適應性免疫反應)。

【0447】在一些實施例中，細胞包括可調控地增加CD47及一或多種選自由以下組成之群之因子的表現之修飾：DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。

【0448】在一些實施例中，細胞包含調控MHC I類分子、MHC II類分子或MHC I類及MHC II類分子之表現之一或多條靶多核苷酸序列之可調控基因體修飾或可調控敲低。在一些實施例中，使用可調控遺傳編輯系統來修飾一或多條靶多核苷酸序列。在一些實施例中，使用可調控RNAi系統來敲低一或多條靶多核苷酸序列之表現。在一些實施例中，靶向多核苷酸序列係選自包括以下之群之一或多者：B2M、CIITA及NLRC5。在一些實施例中，細胞包含B2M基因之可調控遺傳編輯修飾。在一些實施例中，細胞包含CIITA基因之可調控遺傳編輯修飾。在一些實施例中，細胞包含NLRC5基因之可調控遺傳編輯修飾。在一些實施例中，細胞包含B2M及CIITA基因之可調控遺傳編輯修飾。在一些實施例中，細胞包含B2M及NLRC5基因之可調控遺傳編輯修飾。在一些實施例中，細胞包含CIITA

及NLRC5基因之可調控遺傳編輯修飾。在多個實施例中，細胞包含B2M、CIITA及NLRC5基因之可調控遺傳編輯修飾。在一些實施例中，細胞包含靶向B2M基因之可調控RNAi系統。在一些實施例中，細胞包含靶向CIITA基因之可調控RNAi系統。在一些實施例中，細胞包含靶向NLRC5基因之可調控RNAi系統。在一些實施例中，細胞包含靶向B2M及CIITA基因之可調控RNAi系統。在一些實施例中，細胞包含靶向B2M及NLRC5基因之可調控RNAi系統。在一些實施例中，細胞包含靶向CIITA及NLRC5基因之可調控RNAi系統。在多個實施例中，細胞包含靶向B2M、CIITA及NLRC5基因之可調控RNAi系統。在某些實施例中，細胞之基因體已經改變以減少或缺失HLA表現之關鍵組分。在某些實施例中，細胞包含靶向HLA表現之關鍵組分之可調控RNAi系統。在一些實施例中，與野生型或對照細胞(包括未經改變或未經修飾之野生型細胞或對照細胞)相比，細胞經修飾或改造。在一些實施例中，野生型細胞或對照細胞係起始材料。在一些實施例中，起始材料以其他方式經修飾或經改造以改變一或多種基因之表現以生成經改造細胞。

【0449】在一些實施例中，本揭示案提供細胞(*例如*幹細胞、誘導性多能幹細胞、分化細胞(例如心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞或視網膜色素上皮細胞)、造血幹細胞、原代NK細胞、CAR-NK

細胞、原代T細胞或CAR-T細胞)或其群體，其包含基因體，其中基因已可調控地經編輯以缺失一段連續基因體DNA，由此減少或消除細胞或其群體中一或多種MHC I類分子之表面表現。在某些實施例中，本揭示案提供細胞(*例如*幹細胞、誘導性多能幹細胞、分化細胞(例如心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞或視網膜色素上皮細胞)、造血幹細胞、原代NK細胞、CAR-NK細胞、原代T細胞或CAR-T細胞)或其群體，其包含基因體，其中基因已可調控地經編輯以缺失一段連續基因體DNA，由此減少或消除細胞或其群體中一或多種MHC II類分子之表面表現。在多個實施例中，本揭示案提供細胞(*例如*幹細胞、誘導性多能幹細胞、分化細胞(例如心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、肝細胞、胰島細胞或視網膜色素上皮細胞)、造血幹細胞、原代NK細胞、CAR-NK細胞、原代T細胞或CAR-T細胞)或其群體，其包含基因體，其中一或多個基因已可調控地經編輯以缺失一段連續基因體DNA，由此減少或消除細胞或其群體中一或多種MHC I類及II類分子之表面表現。

【0450】在許多實施例中，一或多種MHC I分子及/或MHC II分子之表現係藉由靶向並缺失一段連續基因體DNA可調控地調節，由此減少或消除選自由以下組成之群之靶基因之表現：B2M、CIITA及NLRC5。在一些實施例中，

本文闡述經遺傳編輯之細胞(*例如*經修飾人類細胞)，其包含可調控外源CD47蛋白及可調控地失活或經修飾之CIITA基因序列、及在一些情況下可調控地失活或修飾B2M基因序列之其他基因修飾。在一些實施例中，本文闡述經遺傳編輯之細胞，其包含可調控外源CD47蛋白及可調控地失活或經修飾之CIITA基因序列、及在一些情況下可調控地失活或修飾NLRC5基因序列之其他基因修飾。在一些實施例中，本文闡述經遺傳編輯之細胞，其包含可調控外源CD47蛋白及可調控地失活或經修飾之B2M基因序列、及在一些情況下可調控地失活或修飾NLRC5基因序列之其他基因修飾。在一些實施例中，本文闡述經遺傳編輯之細胞，其包含可調控外源CD47蛋白及可調控地失活或經修飾之B2M基因序列、及在一些情況下可調控地失活或修飾CIITA基因序列及NLRC5基因序列之其他基因修飾。

【0451】本文提供展現一或多條靶向多核苷酸序列之修飾之細胞，該修飾可調控地調控以下中之任一者之表現：(a) MHC I抗原分子，(b) MHC II抗原分子，(c) TCR複合物，(d) MHC I及II抗原分子，及(e) MHC I及II抗原分子及TCR複合物。在某些實施例中，修飾包括可調控地增加CD47之表現。在一些實施例中，細胞包括外源或重組CD47多肽。在某些實施例中，修飾包括嵌合抗原受體之可調控表現。在一些實施例中，細胞包含外源或重組嵌合抗原受體多肽。

【0452】在一些實施例中，細胞包括一或多條靶向多

核苷酸序列之基因體修飾，該基因體修飾可調控地調控一或多種MHC I抗原分子、MHC II抗原分子及/或TCR複合物之表現。在一些實施例中，使用遺傳編輯系統可調控地修飾一或多條靶向多核苷酸序列。在一些實施例中，多核苷酸序列靶向一或多種選自由以下組成之群之基因：B2M、CIITA、TRAC及TRB。在某些實施例中，T細胞(*例如*自低免疫原性iPSC分化之T細胞及原代T細胞)之基因體已經改變以可調控地減少或缺失HLA及TCR表現之關鍵組分，例如HLA-A抗原、HLA-B抗原、HLA-C抗原、HLA-DP抗原、HLA-DQ抗原、HLA-DR抗原、TCR-α及TCR-β。

【0453】在一些實施例中，本揭示案提供細胞或其群體，其包含基因體，其中基因已可調控地經編輯以缺失一段連續基因體DNA，由此減少或消除細胞或其群體中一或多種MHC I類分子之表面表現。在某些實施例中，本揭示案提供細胞或其群體，其包含基因體，其中基因已可調控地經編輯以缺失一段連續基因體DNA，由此減少或消除細胞或其群體中一或多種MHC II類分子之表面表現。在某些實施例中，本揭示案提供細胞或其群體，其包含基因體，其中基因已可調控地經編輯以缺失一段連續基因體DNA，由此減少或消除細胞或其群體中TCR分子之表面表現。在多個實施例中，本揭示案提供細胞或其群體，其包含基因體，其中一或多種基因已可調控地經編輯以缺失一段連續基因體DNA，由此減少或消除細胞或其群體中一或多種MHC I類及II類分子及TCR複合物分子之表面表現。

【0454】在一些實施例中，本文所述之細胞及方法包括可調控地基因體編輯人類細胞以裂解CIITA基因序列以及可調控地編輯該等細胞之基因體以改變一或多條其他靶多核苷酸序列，例如(但不限於) B2M、TRAC及TRB。在一些實施例中，本文所述之細胞及方法包括可調控地基因體編輯人類細胞以裂解B2M基因序列以及可調控地編輯該等細胞之基因體以改變一或多條其他靶多核苷酸序列，例如(但不限於) CIITA、TRAC及TRB。在一些實施例中，本文所述之細胞及方法包括可調控地基因體編輯人類細胞以裂解TRAC基因序列以及可調控地編輯該等細胞之基因體以改變一或多條其他靶多核苷酸序列，例如(但不限於) B2M、CIITA及TRB。在一些實施例中，本文所述之細胞及方法包括可調控地基因體編輯人類細胞以裂解TRB基因序列以及可調控地編輯該等細胞之基因體以改變一或多條其他靶多核苷酸序列，例如(但不限於) B2M、CIITA及TRAC。

【0455】本文提供低免疫原性幹細胞，其包含i)相對於野生型幹細胞，HLA-A、HLA-B、HLA-C、CIITA、TCR-α及TCR-β之可調控減少的表現，其中可調控減少的表現係藉助基於RNA之組分、基於DNA之組分或基於蛋白質之組分，及ii)一組外源基因，其包含編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及編碼嵌合抗原受體(CAR)之第二可調控基因，其中第一及/或第二可調控基因插入細胞之至少一個對偶基因之特定基因座中。本文亦提供低免

疫原性原代T細胞(包括原代T細胞之任一亞型)，其包含i)相對於野生型原代T細胞，HLA-A、HLA-B、HLA-C、CIITA、TCR-α及TCR-β之可調控減少的表現，其中可調控減少的表現係藉助基於RNA之組分、基於DNA之組分或基於蛋白質之組分，及ii)一組外源基因，其包含編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及編碼嵌合抗原受體(CAR)之第二可調控基因，其中第一及/或第二可調控基因插入細胞之至少一個對偶基因之特定基因座中。本文進一步提供自低免疫原性誘導性多能幹細胞分化之低免疫原性T細胞，其包含i)相對於野生型原代T細胞，HLA-A、HLA-B、HLA-C、CIITA、TCR-α及TCR-β之可調控減少的表現，其中可調控減少的表現係藉助基於RNA之組分、基於DNA之組分或基於蛋白質之組分，及ii)一組外源基因，其包含編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及編碼嵌合抗原受體(CAR)之第二可調控基因，其中第一及/或第二可調控基因插入細胞之至少一個對偶基因之特定基因座中。

【0456】在一些實施例中，所述經改造細胞之群體在投與接受患者後逃避NK細胞介導之細胞毒性。在一些實施例中，經改造細胞之群體逃避一或多個NK細胞亞群之NK細胞介導之細胞毒性。在一些實施例中，經改造細胞之群體在投與接受患者後經保護免於NK細胞(包括不成熟及/或成熟NK細胞)之細胞溶解。在一些實施例中，經改造細胞之群體在投與接受患者後逃避巨噬細胞吞噬。在一些

實施例中，經改造細胞之群體在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之先天及/或適應性免疫反應。在一些實施例中，經改造細胞之群體逃避一或多個NK細胞亞群之NK細胞介導之細胞毒性，如藉由活體外分析或活體內分析所確定。在一些實施例中，經改造細胞之群體在投與接受患者後經保護免於NK細胞(包括不成熟及/或成熟NK細胞)之細胞溶解，如藉由活體外分析或活體內分析所確定。在一些實施例中，經改造細胞之群體在投與接受患者後逃避巨噬細胞吞噬，如藉由活體外分析或活體內分析所確定。在一些實施例中，經改造細胞之群體在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之先天及/或適應性免疫反應，如藉由活體外分析或活體內分析所確定。

【0457】在一些實施例中，本文所述之細胞包含安全開關。本文中所用之術語「安全開關」係指用於控制所關注基因或蛋白質之表現之系統，該所關注基因或蛋白質在下調或上調時例如經由宿主之免疫系統識別導致細胞清除或死亡。安全開關可經設計以在不良臨床事件之情形下由外源分子觸發。安全開關可藉由調控DNA、RNA及蛋白質水準上之表現來改造。安全開關包括允許因應不良事件來控制細胞活性之蛋白質或分子。在一個實施例中，安全開關係在無活性狀態下表現、且在由外部提供之選擇性劑活化安全開關時對表現該開關之細胞致命之「殺傷開關」。在一個實施例中，安全開關基因相對於構築體中之所關注基因係順式作用的。安全開關之活化導致細胞經由細胞凋

亡或壞死僅殺傷自身或殺傷自身及相鄰細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞(例如幹細胞、誘導性多能幹細胞、造血幹細胞、原代細胞或分化細胞，包括(但不限於)心臟細胞、心臟祖細胞、神經細胞、神經膠質祖細胞、內皮細胞、T細胞、B細胞、胰島細胞、視網膜色素上皮細胞、肝細胞、甲狀腺細胞、皮膚細胞、血球、漿細胞、血小板、腎細胞、上皮細胞、CAR-T細胞、NK細胞及/或CAR-NK細胞)包含安全開關。

【0458】在一些實施例中，安全開關包含抑制或阻斷CD47及SIRPα之相互作用之治療劑。在一些態樣中，CD47-SIRPα阻斷劑係中和、阻斷、拮抗或干擾CD47、SIRPα或二者之細胞表面表現之劑。在一些實施例中，CD47-SIRPα阻斷劑抑制或阻斷CD47、SIRPα或二者之相互作用。在一些實施例中，CD47-SIRPα阻斷劑(例如CD47-SIRPα阻斷劑、抑制劑、減少劑、拮抗劑、中和劑或干擾劑)包含選自包括以下之群之劑：結合CD47之抗體或其片段、結合CD47之雙特異性抗體、結合CD47之免疫細胞介素融合蛋白、含有CD47之融合蛋白、結合SIRPα之抗體或其片段、結合SIRPα之雙特異性抗體、結合SIRPα之免疫細胞介素融合蛋白、含有SIRPα之融合蛋白及其組合。

【0459】在一些實施例中，本文所述之細胞包含「自殺基因」(或「自殺開關」)。若免疫原性細胞以不期望之方式生長及分裂，則自殺基因可導致該等低免疫原性細胞死亡。自殺基因除去方法包括基因轉移載體中之自殺基

因，該基因轉移載體編碼僅在由特定化合物活化時引起細胞殺傷之蛋白質。自殺基因可編碼將無毒化合物選擇性轉化成高度毒性代謝物之酶。在一些實施例中，本文所述之細胞(例如幹細胞、誘導性多能幹細胞、造血幹細胞、原代細胞或分化細胞，包括(但不限於)心臟細胞、心臟祖細胞、神經細胞、神經膠質祖細胞、內皮細胞、T細胞、B細胞、胰島細胞、視網膜色素上皮細胞、肝細胞、甲狀腺細胞、皮膚細胞、血球、漿細胞、血小板、腎細胞、上皮細胞、CAR-T細胞、NK細胞及/或CAR-NK細胞)包含自殺基因。

【0460】在一些實施例中，所述經改造細胞之群體在投與接受個體後引發降低水準之免疫活化或無免疫活化。在一些實施例中，細胞在接受個體中引發降低水準之全身性TH1活化或無全身性TH1活化。在一些實施例中，細胞在接受個體中引發降低水準之外周血單核細胞(PBMC)免疫活化或無PBMC免疫活化。在一些實施例中，細胞在投與接受個體後引發針對細胞之降低水準之供體特異性IgG抗體或無供體特異性IgG抗體。在一些實施例中，細胞在接受個體中引發針對細胞之降低水準之IgM及IgG抗體產生或無IgM及IgG抗體產生。在一些實施例中，細胞在投與接受個體後引發細胞之降低水準之細胞毒性T細胞殺傷。

B. 性HIP細胞及用於條件性下調靶基因之方法

【0461】引入靶基因之可調控減少的表現改良使用低免疫原性細胞(HIP細胞)開發之細胞療法之安全性。在一些實施例中，靶基因之可調控減少的表現使得可避免自多能幹細胞分化細胞時之潛在困難。在一些實施例中，靶基因之可調控減少的表現包括B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD之可調控減少的表現，例如可調控敲除或敲低。一或多種靶基因之可調控減少的表現用於控制接受個體對植入低免疫原性細胞之先天及/或適應性免疫反應。

【0462】本文闡述用於減少靶基因表現之方法，其涉及以受控方式「關閉」靶基因表現之機制。亦闡述具有一或多種靶基因之可調控減少的表現之HIP細胞。在一些情形下，細胞可經誘導以敲除或敲低一或多種靶基因之表現。

【0463】在一些實施例中，引入接受個體之細胞之低免疫性係經由過表現免疫阻抑分子(包括低免疫性因子及補體抑制劑)伴隨抑制或遺傳破壞HLA-I及HLA-II基因座來達成。該等修飾遮掩細胞免於負責清除受感染、惡性或非自身細胞之接受者免疫系統之效應細胞，例如T細胞、B細胞、NK細胞及巨噬細胞。遮掩細胞免於免疫系統允許同種異體細胞在體內之存在及持久性。可在細胞中在蛋白質水準、mRNA水準或DNA水準上控制所述任一免疫阻抑分子之表現水準。類似地，可在細胞中在蛋白質水準、

mRNA水準或DNA水準上控制所述任一免疫信號傳導分子之表現水準。

【0464】在一些實施例中，使用所述任一可調控減少表現之方法(*例如*RNA水準、DNA水準及蛋白質水準方法)來降低細胞中靶蛋白之水準，使得靶蛋白之較低水準低於臨限值水準。在一些實施例中，細胞中靶蛋白之水準比臨限值表現水準降低約10倍、9倍、8倍、7倍、6倍、5倍、4倍、3倍、2倍、1倍或0.5倍。在一些實施例中，細胞中靶蛋白之水準比臨限值表現水準降低約10倍至5倍、10倍至3倍、9倍至1倍、8倍至1倍、7倍至0.5倍、6倍至1倍、5倍至0.5倍、4倍至0.5倍、3倍至0.5倍、2倍至0.5倍、或1倍至0.5倍。在一些實施例中，靶蛋白之臨限值表現水準係基於該因子在誘導性多能幹細胞中之表現來建立。在一些實施例中，靶蛋白表現之臨限值水準係基於靶蛋白在相應低免疫細胞(例如MHC I及MHC II敲除細胞或MHC I/MHC II/TCR敲除細胞)中之表現水準來建立。

1. 基於RNA之組分

【0465】靶基因可由shRNA、siRNA或miRNA靶向，由此導致編碼該等因子之轉錄物降解。shRNA、siRNA或miRNA可經外源提供或遺傳編碼以提供對抑制性RNA轉錄之控制。shRNA、siRNA或miRNA可退火成靶基因轉錄物，從而由RISC複合物降解。

【0466】在一些實施例中，用於下調靶基因表現之可

誘導RNA調控之方法包括(但不限於)條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA、條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)及條件或可誘導RNA靶向核酸酶。

【0467】在一些實施例中，該方法包括靶向靶基因RNA之shRNA、siRNA或miRNA。在一些情況下，shRNA、siRNA或miRNA之表現係由小分子或生物劑誘導。在一些情況下，shRNA、siRNA或miRNA之表現係由細胞條件誘導。

【0468】在一些實施例中，提供藉由獲得經分離細胞並引入構築體來控制哺乳動物細胞(*例如*人類細胞)之免疫原性之方法，該構築體含有可操作連接靶向靶基因之shRNA、siRNA或miRNA序列之條件或可誘導RNA聚合酶啟動子，該靶基因可操作連接至組成型啟動子，該組成型啟動子可操作連接至可控制可誘導RNA聚合酶啟動子之反式活化元件。在一些實施例中，構築體包括U6Tet啟動子、靶向靶基因之shRNA、siRNA或miRNA、組成型啟動子及因應四環素或其衍生物(*例如*去氧羥四環素)之Tet抑制元件。在其他情況下，shRNA、siRNA或miRNA消除靶基因之表現。在其他情況下，shRNA、siRNA或miRNA使靶基因之表現減少約99%或更小，例如99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、90%、85%或更小。本文所述組成型啟動子、條件啟動子、可誘導啟動子、靶基因及細胞中之任一者適用於該方法。

【0469】在許多實施例中，經改造細胞表現靶向靶基因之可誘導shRNA、siRNA或miRNA。在一些實施例中，RNA聚合酶、shRNA、siRNA或miRNA之表現處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。在一些實施例中，使細胞與活化shRNA、siRNA或miRNA表現之因子(例如但不限於配位體、分子、肽、小分子或生物劑)接觸來降解靶基因。在一些實施例中，RNA聚合酶、shRNA、siRNA或miRNA之表現處於適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關之控制下。在一些實施例中，RNA聚合酶、shRNA、siRNA或miRNA之表現處於條件啟動子之控制下，該條件啟動子係例如細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。

【0470】在一些實施例中，提供控制哺乳動物細胞(*例如*人類細胞)之免疫原性之方法，其係藉由獲得經分離細胞並將以下引入細胞中來實施：(i)包含條件或可誘導RNA聚合酶啟動子之第一構築體，該啟動子可操作連接至靶向靶基因之shRNA、siRNA或miRNA，使得shRNA、siRNA或miRNA可操作連接至對應於條件或可誘導RNA聚合酶啟動子之反式活化元件。

【0471】在一些實施例中，該方法包括用於靶向靶基因之啟動子以下調其轉錄之CRISPR干擾系統(CRISPRi)。在一些情況下，靶向靶基因之CRISPRi及/或gRNA之表現

係由小分子或生物劑誘導。在一些情況下，CRISPRi及/或gRNA之表現係由細胞條件誘導。CRISPRi方法之詳細描述參見例如Engreitz等人，Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11:a035386，其全文皆以引用方式併入本文中。在一些實施例中，CRISPRi系統利用受組成型啟動子控制之dCas9-抑制子融合蛋白及在條件或可誘導啟動子之控制下特異性針對靶基因之gRNA。

【0472】在一些實施例中，dCas9-抑制子融合蛋白及/或gRNA之表現處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。在一些實施例中，使細胞與活化dCas9-抑制子融合蛋白及/或gRNA表現之因子(例如但不限於配位體、分子、肽、小分子或生物劑)接觸來降解靶基因。在一些實施例中，dCas9-抑制子融合蛋白及/或gRNA之表現處於適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關之控制下。在一些實施例中，dCas9-抑制子融合蛋白及/或gRNA之表現處於條件啟動子之控制下，該條件啟動子係例如細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。

【0473】在一些實施例中，基於CRISPR之方法包括靶向對應於靶基因(例如但不限於Cas13、Cas7或Csx1)之mRNA序列之核酸酶。在一些情況下，靶向靶基因之核酸酶及/或gRNA之表現係由小分子或生物劑誘導。在一些情

況下，核酸酶及/或gRNA之表現係由細胞條件誘導。

【0474】在一些實施例中，核酸酶及/或gRNA之表現處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。在一些實施例中，使細胞與活化核酸酶及/或gRNA表現之因子(例如但不限於配位體、分子、肽、小分子或生物劑)接觸來降解靶基因。在一些實施例中，核酸酶及/或gRNA之表現處於適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關之控制下。在一些實施例中，核酸酶及/或gRNA之表現處於條件啟動子之控制下，該條件啟動子係例如細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。

【0475】在一些實施例中，提供控制哺乳動物細胞(*例如*人類細胞)之免疫原性之方法，其係藉由獲得經分離細胞並將以下引入細胞中來實施：(i)包含組成型啟動子之第一構築體，該啟動子可操作連接至編碼Cas13a核酸酶、其變異體或其融合蛋白之基因；及(iii)包含條件或可誘導RNA聚合酶啟動子之第二構築體，該啟動子可操作連接至靶向靶基因之gRNA序列，使得gRNA序列可操作連接至對應於條件或可誘導RNA聚合酶啟動子之反式活化元件。

【0476】在一些實施例中，可用於靶基因之RNA水準控制之可誘導表現系統包括(但不限於)配位體可誘導轉錄因子系統、小分子可誘導系統、生物劑可誘導系統、受體介導之表現控制系統、適配體介導之多腺苷酸化調節劑

(*參見*，例如WO 2017/083747及WO 2021/041924，該等內容之全文皆以引用方式併入本文中)及配位體調控之核糖開關。在一些實施例中，可誘導表現系統包括四環素控制操作系統、基於合成Notch之(SynNotch)系統(*參見*，例如Morsut等人，Cell, 2016, 164:780-791及Yang等人，Commun Biol, 2020, 3:116)及藉由所得前mRNA之配位體(*例如*適配體、肽或小分子)介導之選擇式剪接來調控靶基因表現之核糖開關。有用的核糖開關包含感測配位體之存在並改變靶基因剪接之感測區及效應區。核糖開關gRNA之詳細描述及實例參見例如US 9,228,207；US 9,993,491；及US 10,421,989；且參見Seeliger等人，PLoS One, 2012, 7(1):e29266；該等內容之全文皆以引用方式併入本文中。

【0477】在一些實施例中，可用於靶基因之RNA水準控制之條件表現系統包括(但不限於)處於條件啟動子控制下之方法，該等條件啟動子包括(但不限於)細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【0478】在一些實施例中，基於RNA之組分使經改造細胞中靶基因(例如B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD)之水準比臨限值表現水準降低約10倍、9倍、8倍、7倍、6倍、5倍、4倍、3倍、2倍、1倍或0.5倍。在一些實施例中，經改造細胞中CD47之水準比臨限值表現水準降低約10倍至5倍、10倍至3倍、9倍至1倍、8倍至1倍、7倍至0.5倍、6倍至1倍、5倍至0.5倍、4倍至0.5倍、3倍至

0.5倍、2倍至0.5倍、或1倍至0.5倍。在一些情況下，B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD表現之臨限值水準係基於誘導性多能幹細胞中B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD之內源表現來建立。在一些情況下，B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD表現之臨限值水準係基於野生型或未經修飾之細胞中B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD之內源表現來建立。

2. 基於DNA之組分

【0479】經由採用條件或可誘導啟動子之靶基因之轉錄調控向細胞提供經由添加或移除生物劑或小分子(例如但不限於去氧羥四環素)或經由改變細胞條件打開或關閉基因表現之能力。經由靶向核酸酶活性之遺傳破壞可消除靶基因之表現。

【0480】在一些實施例中，用於條件或可誘導DNA調控之方法包括(但不限於)使用細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子、分化誘導之啟動子、可誘導啟動子、可控核糖開關及使用條件或可誘導核酸酶(*例如*，條件或可誘導CRISPR、條件或可誘導TALEN、條件或可誘導鋅指核酸酶、條件或可誘導歸巢核酸內切酶、條件或可誘導大範圍核酸酶及諸如此類)之敲除來靶向一或多種靶基因之DNA序列。在一些實施例中，條件或可誘導核酸酶包含核酸酶，使得其表現受小分子存

在之控制。在一些實施例中，條件或可誘導核酸酶包含核酸酶，使得核酸酶RNA或蛋白質至細胞之遞送受小分子存在之控制。在一些實施例中，核酸酶之表現係由小分子或生物劑誘導。在一些實施例中，Cas核酸酶及/或引導RNA(gRNA)之表現係由小分子或生物劑誘導。在一些情況下，Cas核酸酶及/或gRNA之表現係由細胞條件誘導。

【0481】在一些實施例中，用於可誘導表現之方法包括(但不限於)配位體可誘導轉錄因子系統(*例如*四環素控制操作系統)、受體介導之表現系統控制(*例如*SynNotch系統)及用於控制mRNA或gRNA活性之配位體調控之核糖開關系統。可誘導表現方法之詳細描述參見例如Kallunki等人，Cells, 2019, 796 (doi:10.3390/cells8080796)，其全文皆以引用方式併入本文中。

【0482】本文所述組成型啟動子、條件啟動子、可誘導啟動子、靶基因及細胞中之任一者適用於該方法。

【0483】在一些實施例中，本揭示案提供產生幹細胞(*例如*低免疫原性多能幹細胞或低免疫原性誘導性多能幹細胞)或其分化細胞之方法，該幹細胞或其分化細胞已經修飾以條件性敲除或敲低選自由以下組成之群之靶基因中之任一者：B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及RHD。

【0484】在一些實施例中，可用於靶基因之DNA水準控制之可誘導表現系統包括(但不限於)配位體可誘導轉錄因子系統、小分子可誘導系統、生物劑可誘導系統、受體介導之表現控制系統、適配體介導之多腺苷酸化調節劑

(參見例如WO 2017/083747及WO 2021/041924，該等內容之全文皆以引用方式併入本文中)及配位體調控之核糖開關。在一些實施例中，可誘導表現系統包括四環素控制操作系統、基於合成Notch之(SynNotch)系統(參見例如Morsut等人，Cell, 2016, 164:780-791及Yang等人，Commun Biol, 2020, 3:116)及藉由所得前mRNA之配位體(*例如*適配體、肽或小分子)介導之選擇式剪接來調控靶基因表現之核糖開關。有用的核糖開關包含感測配位體之存在並改變靶基因剪接之感測區及效應區。核糖開關gRNA之詳細描述及實例參見例如US 9,228,207；US 9,993,491；及US 10,421,989；且參見Seeliger等人，PLoS One, 2012, 7(1):e29266；該等內容之全文皆以引用方式併入本文中。

【0485】在一些實施例中，可用於靶基因之DNA水準控制之條件表現系統包括(但不限於)處於條件啟動子控制下之方法，該等條件啟動子包括(但不限於)細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【0486】在一些實施例中，基於DNA之組分使經改造細胞中靶基因(例如B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD)之水準比臨限值表現水準降低約10倍、9倍、8倍、7倍、6倍、5倍、4倍、3倍、2倍、1倍或0.5倍。在一些實施例中，經改造細胞中CD47之水準比臨限值表現水準降低約10倍至5倍、10倍至3倍、9倍至1倍、8倍至1倍、7倍至0.5倍、6倍至1倍、5倍至0.5倍、4倍至0.5倍、3倍至

0.5倍、2倍至0.5倍、或1倍至0.5倍。在一些情況下，B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD表現之臨限值水準係基於誘導性多能幹細胞中B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD之內源表現來建立。在一些情況下，B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD表現之臨限值水準係基於野生型或未經修飾之細胞中B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD之內源表現來建立。

3. 基於蛋白質之組分

【0487】在一些實施例中，靶蛋白之調控降解係藉由允許將靶蛋白招募至內源蛋白周轉機構之基於降解子之方法來建立。用於靶向蛋白質降解之機制包括(但不限於)招募至E3連接酶用於泛素化及隨後蛋白酶體降解、直接招募至蛋白酶體及招募至溶酶體。

【0488】在一些實施例中，藉由降解子進行可誘導蛋白質降解之方法包括(但不限於)使用SMASH標籤之配位體誘導之降解(LID)、使用Shield-1之配位體誘導之降解、使用生長素之配位體誘導之降解、使用雷帕黴素之配位體誘導之降解、肽降解子(*例如*基於IKZF3之降解子)及蛋白水解靶向嵌合體(PROTAC)。在配位體誘導之降解方法之一些實施例中，降解子標籤保持無活性構形，但在結合特定分子(例如但不限於Shield-1分子)時經誘導以採取能夠由蛋白酶體識別之構形。參見例如Roth等人，Cellular

Molecular Life Sciences, 2019, 76(14), 2761-2777，其全文皆以引用方式併入本文中。SMASH降解子技術之詳細描述可參見Hannah及Zhou, Nat Chem Biol, 2015, 11:637-638及Chung等人，Nat Chem Biol, 2015, 11:713-720，其全文皆以引用方式併入本文中。LID降解子技術之詳細描述可參見Bonger等人，Nat Chem Biol, 2011, 7(8):531-7，其全文皆以引用方式併入本文中。

【0489】在一些實施例中，提供藉由獲得經分離細胞並引入構築體來控制哺乳動物細胞(*例如*人類細胞)之免疫原性之方法，該構築體包含可操作連接至針對靶蛋白(例如B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD)之肽蛋白水解靶向嵌合體(PROTAC)元件之條件或可誘導啟動子。

【0490】在肽降解子之一些實施例中，使用將小分子介導之招募賦予E3連接酶之肽標籤。在一些實施例中，肽標籤包含以免疫調節藥物(IMiD)依賴性方式招募至E3連接酶受體(CRBN)之淋巴限制性轉錄因子IKZF3，如Koduri等人，Proc Natl Acad Sci, 2019, 116(7), 2539-2544中所述，該文獻之全文皆以引用方式併入本文中。在某些實施例中，降解子能夠靶向用於降解之靶蛋白(*例如*經由泛素化路徑)，從而誘導蛋白質降解，或降解蛋白質。

【0491】在PROTAC之一些實施例中，使用雙功能分子將靶蛋白招募至細胞之蛋白質降解機構。在一些實施例中，雙功能分子以高親和力結合至靶蛋白之天然或野生型

序列。在一些實施例中，雙功能分子包含小分子或生物劑(*例如*抗體或其片段)。參見例如Burslem等人，Cell Chemical Biology, 2018, 25, 67-77及Roth等人，Cellular Molecular Life Sciences, 2019, 76(14), 2761-2777，其全文皆以引用方式併入本文中。

【0492】在雙功能抗體之一些實施例中，抗體靶向靶蛋白及導致內化及降解之第二內源受體。一或多種靶蛋白之可控表現可藉助雙功能抗體(*例如*化學再程式化雙功能抗體)、藉由降解子之可誘導蛋白質降解、可誘導RNA調控、可誘導DNA調控及可誘導表現方法來提供。參見例如Natsume及Kanemaki, Annu Rev Genet, 2017, 51, 82-102；Burslem及Crews, Chem Rev, 2017, 117, 11269-11301；Banik等人，ChemRxiv, 2019；其全文皆以引用方式併入本文中。在一些實施例中，使表現靶蛋白之細胞與結合細胞之抗體接觸用於降解。

【0493】在一些實施例中，可誘導降解子元件選自由以下組成之群：配位體可誘導降解子元件，例如小分子輔助關閉(SMASH)降解子元件、Shield-1反應性降解子元件、生長素反應性降解子元件及雷帕黴素反應性降解子元件；肽降解子元件；及肽蛋白水解靶向嵌合體(PROTAC)元件。在有用實施例中，配位體可誘導降解子元件係小分子輔助關閉(SMASH)降解子元件且用於控制免疫原性之外源因子係阿舒瑞韋(asunaprevir)。在一些實施例中，靶基因選自由以下組成之群：B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、

TRB及RHD。

【0494】在一些實施例中，用於條件或可誘導蛋白質調控之方法處於細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子、分化誘導之啟動子、可誘導啟動子或可控核糖開關之控制下。在一些實施例中，條件或可誘導降解子之表現受小分子或生物劑存在之控制。在一些情況下，條件或可誘導降解子之表現受細胞條件之控制。

【0495】在一些實施例中，用於可誘導表現之方法包括(但不限於)配位體可誘導轉錄因子系統(*例如*四環素控制操作系統)、受體介導之表現系統控制(*例如*SynNotch系統)及用於控制mRNA或gRNA活性之配位體調控之核糖開關系統。可誘導表現方法之詳細描述參見例如Kallunki等人，Cells, 2019, 796 (doi:10.3390/cells8080796)，其全文皆以引用方式併入本文中。

【0496】本文所述組成型啟動子、條件啟動子、可誘導啟動子、靶基因及細胞中之任一者適用於該方法。

【0497】在一些實施例中，本揭示案提供產生幹細胞(*例如*低免疫原性多能幹細胞或低免疫原性誘導性多能幹細胞)或其分化細胞之方法，該幹細胞或其分化細胞已經修飾以條件性降解選自由以下組成之群之靶蛋白中之任一者：B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及RHD。

【0498】在一些實施例中，可用於靶基因之蛋白質水準控制之可誘導表現系統包括(但不限於)配位體可誘導轉錄因子系統、小分子可誘導系統、生物劑可誘導系統、受

體介導之表現控制系統、適配體介導之多腺苷酸化調節劑(參見例如WO 2017/083747及WO 2021/041924，該等內容之全文皆以引用方式併入本文中)及配位體調控之核糖開關。在一些實施例中，可誘導表現系統包括四環素控制操作系統、基於合成Notch之(SynNotch)系統(參見例如Morsut等人，Cell, 2016, 164:780-791及Yang等人，Commun Biol, 2020, 3:116)及藉由所得前mRNA之配位體(*例如*適配體、肽或小分子)介導之選擇式剪接來調控靶基因表現之核糖開關。有用的核糖開關包含感測配位體之存在並改變靶基因剪接之感測區及效應區。核糖開關gRNA之詳細描述及實例參見例如US 9,228,207；US 9,993,491；及US 10,421,989；且參見Seeliger等人，PLoS One, 2012, 7(1):e29266；該等內容之全文皆以引用方式併入本文中。

【0499】在一些實施例中，可用於靶基因之蛋白質水準控制之條件表現系統包括(但不限於)處於條件啟動子控制下之方法，該等條件啟動子包括(但不限於)細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【0500】在一些實施例中，基於蛋白質之組分使經改造細胞中靶蛋白(例如B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD)之水準比臨限值表現水準降低約10倍、9倍、8倍、7倍、6倍、5倍、4倍、3倍、2倍、1倍或0.5倍。在一些實施例中，經改造細胞中CD47之水準比臨限值表現水準降低約10倍至5倍、10倍至3倍、9倍至1倍、8

倍至1倍、7倍至0.5倍、6倍至1倍、5倍至0.5倍、4倍至0.5倍、3倍至0.5倍、2倍至0.5倍、或1倍至0.5倍。在一些情況下，B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD蛋白之臨限值水準係基於誘導性多能幹細胞中B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD之內源蛋白來建立。在一些情況下，B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD表現之臨限值水準係基於野生型或未經修飾之細胞中B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD之內源表現來建立。

C. 條件性HIP細胞及用於條件性上調轉基因之方法

【0501】引入轉基因之可調控過表現改良使用低免疫原性細胞(HIP細胞)開發之細胞療法之安全性。本文所述HIP細胞之特性係一或多種免疫調控(免疫阻抑)因子之可調控表現。在一些實施例中，免疫阻抑因子(在本文中亦稱為「低免疫性因子」)包括(但不限於) CD47、CD24、CD200、HLA-G、HLA-E、HLA-C、HLA-E重鏈、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FASL、Serpinb9、CCl21及Mfge8。在某些實施例中，免疫阻抑因子係CD47。免疫阻抑因子之可調控或可誘導表現用於控制接受個體對植入低免疫原性細胞之先天及/或適應性免疫反應。

【0502】本文闡述以可控方式表現免疫信號傳導因子以增加該因子之表現來改變細胞之低免疫原性的方法。

【0503】一或多種免疫阻抑因子之可控表現可藉助使用降解子之可誘導配位體穩定系統、可誘導RNA上調系統(*例如*可誘導CRISPR活化)及可誘導DNA上調系統來提供。在一些實施例中，可誘導DNA上調系統包括可誘導CRISPR活化(CRISPRa)、組織特異性啟動子、可誘導啟動子及核糖開關。

【0504】CRISPRa方法之詳細描述參見例如Engreitz等人，Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11:a035386，其全文皆以引用方式併入本文中。可誘導核糖開關之詳細描述及實例參見例如US 9,228,207；US 9,993,491；及US 10,421,989；且參見Seeliger等人，PLoS One, 2012, 7(1):e29266；該等內容之全文皆以引用方式併入本文中。

【0505】本文所述組成型啟動子、條件啟動子、可誘導啟動子、靶基因及細胞中之任一者適用於該方法。

【0506】在一些實施例中，經改造細胞包含含有編碼一或多種耐受原性因子之條件或可誘導轉基因之外源多核苷酸。在一些實施例中，CD47之表現處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。在一些實施例中，使細胞與活化CD47表現之因子(例如但不限於配位體、分子、肽、小分子或生物劑)接觸。在一些實施例中，CD47之表現處於適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關之控制下。在一些實施例中，CD47之表現處於條件啟動子之控制下，該

條件啟動子係例如細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。

【0507】在一些實施例中，提供控制哺乳動物細胞(*例如*人類細胞)之免疫原性之方法，其係藉由獲得經分離細胞並將以下引入細胞中來實施：(i)包含編碼一或多種耐受原性因子之條件或可誘導轉基因之第一構築體。

D. 調控元件

【0508】啟動子可為任何天然或已知啟動子之衍生物或經修飾變異體，包括天然或已知啟動子之插入及缺失及其組合或排列。亦可使用嵌合啟動子，其包含來自本文所述之兩種或更多種不同啟動子之序列元件。在任一情形下，可容易地測試任一啟動子在本文所述細胞中之有效性。

【0509】對於多種宿主細胞，多種類型之適當表現載體及適宜調控序列為此項技術中已知。通常，一或多條調控核苷酸序列可包括(但不限於)啟動子序列、前導序列或信號序列、核糖體結合位點、轉錄起始及終止序列、轉譯起始及終止序列、多腺苷酸化位點、Kozak一致序列及增強子或活化劑序列。

1. 組成型啟動子

【0510】此項技術中已知之任一組成型或遍在啟動子可用於本揭示案中。組成型或遍在啟動子之實例包括例如

肌動蛋白啟動子(*例如*ACTB啟動子)、白蛋白啟動子、桿狀病毒IE1啟動子、β-肌動蛋白啟動子、連接至衍生自巨細胞病毒(CMV)立即早期(IE)啟動子(CAG啟動子)之增強子之β-肌動蛋白啟動子、CaM-激酶啟動子、CMV-HSV胸苷激酶啟動子、膠原1A1啟動子(Sokolov等人，1995；Breault等人，1997)、膠原1A2啟動子(Akai等人，1999；Antoniv等人，2001)、二氫葉酸還原酶啟動子、延伸因子1α (EF1α)啟動子、疱疹胸苷激酶啟動子(Wagner等人，1981)、HPRT啟動子、莫洛尼鼠類白血病病毒(Moloney murine leukemia virus)長末端重複區域(MMLV LTR)、磷酸甘油酯激酶1 (PGK)啟動子、腺病毒(Ad)E1A或主要晚期啟動子(MLP)基因之啟動子、RNA聚合酶pol I、pol II、pol III、U6或HI之啟動子、微管蛋白啟動子、泛素(UbC)啟動子、波形蛋白啟動子、病毒啟動子(*例如*禽肉瘤病毒、牛乳頭瘤病毒、巨細胞病毒(CMV) (Boshart等人，Cell, 41:521-530 (1985)、最小CMV啟動子(Gossen及Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89: 5547-5551)、雞痘病毒、B型肝炎病毒、多瘤病毒、反轉錄病毒、反轉錄病毒勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus，RSV) LTR啟動子、猿猴病毒40 (SV40))。

2. 可誘導啟動子及元件

【0511】此項技術中已知之任一可誘導啟動子可用於本揭示案中。術語「可誘導啟動子」係指因應內源或外源

刺激物(例如化學化合物(化學誘導劑))之存在或因應環境、激素、化學及/或發育信號選擇性表現編碼序列或功能性RNA之啟動子。可誘導或調控啟動子包括例如由激素、類固醇、生長因子、細胞介素、細胞生長抑制劑、照射、小分子、金屬、熱休克、光、四環素、干擾素、前藥、適配體等誘導或調控之啟動子。可調控啟動子之實例闡述於Goverdhana等人，Mol Ther, 12: 189-211, 2005；Agha- Mohammadi及Lotze, J Clin Invest, 105: 1177-1183；Mullick等人，BMC Biotech, 6:43, 2006；及US20210155667中，該等文獻中每一者之全文皆併入本文中。

【0512】可誘導啟動子之實例包括例如，*小分子或配位體反應性啟動子*，包括例如離層酸(ABA)系統(Liang等人，Sci Signal. 2011年3月15日;4(164):rs2)、香豆黴素(coumermycin)反應性啟動子(Zhao等人，Hum Gene Ther. 2003年11月20日;14(17):1619-29)、cumate調控之啟動子、地塞米松(dexamethasone，Dex)可誘導小鼠乳瘤病毒(MMTV)啟動子、去氧羥四環素可誘導啟動子(*例如*tre)(Bohl等人(1998) Blood 92(5), 1512-7)、蛻皮激素昆蟲啟動子(No等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996))、GAL1-GAL10啟動子、異丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)調控之啟動子、乳糖誘導之啟動子、美服培酮(mifepristone)反應性啟動子(*例如*GAL4-E1b啟動子)、小鼠乳房白血病病毒啟動子、丙酮酸激酶啟動子、雷帕黴素可誘導啟動子(Magari等人，J Clin. Invest., 100:2865-2872

(1997)、RU486可誘導系統(Wang等人，Nat. Biotech., 15:239-243 (1997)及Wang等人，Gene Ther., 4:432-441 (1997))、四環素調控之啟動子(例如四環素可抑制系統(Gossen等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992))或四環素可誘導系統[Gossen等人，Science, 268:1766-1769 (1995)；亦參見Harvey等人，Curr. Opin. Chem. Biol, 2:512-518 (1998)；亦參見US20210155667，所有文獻之全文皆以引用方式併入本文中])；*酒精調控之啟動子；環境/應激誘導之啟動子*，包括例如熱休克反應啟動子(*例如*熱休克70啟動子)、低氧驅動之啟動子、IL-8啟動子、干擾素反應性啟動子、NF-Kb反應性啟動子、pH調控之啟動子；*光反應性啟動子*，包括例如生動(VVD)系統、光可活化(PA)-Tet-OFF/ON系統；*金屬反應性啟動子*，包括例如金屬硫蛋白可誘導啟動子(*例如*銅可誘導ACE1、鋅可誘導綿羊金屬硫蛋白(MT)啟動子)；*發病機制調控之啟動子*，包括例如由柳酸、乙烯或苯并噻二唑(BTH)誘導之啟動子)；*RNA聚合酶可誘導啟動子*，包括例如T3 RNA聚合酶啟動子、T7聚合酶啟動子系統(*參見例如*WO 98/10088，其全文皆以引用方式併入本文中)；及*類固醇激素可誘導啟動子*，包括例如包含激素反應元件之啟動子，該激素反應元件使啟動子對激素受體之配位體有反應，其中激素受體包括例如雌激素、助孕酮及糖皮質素受體，且其中配位體包括生理配位體(例如雌激素、助孕酮或皮質醇)及非生理配位體(例如他莫昔芬(tamoxifen)、地

塞米松)。

【0513】在一些實施例中，可誘導靶基因調控係藉助可誘導CRISPR活化(CRISPRa)，包括例如融合至招募活化肽(*例如*SunTag)之支架之dCas9、融合至一系列活化結構域(*例如*dCas9-VPR)之dCas9、融合至活化劑之dCas9及招募其他活化劑(*例如*SAM)之帶標籤之gRNA。CRISPRa方法之詳細描述參見例如Engreitz等人，Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11:a035386。

【0514】在一些實施例中，可誘導靶基因調控係藉助可誘導核糖開關/適配體。如本文所用之術語「適配體」係指特異性結合至配位體之RNA多核苷酸。術語「配位體」係指適配體特異性結合之分子。基因調控盒係指在納入靶基因之DNA中時藉由所得前mRNA之適配體/配位體介導之選擇式剪接向細胞提供調控靶基因表現之能力的重組DNA構築體。核糖開關含有感測區(*例如*適配體)及效應區，其一起負責感測小分子配位體之存在且改變替代外顯子之剪接。在一個實施例中，靶基因之表現在適配體配位體存在時增加且在配位體不存在時減少。可誘導核糖開關之詳細描述及實例參見例如US 9,228,207；US 9,993,491；及US 10,421,989；且參見Seeliger等人，PLoS One, 2012, 7(1):e29266。

【0515】在一些實施例中，可誘導靶基因調控係藉助調控融合蛋白。真核細胞中之基因表現可使用受操縱子控制之強啟動子嚴密調控，該操縱子進而由調控融合蛋白

(RFP)調控。RFP基本上係由轉錄阻斷結構域及調控其活性之配位體結合結構域組成。在配位體結合結構域之同族配位體存在下，RFP結合操縱子，由此防止GOI轉錄。當同族配位體退出時，RFP去穩定且進行所關注核苷酸序列之轉錄。

【0516】在一些實施例中，可誘導靶基因調控係藉助降解子。在一些實施例中，降解子元件選自由以下組成之群：配位體可誘導降解子元件、肽降解子元件及肽蛋白水解靶向嵌合體(PROTAC)元件。在一些實施例中，配位體可誘導降解子元件選自小分子輔助關閉(SMASH)降解子元件、Shield-1反應性降解子元件、生長素反應性降解子元件及雷帕黴素反應性降解子元件。在某些實施例中，配位體可誘導降解子元件係小分子輔助關閉(SMASH)降解子元件且外源因子係阿舒瑞韋。在靶基因之可調控上調之情形下，降解子元件可為如Tan等人，Gene Regulation: Methods，第9卷，增刊1, S123, 2004年5月01日中所述之降解子系統，其中含有ZFP TF之降解子可與可調控開關(例如助孕酮受體配位體結合結構域)組合，從而引起靶基因之美服培酮依賴性上調。

3. 細胞週期特異性啟動子

【0517】在一些實施例中，條件靶基因調控係藉助細胞週期特異性啟動子。細胞週期時期特異性表現控制元件可選自細胞週期特異性啟動子及以細胞週期特異性方式影

響轉錄或轉譯控制之其他元件。倘若表現控制元件係啟動子，則啟動子之選擇將取決於所選用於研究之細胞週期之時期。

【0518】此項技術中已知之任一細胞週期特異性啟動子可用於本揭示案中。細胞週期特異性啟動子之實例包括例如細胞週期蛋白B1啟動子(Cogswell等人，Mol. Cell Biol., (1995), 15(5), 2782-90；Hwang等人，J. Biol. Chem., (1995), 270(47), 2841 9-24；Piaggio等人，Exp. Cell Res., (1995), 21 6(2), 396-402)、Cdc25B啟動子(Korner等人，J. Biol. Chem., (2001), 276(1 3), 9662-9)；細胞週期蛋白A2啟動子(Henglein等人，Proc.Nat.Acad.Sci.USA, (1994), 91 (12), 5490-4；Zwicker等人，Embo J., (1995), 14(1 8), 451 4-22)、Cdc2啟動子(Tommasi及Pfeifer, Mol. Cell Biol., (1995), 15(12), 6901 -1 3；Zwicker等人，Embo J (1995), 14(1 8), 4514-22)、Cdc25C啟動子(Korner及Muller, J. Biol. Chem., (2000), 275(25), 1 8676-81；Korner等人，Nucl. Acids Res., (1997), 25(24), 4933-9)、細胞週期蛋白E啟動子(Botz等人，Mol. Cell Biol., (1996), 1 6(7), 3401 -9；Korner及Muller, J. Biol. Chem., (2000), 275(25), 1 8676-81)、Cdc6啟動子(Hateboer等人，Mol. Cell Biol., (1998), 1 8(11), 6679-97；Yan等人，Proc.Nat.Acad.Sci.USA, (1998), 95(7), 3603-8)、DHFR啟動子(Shimada等人，J. Biol. Chem., (1986), 261 (3), 1 445-52；Shimada及Nienhuis, J. Biol. Chem., (1985), 260(4), 2468-74)、組蛋白

啟動子(van Wijnen等人，Proc.Nat.Acad.Sci.USA, (1994), 91, 1 2882-1 2886)。

【0519】在一些實施例中，細胞週期特異性IRES元件亦用於本揭示案中。細胞週期特異性IRES元件之實例包括例如G2-IRES (Cornelis等人，Mol. Cell, (2000), 5(4), 597-605)；HCV IRES (Honda等人，Gastroenterology, (2000), 1 1 8, 1 52-1 62)；ODC IRES (Pyronet等人，Mol. Cell, (2000), 5, 607-61 6)；c-myc IRES (Pyronnet等人，Mol. Cell, (2000), 5(4), 607-1 6)及p58 PITSLRE IRES (Cornelis等人，Mol. Cell, (2000), 5(4), 597-605)。

4. 組織及譜系特異性啟動子

【0520】在一些實施例中，啟動子係空間限制性啟動子(*即*細胞類型特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子等)，使得在多細胞生物體中，啟動子在特定細胞亞組中係有活性的(*即*「ON」)。空間限制性啟動子亦可稱為增強子、轉錄控制元件、控制序列等。可使用任一方便的空間限制性啟動子且適宜啟動子之選擇將取決於生物體。舉例而言，已知用於植物、蒼蠅、蠕蟲、哺乳動物、小鼠等之多種空間限制性啟動子。因此，可使用空間限制性啟動子來調控眾多種不同組織及細胞類型中編碼個體定點修飾多肽之核酸之表現，此端視生物體而定。一些空間限制性啟動子亦具時間限制性，使得啟動子在胚胎發育之特定階段期間或在生物過程之特定階段期間(*例如*小

鼠中之毛囊週期)呈「ON」狀態或「OFF」狀態。

【0521】在某些實施例中，轉基因之表現可處於在某些譜系中優先起始轉錄之啟動子之控制下，該等譜系係例如呼吸、前列腺、胰臟、乳房、腎、腸、神經、骨骼、血管、肝、造血、肌肉或心臟細胞譜系。譜系特異性啟動子之實例包括(但不限於) Sox-2啟動子(神經祖細胞特異性，參見美國專利第7,781,214號)、肌凝蛋白輕鏈2啟動子(心臟特異性，參見Huber I等人，FASEB J 2007, 21:2551-63)、aMHC啟動子(心臟特異性，參見Kita-Matsuo H, PLoS One 2009, 4:e5046；Ritner C等人，PLoS One 2011, 6:el6004)、Hb9啟動子(運動神經元特異性，參見Singh等人，Exp Neurol 2005, 196:224-34)、Dazl啟動子(生殖細胞特異性，參見Nicholas CR等人，Genesis 2009, 47:74-84)、白蛋白啟動子(肝細胞特異性，參見Lavon N等人，Differentiation 2004, 72:230- 238)及Pdxl啟動子(胰臟祖細胞特異性，*參見*Lavon N等人，Stem Cells 2006, 24: 1923-1930)。

【0522】在某些實施例中，轉基因之表現可處於組織特異性啟動子、例如特異性針對以下之啟動子之控制下：肝、胰臟(外分泌或內分泌部分)、脾、食管、胃、大腸或小腸、結腸、GI道、心臟、肺、腎、胸腺、副甲狀腺、松果腺、垂體腺、乳腺、唾液腺、卵巢、子宮、子宮頸(*例如*頸部)、前列腺、睪丸、生殖細胞、耳朵、眼睛、腦、視網膜、小腦、大腦、PNS或CNS、胎盤、腎上腺皮質或

髓質、皮膚、淋巴結、肌肉、脂肪、骨、軟骨、滑膜、骨髓、上皮、內皮、血管、神經組織等。組織特異性啟動子亦可特異性針對某些疾病組織，例如癌症。*參見*Fukazawa等人，Cancer Research 64: 363-369, 2004 (以引用方式併入本文中)。

【0523】此項技術中已知之任一組織特異性啟動子可用於本發明中。僅為說明，Chen等人(Nucleic Acid Research，第34卷，資料庫專刊，第D104-D107頁, 2006)闡述TiProD，即組織特異性啟動子資料庫(以引用方式併入本文中)。具體而言，TiProD係已知一些功能性特性之人類啟動子序列之資料庫。其允許使用者查詢個別啟動子及其調介之表現模式、個別組織之基因表現特徵且根據其組織特異性活性或根據相應基因所分配之個別基因本體論(Gene Ontology)術語檢索啟動子組。資料庫已定義允許使用者區分遍在與特異性表現基因之組織特異性之量度。資料庫可在tiprod.cbi.pku dot edu.cn:8080/index.html上訪問。其涵蓋上文所述之大多數(若非全部)組織。可用之其他啟動子包括如在<biobase/de/pages/products/transpor html>上線上揭示之啟動子，其係具有根據基因/活性分類之15,000條以上之不同啟動子序列。

【0524】心臟細胞特異性啟動子之實例包括例如α-肌凝蛋白重鏈啟動子、AE3啟動子、Aplnr啟動子、心臟肌動蛋白啟動子、心臟肌鈣蛋白C啟動子、結蛋白(DES)啟動子、肌肉肌酸激酶(MCK)啟動子，視情況地具有MCK或心

臟肌鈣蛋白-T增強子、肌凝蛋白輕鏈-2啟動子、Nfatc1啟動子及Npr3啟動子(Franz等人(1997) Cardiovasc. Res. 35:560-566；Robbins等人(1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 752:492-505；Linn等人(1995) Circ. Res. 76:584-591；Parmacek等人(1994) Mol. Cell. Biol. 14:1870-1885；Hunter等人(1993) Hypertension 22:608-617；及Sartorelli等人(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4047-4051)。

【0525】肌肉細胞特異性啟動子之實例包括例如平滑肌α-肌動蛋白(SMA)啟動子、SM-肌凝蛋白重鏈啟動子、鈣調理蛋白(calponin)-h1啟動子、SM22α啟動子、血管α-肌動蛋白啟動子、腸γ-肌動蛋白啟動子、骨骼-α肌動蛋白(SkA)啟動子、哺乳動物肌肉肌酸激酶(MCK)啟動子、哺乳動物結蛋白(DES)啟動子、哺乳動物肌鈣蛋白I (TNNI2)啟動子及哺乳動物骨骼α-肌動蛋白(ASKA)啟動子。

【0526】神經細胞特異性啟動子之實例包括例如*星形細胞*：神經膠質原纖維酸性蛋白(GFAP)啟動子(Smith-Arica等人，2000；Lee等人，2008)；*GABA能神經元*：麩胺酸脫羧酶(GAD)啟動子(Rasmussen等人，2007)；*麩胺酸鹽能神經元*：磷酸鹽活化之麩胺酸酶(PAG)或囊泡麩胺酸鹽轉運子(vGLUT)啟動子(Rasmussen等人，2007)；*小神經膠質細胞*：F4/80啟動子、CD68啟動子(Rosario等人，2016)；*神經元*：突觸蛋白-1 (Syn1)及神經元特異性烯醇酶(NSE)啟動子(Peel等人，1997；Kugler等人，2001；Kugler等人，2003；McLean等人，2014)；*寡突膠質細*

胞：髓鞘鹼性蛋白(MBP) (von Jonquieres等人，2013)或人類髓鞘相關之糖蛋白(MAG)啟動子，後者呈全長及截短形式(von Jonquieres等人，2016)。神經細胞特異性啟動子之其他實例包括例如芳族胺基酸脫羧酶(AADC)啟動子、Ca2+鈣調蛋白(calmodulin)依賴性蛋白激酶II-α (CamKIIα)啟動子(*參見*，例如Mayford等人(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:13250；及Casanova等人(2001) Genesis 31:37)、CMV增強子/血小板源性生長因子-β啟動子(參見例如Liu等人(2004) Gene Therapy 11:52-60)、DAT啟動子、DNMT啟動子(參見例如Bartge等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3648-3652)、腦啡肽啟動子(參見例如Comb等人(1988) EMBO J. 17:3793-3805)、ENO2啟動子、GnRH啟動子(參見例如Radovick等人(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3402-3406)、L7啟動子(參見例如Oberdick等人(1990) Science 248:223-226)、MAP2啟動子、神經絲輕鏈基因啟動子(Piccioli等人，1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991))、神經絲啟動子、NURR1啟動子、PITX3啟動子、S100啟動子、血清素受體啟動子(參見例如GenBank S62283)、突觸蛋白啟動子、Tau啟動子、thy-1啟動子(*參見*，例如Chen等人(1987) Cell 51:7-19；及Llewellyn等人(2010) Nat. Med. 16(10):1161-1166)、TUBA1A啟動子、TUJ1啟動子、酪胺酸羥化酶啟動子(TH) (參見例如Oh等人(2009) Gene Ther 16:437；Sasaoka等人(1992) Mol. Brain Res. 16:274；Boundy等人

(1998) J. Neurosci. 18:9989；及Kaneda等人(1991) Neuron 6:583-594)、VGF啟動子(Piccioli等人，Neuron 15:373-84 (1995))及VMAT2啟動子。

【0527】神經膠質祖細胞特異性啟動子之實例包括例如A2B5啟動子、BLBP啟動子、腦源性神經營養因子BDNF啟動子、CD105啟動子、CD11b啟動子、CD11c啟動子、CD133啟動子、CD140a啟動子、CD45啟動子、CD9啟動子、睫狀神經營養因子CNTF啟動子、連結蛋白43啟動子、CX3CR1啟動子、EGFR啟動子、表皮生長因子EGF啟動子、FGF8啟動子、FOXG1啟動子、GalC啟動子、GAP-43啟動子、GD3啟動子、GLAST、麩醯胺酸合成酶啟動子、IBA-1啟動子、LNGFR啟動子、MBP啟動子、Musashi啟動子、神經生長因子NGF啟動子、巢蛋白啟動子、神經營養因子-3 NT-3啟動子、NG2啟動子、NKX2.2啟動子、NT-4啟動子、O4啟動子、OLIG1啟動子、OLIG2啟動子、P2RY12啟動子、PAX6啟動子、PDGFαR啟動子、S100β啟動子、SOX10啟動子、TMEM119啟動子及波形蛋白啟動子。

【0528】神經特異性啟動子之其他實例包括例如2',3'-環狀-核苷酸3'-磷酸二酯酶CNP啟動子、Ach啟動子、ASCL1啟動子、β-微管蛋白啟動子、鈣結合蛋白啟動子、c-fos啟動子、ChAT啟動子、corin啟動子、CRF啟動子、CTIP2啟動子、二胺基聯苯胺(DAB)啟動子、DLX1啟動子、DLX2啟動子、DLX5啟動子、DLX6啟動子、多巴

胺轉運子(DAT)啟動子、雙皮質素啟動子、EMX2p75啟動子、叉頭盒蛋白A2 FOXA2啟動子、叉頭盒蛋白O1 FOXO1啟動子、叉頭盒蛋白O4 FOXO4啟動子、FOX3啟動子、FOXG1啟動子、G蛋白活化內向整流鉀通道2 (GIRK2)啟動子、γ-胺基丁酸GABA啟動子、麩胺酸鹽脫羧酶1 GAD1啟動子、麩胺酸鹽離子型受體NMDA型次單元1 GRIN1啟動子、下視丘泌素啟動子、胰島素基因增強子蛋白(Is11)啟動子、LHX6啟動子、LHX8啟動子、LIM同源匣轉錄因子1-α LMX1A啟動子、LIM同源匣轉錄因子 1-β (LMX1B)啟動子、AFB啟動子、MAP2啟動子、微管相關蛋白2 (MAP-2)啟動子、髓鞘鹼性蛋白MBP啟動子、NADPH啟動子、巢蛋白啟動子、NGF啟動子、NGFI-B啟動子、NKX2.1啟動子、NKX2.2啟動子、NKX6.2啟動子、NPAS1啟動子、Nurr1啟動子、NURR1啟動子、OLIG2啟動子、配對盒蛋白(Pax6)啟動子、PAX6啟動子、POMC啟動子、PV啟動子、RAX啟動子、SATB2啟動子、SIX6啟動子、溶質載劑家族1成員6 SLC1A6啟動子、SOX6啟動子、SST啟動子、TBR1啟動子、TH啟動子、微管蛋白β鏈3 NEUN啟動子、微管蛋白β鏈3 TUB3啟動子、TuJ1啟動子、VAChT啟動子及VGLUT1啟動子。

【0529】內皮細胞特異性啟動子之實例包括例如*抗血管生成特異性啟動子*：Esm1、Apelin；*動脈特異性啟動子*：Sox17啟動子、Bmx啟動子。內皮細胞特異性啟動子之其他實例包括例如鈣黏蛋白5 (Cdh5，亦稱為血管內皮

鈣黏蛋白)啟動子、內皮細胞蛋白C結合蛋白(EPCR)啟動子、Fabp4啟動子、Kdr (Flk1/VEGFR2)啟動子、血小板源性生長因子B (PDGFB)啟動子、Tek/Tie2啟動子、角蛋白啟動子(在角質細胞之情形下)、前列腺鹼性蛋白啟動子(在前列腺上皮之情形下)及VE鈣黏蛋白啟動子。

【0530】大腦內皮細胞特異性啟動子之實例包括例如晚期糖化最終產物特異性受體AGER啟動子及多藥物抗性相關蛋白5 ABCC5、ATP-ABCC2結合盒轉運子ABCG2啟動子、ATP依賴性易位酶ABCB1啟動子、基底細胞黏附分子BCAM啟動子、小管多特異性有機陰離子轉運子1 ABCC2啟動子、CD117 (c-kit)啟動子、CD146啟動子、CD31啟動子、CD34啟動子、CD45啟動子、密連蛋白-5啟動子、CXCR4啟動子、eNOS啟動子、興奮性胺基酸轉運子3 SLC1A1啟動子、GLUT-1啟動子、胰島素受體INSR啟動子、大中性胺基酸轉運子小次單元1 SLC7A5啟動子、瘦素受體LEPR啟動子、低密度脂蛋白受體LDLR啟動子、低密度脂蛋白受體相關蛋白1 LRP1啟動子、多藥物抗性相關蛋白1 ABCC1啟動子、多藥物抗性相關蛋白4 ABCC4啟動子、緊連蛋白啟動子、PDGF啟動子、PECAM-1啟動子、p-糖蛋白啟動子、用於視黃醇攝取之受體STRA6啟動子、SDF-1啟動子、鈉偶合中性胺基酸轉運子5 SLC38A5啟動子、溶質載劑家族16成員1 SLC16A1啟動子、轉鐵蛋白受體TFRC啟動子、VE鈣黏蛋白啟動子、VE-鈣黏蛋白啟動子、VEGF啟動子、馮威裡氏因子(von Willebrand factor)

啟動子及ZO-1啟動子。

【0531】胰島細胞特異性啟動子之實例包括例如RIP啟動子、*胰島祖細胞*：Pdx1啟動子(NT-009799)、神經元素3啟動子(NT-008583)、NeuroD1啟動子(NT-005265)、巢蛋白啟動子(NT-004858)及Ptf1a-p48啟動子(NT-008705)、Pax6、Insm1、Nkx2-2啟動子；*成熟胰島細胞*：胰島素啟動子(GenBank登錄NT-009308)、升糖素啟動子(NT-022154)、體抑素啟動子(NT-005962)及胰臟多肽啟動子(NT-010755)、MafB、MafA、Pcsk1、Iapp、G6pc2及Ins1啟動子。

【0532】視網膜色素上皮細胞特異性啟動子之實例包括例如β磷酸二酯酶基因啟動子(Nicoud等人(2007) J. Gene Med. 9:1015)、錐視蛋白啟動子(COP)、光受體間類視色素結合蛋白(IRBP)基因增強子(Nicoud等人(2007))、IRBP基因啟動子(Yokoyama等人(1992) Exp Eye Res. 55:225)、紅/綠視蛋白啟動子(COP)、色素性視網膜炎基因啟動子(Nicoud等人(2007)見上文)、視紫質激酶啟動子(Young等人(2003) Ophthalmol. Vis. Sci. 44:4076)、視紫質(ROD)啟動子、胸腺細胞抗原(Thy1.2, 6500 bp)啟動子及卵黃囊狀黃斑失養症(VMD2)啟動子。

【0533】肝細胞特異性啟動子之實例包括例如白蛋白(Miyatake等人J Virol, 71:5124-32 (1997))、α-胎蛋白(AFP)(Arbuthnot等人，Hum. Gene Ther, 7:1503-14 (1996))、B型肝炎病毒核心啟動子(Sandig等人，Gene Ther., 3:1002-9

(1996))、人類α-1抗胰蛋白酶(hAAT)啟動子、脂肪酸結合腸蛋白啟動子、甲狀腺素結合球蛋白(TBG)啟動子、Apo AI及Apo AII啟動子、α 1-抗胰蛋白酶啟動子及轉甲狀腺素啟動子(Quian等人(1995) Mol Cell Biol 15, 1364-1376；Bristol J A、Gallo-Penn A、Andrews J、Idamakanti N、Kaleko M、Connelly S. (2001) Hum Gene Ther vol 12(13):1651-61)。

【0534】甲狀腺細胞特異性啟動子之實例包括例如甲狀腺球蛋白(Tg)啟動子、甲狀腺過氧化酶(TPO)啟動子及TSH受體(TSHr)啟動子。

【0535】T細胞特異性啟動子之實例包括例如CD2啟動子(Hansal等人，J Immunol, 161:1063-8 (1998))、免疫球蛋白重鏈啟動子及T細胞受體a鏈啟動子。

【0536】癌症細胞特異性啟動子之實例包括例如酪胺酸酶啟動子或TRP2啟動子(在黑色素瘤細胞及黑色素細胞之情形下)、MMTV或WAP啟動子(在乳房細胞及/或癌症之情形下)、絨毛蛋白或FABP啟動子(在腸細胞及/或癌症之情形下)、巢蛋白或GFAP啟動子(在CNS細胞及/或癌症之情形下)及克氏細胞(Clara cell)分泌蛋白啟動子(在肺癌之情形下)。

5. 分化特異性啟動子

【0537】此項技術中已知之任一分化特異性啟動子可用於本揭示案中。分化特異性啟動子之實例包括上文所述

之彼等啟動子。另一組織特異性表現方法包括甚至在誘導靜止及/或細胞分化成多種細胞類型後仍用於拷貝數依賴性、位置非依賴性轉基因表現之「BAC TG-EMBED」方法，例如使用GAPDH BAC含有約200 kb人類GAPDH基因座及1.2 kb人類UBC啟動子(Chaturvedi等人，Gene Ther 25, 376-391 (2018))。

6. 轉錄調控結構域：

【0538】此項技術中已知之任一轉錄調控結構域可用於本揭示案中。常見結構域包括例如轉錄因子結構域(活化劑、抑制子、共活化劑、共抑制子)、沈默子、致癌基因(*例如*myc、jun、fos、myb、max、mad、rel、ets、bcl、myb、mos家族成員等)；DNA修復酶及其相關因子及修飾劑；DNA重排酶及其相關因子及修飾劑；染色質相關蛋白及其修飾劑(*例如*激酶、乙醯酶及去乙醯酶)；及DNA修飾酶(*例如*甲基轉移酶，例如DNMT家族之成員(*例如*DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L等、拓撲異構酶、解旋酶、連接酶、激酶、磷酸酶、聚合酶、核酸內切酶)及其相關因子及修飾劑。參見例如美國公開案第2013/0253040號，其全文皆以引用方式併入本文中。

【0539】此項技術中已知之任一轉錄活化劑可用於本揭示案中。*轉錄活化劑之實例包括例如*HSV VP 16活化結構域(*參見*，例如Hagmann等人，J. Virol. 71, 5952-5962 (197))、核激素受體(參見例如Torchia等人，Curr. Opin.

Cell. Biol. 10:373-383 (1998))；核因子κB之p65次單元(Bitko及Bank, J. Virol. 72:5610-5618 (1998)以及Doyle及Hunt, Neuroreport 8:2937-2942 (1997))；Liu等人，Cancer Gene Ther. 5:3-28 (1998))或人工嵌合功能結構域(例如VP64) (Beerli等人(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14623-33)及降解子(Molinari等人(1999) EMBO J. 18, 6439-6447)。其他例示性活化結構域包括Oct 1、Oct-2A、Spl、AP-2及CTF1 (Seipel等人，EMBOJ. 11, 4961-4968 (1992))以及p300、CBP、PCAF、SRC1 PvALF、AtHD2A及ERF-2。參見例如Robyr等人(2000) Mol. Endocrinol. 14:329-347；Collingwood等人(1999) J. Mol. Endocrinol 23:255-275；Leo等人(2000) Gene 245:1-11；Manteuffel-Cymborowska (1999) Acta Biochim. Pol. 46:77-89；McKenna等人(1999) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 69:3-12；Malik等人(2000) Trends Biochem. Sci. 25:277-283；及Lemon等人(1999) Curr. Opin. Genet. Dev. 9:499-504。其他例示性活化結構域包括(但不限於) OsGAI、HALF-1、Cl、AP1、ARF-5、ARF-6、ARF-1及ARF-8、CPRF1、CPRF4、MYC-RP/GP及TRAB1，參見例如Ogawa等人(2000) Gene 245:21-29；Okanami等人(1996) Genes Cells 1 :87-99；Goff等人(1991) Genes Dev. 5:298-309；Cho等人(1999) Plant Mol Biol 40:419-429；Ulmason等人(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:5844-5849；Sprenger-Haussels等人(2000) Plant J. 22:1-8；Gong等人(1999) Plant

Mol. Biol. 41:33-44；及Hobo等人(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:15,348-15,353。

【0540】此項技術中已知之任一增強子可用於本揭示案中。增強子之實例包括例如CMV增強子(eCMV)、RSV增強子及SV40增強子。

【0541】此項技術中已知之任一絕緣子元件可用於本揭示案中。絕緣子元件之實例包括例如cHS4 (Chung等人，1993)及衍生自人類HNRPA2B1-CBX3基因座(A2UCOE)之遍在染色質開放元件(UCOE)。

【0542】此項技術中已知之任一組蛋白乙醯基轉移酶(HAT)可用於本揭示案中。HAT之實例包括例如A型核定位HAT，例如MYST家族成員MOZ、Ybf2/Sas3、MOF及Tip60、GNAT家族成員Gcn5或pCAF、p300家族成員CBP、p300及Rtt109 (Bemdsen及Denu (2008) Curr Opin Struct Biol 18(6):682-689)。

【0543】此項技術中已知之任一組蛋白去乙醯酶(HDAC)可用於本揭示案中。HDAC之實例包括例如I類(HDAC-1、2、3及8)、II類(HDAC IIA (HDAC-4、5、7及9)、HD AC IIB (HDAC 6及10))、IV類(HDAC-11)及III類(亦稱為長壽蛋白(sirtuin，SIRT)；SIRT1-7) (參見Mottamal等人(2015) Molecules 20(3):3898-3941)。

【0544】此項技術中已知之任一組蛋白磷酸化酶或激酶可用於本揭示案中。組蛋白磷酸化酶或激酶之實例包括例如MSK1、MSK2、ATR、ATM、DNA-PK、Bubl、

VprBP、IKK-a、PKCpi、Dik/Zip、JAK2、PKC5、WSTF及CK2。

【0545】此項技術中已知之任一甲基化結構域可用於本揭示案中。甲基化結構域之實例包括例如Ezh2、PRMT1/6、PRMT5/7、PRMT 2/6、CARM1、set7/9、MLL、ALL-1、Suv 39h、G9a、SETDB1、Ezh2、Set2、Dotl、PRMT 1/6、PRMT 5/7、PR-Set7及Suv4-20h。

【0546】此項技術中已知之參與小泛素化或生物素化之任一結構域可用於本揭示案中。參與小泛素化或生物素化之結構域之實例包括例如Lys9、13、4、18及12 (綜述參見Kousarides (2007) Cell 128:693-705)。

【0547】此項技術中已知之任一轉錄後調控元件可用於本揭示案中。轉錄後調控元件之實例包括例如B型肝炎病毒(HBV)轉錄後調控元件(PRE) (HPRE) (Huang, Z. M.及Yen, T. S. (1995) Mol. Cell. Biol. 15: 3864-3869)及土撥鼠肝炎病毒(Woodchuck hepatitis virus，WHV) PRE (WPRE) (美國專利第6,136,597號及美國專利第6,287,814號)。

7. 逆轉轉基因沈默之其他方法

【0548】此項技術中已知之任一方法可用於可調控地過表現轉基因，例如CD47。可用於逆轉轉基因沈默且可調控地過表現轉基因之方法之實例包括例如採用僅細胞質(非核)載體(非病毒mRNA載體或基於正股RNA之病毒載體，例如基於仙台病毒(Sendai virus)之載體)；CpG除去、

CpG清除及最小化DNA載體；多個轉基因插入隨機染色體位點中；位點特異性染色體整合；轉基因之游離型定位(來自SV40、多瘤病毒、乳頭瘤病毒之緊密游離型複製子；愛潑斯坦-巴爾病毒(Epstein-Barr Virus，EBV)之EBNA1-oriP DNA區段可用於支持質體基因載體在分裂的實驗室細胞之核質中之維持)；在基因療法載體內採用基因座控制區域(染色質絕緣子或其他順式作用基因座控制區域(LCR))；重複載體投與以補償沈默之轉基因；轉基因表現之小分子增強子(*例如*已知影響染色質狀態之物質，例如組蛋白去乙醯酶抑制劑曲古抑菌素A (Trichostatin A)、4-苯基丁酸、丁酸、戊酸、己酸、丙戊酸及視黃酸；特異性針對用於基因轉移之特定載體之小分子增強子，例如已知羥基脲在用AAV載體遞送後加強轉基因表現)；及轉譯後調控元件。參見例如Tolmachov等人(2013). Silencing of Transgene Expression: A Gene Therapy Perspective. 10.5772/53379。

8. 可調控減少的表現或過表現之時間

【0549】在一些實施例中，靶基因之可調控減少的表現包括B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB及/或RHD之可調控減少的表現，例如可調控敲除或敲低。可調控減少的表現可在細胞改造及分化期間之任一點起始。舉例而言，可調控減少的表現可在第1天(例如分離原代細胞當天或細胞變成iPSC細胞當天)與細胞終末分化當天之間的任

一點起始、引入或誘導。

【0550】在一些實施例中，轉基因之可調控過表現包括外源多核苷酸之可調控過表現，例如編碼一或多種耐受原性因子之外源轉基因之可調控過表現。可調控過表現可在細胞改造及分化期間之任一點起始。舉例而言，可調控過表現可在第1天(例如分離原代細胞當天或細胞變成iPSC細胞當天)與細胞終末分化當天之間的任一點起始、引入或誘導。

E. CIITA

【0551】在一些實施例中，本揭示案藉由可調控地靶向並調節(*例如*減少或消除)II類反式活化劑(CIITA)表現可調控地調節(*例如*減少或消除)一或多種MHC II基因之表現。在一些實施例中，調節係使用基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)來進行。在一些實施例中，調節係使用選自由以下組成之群之基於RNA之組分來進行：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。在一些實施例中，調節係使用選自由敲除組成之群之基於DNA之組分來進行，該敲除使用選自由以下組成之群之方法：條件或可誘導CRISPR、條件或可誘導TALEN、條件或可誘導鋅指核酸酶、條件或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件或可誘導大範圍核酸酶。在一些實施例中，調節係使用基於蛋白質之組分來進行，其係條件性或可誘導降解子方法。

【0552】CIITA係LR或核苷酸結合結構域(NBD)富含白胺酸之重複(LRR)蛋白質家族之成員，且藉由與MHC增強體締合來調控MHC II之轉錄。

【0553】在一些實施例中，本揭示案之靶多核苷酸序列係CIITA之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係CIITA之同源物。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係CIITA之異種同源物。

【0554】在一些實施例中，CIITA之減少或消除的表現會減少或消除以下II類MHC中一或多者之表現：HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ及HLA-DR。

【0555】在一些實施例中，本文所述之細胞在編碼CIITA蛋白之基因座處包含可調控基因修飾。換言之，細胞在CIITA基因座處包含可調控遺傳修飾。在一些情況下，編碼CIITA蛋白之核苷酸序列闡述於參考序列號NM_000246.4及NCBI Genbank編號U18259中。在一些情況下，CIITA基因座闡述於NCBI基因ID編號4261中。在某些情形下，CIITA之胺基酸序列繪示為NCBI GenBank編號AAA88861.1。CIITA蛋白及基因座之其他描述可參見Uniprot編號P33076、HGNC參考編號7067及OMIM參考編號600005。

【0556】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含靶向CIITA基因之可調控遺傳修飾。在一些實施例中，靶向CIITA基因之可調控遺傳修飾係藉助包含可調

控Cas蛋白之可調控稀切核酸內切酶或編碼Cas蛋白之可調控多核苷酸及特異性靶向CIITA基因之至少一條引導核糖核酸序列。在一些實施例中，特異性靶向CIITA基因之至少一條引導核糖核酸序列選自由WO2016183041之表12之SEQ ID NO:5184-36352組成之群，該專利以引用方式併入本文中。在一些實施例中，細胞具有降低的在接受個體中誘導先天及/或適應性免疫反應之能力。在一些實施例中，編碼如本文所揭示之多肽(*例如*嵌合抗原受體、CD47或本文所揭示之另一耐受原性因子)之外源核酸插入CIITA基因處。

【0557】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含CIITA表現之可調控敲除，使得細胞係可調控之$CIITA^{-/-}$。在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞將插入缺失可調控地引入CIITA基因座中，使得細胞係可調控之$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$。在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含CIITA表現之可調控敲低，使得細胞係可調控之$CIITA^{敲低}$。

【0558】測試CIITA基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一些實施例中，可藉由FACS分析來分析CIITA基因藉由PCR之所得遺傳修飾及HLA-II表現之減少。在另一實施例中，使用用針對CIITA蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測CIITA蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

F. B2M

【0559】在一些實施例中，本文所揭示之技術藉由可調控地靶向及調節(*例如*減少或消除)輔助鏈B2M之表現來可調控地調節(*例如*減少或消除)一或多種MHC-I基因之表現。在一些實施例中，調節係使用基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)來進行。在一些實施例中，調節係使用選自由以下組成之群之基於RNA之組分來進行：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。在一些實施例中，調節係使用選自由敲除或敲低組成之群之基於DNA之組分來進行，該敲除或敲低使用選自由以下組成之群之方法：條件性或可誘導CRISPR、條件性或可誘導TALEN、條件性或可誘導鋅指核酸酶、條件性或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件性或可誘導大範圍核酸酶。在一些實施例中，調節係使用基於蛋白質之組分來進行，其係條件性或可誘導降解子方法。

【0560】藉由調節(*例如*減少或缺失) B2M之表現，阻斷MHC-I分子之表面輸送且使細胞呈低免疫原性。在一些實施例中，細胞具有降低的在接受個體中誘導先天及/或適應性免疫反應之能力。

【0561】在一些實施例中，本揭示案之靶多核苷酸序列係B2M之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係B2M之同源物。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係B2M

之異種同源物。

【0562】在一些實施例中，B2M之減少或消除的表現會減少或消除以下MHC I分子中一或多者之表現：HLA-A、HLA-B及HLA-C。

【0563】在一些實施例中，本文所述之細胞在編碼B2M蛋白之基因座處包含可調控基因修飾。換言之，細胞在B2M基因座處包含可調控遺傳修飾。在一些情況下，編碼B2M蛋白之核苷酸序列闡述於參考序列號NM_004048.4及Genbank編號AB021288.1中。在一些情況下，B2M基因座闡述於NCBI基因ID編號567中。在某些情形下，B2M之胺基酸序列繪示為NCBI GenBank編號BAA35182.1。B2M蛋白及基因座之其他描述可參見Uniprot編號P61769、HGNC參考編號914及OMIM參考編號109700。

【0564】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含靶向B2M基因之可調控遺傳修飾。在一些實施例中，靶向B2M基因之可調控遺傳修飾係藉助包含可調控Cas蛋白之可調控稀切核酸內切酶或編碼Cas蛋白之可調控多核苷酸及特異性靶向B2M基因之至少一條引導核糖核酸序列。在一些實施例中，特異性靶向B2M基因之至少一條引導核糖核酸序列選自由WO2016183041之表15之SEQ ID NO:81240-85644組成之群，該專利以引用方式併入本文中。在一些實施例中，編碼如本文所揭示之多肽(*例如*嵌合抗原受體、CD47或本文所揭示之另一耐受原性因子)之外源核酸插入B2M基因處。

【0565】測試B2M基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一些實施例中，可藉由FACS分析來分析B2M基因藉由PCR之所得遺傳修飾及HLA-I表現之減少。在另一實施例中，使用用針對B2M蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測B2M蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

【0566】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含B2M表現之可調控敲除，使得細胞係可調控之$B2M^{-/-}$。在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞將插入缺失可調控地引入B2M基因座中，使得細胞係可調控之$B2M^{插入缺失/插入缺失}$。在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含B2M表現之可調控敲低，使得細胞係可調控之$B2M^{敲低}$。

G. NLRC5

【0567】在某些實施例中，本文所揭示之技術藉由可調控地靶向及調節(*例如*減少或消除)含有5/NOD27/CLR16.1之NLR家族CARD結構域(NLRC5)之表現來可調控地調節(*例如*減少或消除)一或多種MHC-I基因之表現。在一些實施例中，調節係使用基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)來進行。在一些實施例中，調節係使用選自由以下組成之群之基於RNA之組分來進行：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條

件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。在一些實施例中，調節係使用選自由敲除或敲低組成之群之基於DNA之組分來進行，該敲除或敲低使用選自由以下組成之群之方法：條件性或可誘導CRISPR、條件性或可誘導TALEN、條件性或可誘導鋅指核酸酶、條件性或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件性或可誘導大範圍核酸酶。在一些實施例中，調節係使用基於蛋白質之組分來進行，其係條件性或可誘導降解子方法。

【0568】NLRC5係MHC-I介導之免疫反應之關鍵調控劑，且與CIITA相似，NLRC5係IFN-γ高度可誘導的且可易位至核中。NLRC5活化MHC-I基因之啟動子且誘導MHC-I以及參與MHC-I抗原呈遞之相關基因之轉錄。

【0569】在一些實施例中，靶多核苷酸序列係NLRC5之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係NLRC5之同源物。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係NLRC5之異種同源物。

【0570】在一些實施例中，NLRC5之減少或消除的表現會減少或消除以下MHC I分子中一或多者之表現：HLA-A、HLA-B及HLA-C。

【0571】在一些實施例中，本文所概述之細胞包含靶向NLRC5基因之可調控遺傳修飾。在一些實施例中，靶向NLRC5基因之可調控遺傳修飾係藉助包含可調控Cas蛋白之可調控稀切核酸內切酶或編碼Cas蛋白之可調控多核苷酸及特異性靶向NLRC5基因之至少一條引導核糖核酸序

列。在一些實施例中，特異性靶向NLRC5基因之至少一條引導核糖核酸序列選自由WO2016183041之附錄3或表14之SEQ ID NO:36353-81239組成之群，該揭示內容之全文皆以引用方式併入。

【0572】測試NLRC5基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一些實施例中，可藉由FACS分析來分析NLRC5基因藉由PCR之所得遺傳修飾及HLA-I表現之減少。在另一實施例中，使用用針對NLRC5蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測NLRC5蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

【0573】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含NLRC5表現之可調控敲除，使得細胞係可調控之*NLRC5*$^{-/-}$。在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞將插入缺失可調控地引入NLRC5基因座中，使得細胞係可調控之*NLRC5*$^{插入缺失/插入缺失}$。在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含NLRC5表現之可調控敲低，使得細胞係可調控之*NLRC5*^{敲低}。

H. TRAC

【0574】在某些實施例中，本文所揭示之技術藉由可調控地靶向及調節(*例如*減少或消除) T細胞受體α鏈之恆定區之表現來可調控地調節(*例如*減少或消除)TCR基因(包括TRAC基因)之表現。在一些實施例中，調節係使用基因編

輯系統(*例如*CRISPR/Cas)來進行。在一些實施例中，調節係使用選自由以下組成之群之基於RNA之組分來進行：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。在一些實施例中，調節係使用選自由敲除或敲低組成之群之基於DNA之組分來進行，該敲除或敲低使用選自由以下組成之群之方法：條件性或可誘導CRISPR、條件性或可誘導TALEN、條件性或可誘導鋅指核酸酶、條件性或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件性或可誘導大範圍核酸酶。在一些實施例中，調節係使用基於蛋白質之組分來進行，其係條件性或可誘導降解子方法。

【0575】藉由調節(*例如*減少或缺失) TRAC之表現，阻斷TCR分子之表面輸送。在一些實施例中，細胞亦具有降低的在接受個體中誘導先天及/或適應性免疫反應之能力。

【0576】在一些實施例中，本揭示案之靶多核苷酸序列係TRAC之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係TRAC之同源物。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係TRAC之異種同源物。

【0577】在一些實施例中，TRAC之減少或消除的表現會減少或消除TCR表面表現。

【0578】在一些實施例中，細胞(例如但不限於多能幹細胞、誘導性多能幹細胞、自誘導性多能幹細胞分化之T細胞、原代T細胞及衍生自原代T細胞之細胞)在編碼

TRAC蛋白之基因座處包含可調控基因修飾。換言之，細胞在TRAC基因座處包含可調控遺傳修飾。在一些情況下，編碼TRAC蛋白之核苷酸序列闡述於Genbank編號X02592.1中。在一些情況下，TRAC基因座闡述於參考序列號NG_001332.3及NCBI基因ID編號28755中。在某些情形下，TRAC之胺基酸序列繪示為Uniprot編號P01848。TRAC蛋白及基因座之其他描述可參見Uniprot編號P01848、HGNC參考編號12029及OMIM參考編號186880。

【0579】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含靶向TRAC基因之可調控遺傳修飾。在一些實施例中，靶向TRAC基因之可調控遺傳修飾係藉助包含可調控Cas蛋白之可調控稀切核酸內切酶或編碼Cas蛋白之可調控多核苷酸及特異性靶向TRAC基因之至少一條引導核糖核酸序列。在一些實施例中，特異性靶向TRAC基因之至少一條引導核糖核酸序列選自由US20160348073之SEQ ID NOS:532-609及9102-9797組成之群，該專利以引用方式併入本文中。

【0580】測試TRAC基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一些實施例中，可藉由FACS分析來分析TRAC基因藉由PCR之所得遺傳修飾及TCR表現之減少。在另一實施例中，使用用針對TRAC蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測TRAC蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

【0581】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含TRAC表現之可調控敲除，使得細胞係可調控之$TRAC^{-/-}$。在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞將插入缺失可調控地引入TRAC基因座中，使得細胞係可調控之$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$。在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含TRAC表現之可調控敲低，使得細胞係可調控之$TRAC^{敲低}$。

I. TRB

【0582】在許多實施例中，本文所揭示之技術藉由可調控地靶向及調節(*例如*減少或消除)T細胞受體β鏈之恆定區之表現來可調控地調節(*例如*減少或消除)TCR基因(包括編碼T細胞抗原受體β鏈之基因，*例如*TRB、TRBC或TCRB基因)之表現。在一些實施例中，調節係使用基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)來進行。在一些實施例中，調節係使用選自由以下組成之群之基於RNA之組分來進行：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。在一些實施例中，調節係使用選自由敲除或敲低組成之群之基於DNA之組分來進行，該敲除或敲低使用選自由以下組成之群之方法：條件性或可誘導CRISPR、條件性或可誘導TALEN、條件性或可誘導鋅指核酸酶、條件性或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件性或可誘導大範圍核酸酶。在一些實施例中，調節係使用基於蛋白質之組分來進行，其係條

件性或可誘導降解子方法。

【0583】藉由調節(*例如*減少或缺失)TRB之表現，阻斷TCR分子之表面輸送。在一些實施例中，細胞亦具有降低的在接受個體中誘導先天及/或適應性免疫反應之能力。

【0584】在一些實施例中，本揭示案之靶多核苷酸序列係TRB之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係TRB之同源物。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係TRB之異種同源物。

【0585】在一些實施例中，TRB之減少或消除的表現會減少或消除TCR表面表現。

【0586】在一些實施例中，細胞(例如但不限於多能幹細胞、誘導性多能幹細胞、自誘導性多能幹細胞分化之T細胞、原代T細胞及衍生自原代T細胞之細胞)在編碼TRB蛋白之基因座處包含可調控基因修飾。換言之，細胞在TRB基因座處包含可調控遺傳修飾。在一些情況下，編碼TRB蛋白之核苷酸序列闡述於UniProt編號P0DSE2中。在一些情況下，TRB基因座闡述於參考序列號NG_001333.2及NCBI基因ID編號6957中。在某些情形下，TRB之胺基酸序列繪示為Uniprot編號P01848。TRB蛋白及基因座之其他描述可參見GenBank編號L36092.2、Uniprot編號P0DSE2及HGNC參考編號12155。

【0587】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含靶向TRB基因之可調控遺傳修飾。在一些實施例

中，靶向TRB基因之可調控遺傳修飾係藉助包含可調控Cas蛋白之可調控稀切核酸內切酶或編碼Cas蛋白之可調控多核苷酸及特異性靶向TRB基因之至少一條引導核糖核酸序列。在一些實施例中，特異性靶向TRB基因之至少一條引導核糖核酸序列選自由US20160348073之SEQ ID NOS:610-765及9798-10532組成之群，該專利以引用方式併入本文中。

【0588】測試TRB基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一些實施例中，可藉由FACS分析來分析TRB基因藉由PCR之所得遺傳修飾及TCR表現之減少。在另一實施例中，使用用針對TRB蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測TRB蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

【0589】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含TRB表現之可調控敲除，使得細胞係可調控之$TRB^{-/-}$。在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞將插入缺失可調控地引入TRB基因座中，使得細胞係可調控之$TRB^{插入缺失/插入缺失}$。在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含TRB表現之可調控敲低，使得細胞係可調控之$TRB^{敲低}$。

J. CD142

【0590】在某些實施例中，本文所揭示之技術調節

(*例如*減少或消除) CD142之表現，CD142亦稱為組織因子、因子III及F3。在一些實施例中，調節係使用基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)來進行。

【0591】在一些實施例中，靶多核苷酸序列係CD142或CD142之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係CD142之同源物。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係CD142之異種同源物。

【0592】在一些實施例中，本文所概述之細胞包含靶向CD142基因之遺傳修飾。在一些實施例中，藉由稀切核酸內切酶靶向CD142基因之遺傳修飾包含Cas蛋白或編碼Cas蛋白之多核苷酸及特異性靶向CD142基因之至少一條引導核糖核酸(gRNA)序列。可用於鑑別靶向CD142之gRNA序列之方法闡述於下文中。

【0593】測試CD142基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一些實施例中，可藉由FACS分析來分析CD142基因藉由PCR之所得遺傳修飾及CD142表現之減少。在另一實施例中，使用用針對CD142蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測CD142蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

【0594】關於人類CD142之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC01M094530、HGNC編號3541、NCBI基因ID 2152、NCBI參考序列號NM_001178096.1、NM_001993.4、NP_001171567.1及

NP_001984.1、UniProt編號P13726及諸如此類中。

K. RHD

【0595】在一些實施例中，本文所揭示之技術藉由可調控地靶向及調節(*例如*減少或消除) RHD基因之表現來可調控地調節(*例如*減少或消除) RhD抗原之表現。在一些實施例中，調節係使用基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)來進行。在一些實施例中，調節係使用選自由以下組成之群之基於RNA之組分來進行：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。在一些實施例中，調節係使用選自由敲除或敲低組成之群之基於DNA之組分來進行，該敲除或敲低使用選自由以下組成之群之方法：條件性或可誘導CRISPR、條件性或可誘導TALEN、條件性或可誘導鋅指核酸酶、條件性或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件性或可誘導大範圍核酸酶。在一些實施例中，調節係使用基於蛋白質之組分來進行，其係條件性或可誘導降解子方法。

【0596】在一些實施例中，細胞具有降低的在接受個體中誘導先天及/或適應性免疫反應之能力。

【0597】在一些實施例中，本揭示案之靶多核苷酸序列係RHD基因之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係RHD基因之同源物。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係RHD基因之異種同源物。

【0598】在一些實施例中，本文所述之細胞在編碼

RhD抗原蛋白之基因座處包含基因可調控修飾。換言之，細胞在RHD基因座處包含可調控遺傳修飾。在一些情況下，編碼RhD抗原蛋白之核苷酸序列闡述於參考序列號NM_001127691.2、NM_001282868.1、NM_001282869.1、NM_001282871.1或NM_016124.4或Genbank編號L08429中。在一些情況下，RHD基因座闡述於NCBI基因ID編號6007中。在某些情形下，RhD抗原蛋白之胺基酸序列繪示為NCBI GenBank編號AAA02679.1。RhD蛋白及基因座之其他描述可參見Uniprot編號Q02161、HGNC參考編號10009及OMIM參考編號111680。

【0599】在一些實施例中，本文所概述之細胞包含靶向RHD基因之可調控遺傳修飾。在一些實施例中，靶向RHD基因之可調控遺傳修飾係藉由使用可調控基因編輯工具可調控地基因編輯RHD基因來生成，該等可調控基因編輯工具係例如(但不限於)可調控CRISPR/Cas、可調控TALE核酸酶、可調控鋅指核酸酶、基於病毒之其他可調控基因編輯系統或可調控RNA干擾。在一些實施例中，基因編輯靶向RHD基因之編碼序列。在一些情況下，細胞並不產生功能性RHD基因產物。在RHD基因產物不存在下，細胞完全缺乏Rh血型抗原。

【0600】在一些實施例中，藉由稀切核酸內切酶靶向RHD基因之可調控遺傳修飾包含可調控Cas蛋白或編碼可調控Cas蛋白之多核苷酸及特異性靶向RHD基因之至少一條引導核糖核酸(gRNA)序列。可用於鑑別靶向RHD之

gRNA序列之方法闡述於下文中。

【0601】測試RHD基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一些實施例中，可藉由FACS分析來分析RHD基因藉由PCR之所得遺傳修飾及RHD表現之減少。在另一實施例中，使用用針對RhD蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測RhD蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

L. Y連鎖原鈣黏蛋白-11

【0602】在一些實施例中，本文所揭示之技術藉由可調控地靶向及調節(*例如*減少或消除) Y染色體基因之表現來可調控地調節(*例如*減少或消除)一或多種Y染色體基因之表現。在一些實施例中，調節係使用基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)來進行。在一些實施例中，調節係使用選自由以下組成之群之基於RNA之組分來進行：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。在一些實施例中，調節係使用選自由敲除或敲低組成之群之基於DNA之組分來進行，該敲除或敲低使用選自由以下組成之群之方法：條件性或可誘導CRISPR、條件性或可誘導TALEN、條件性或可誘導鋅指核酸酶、條件性或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件性或可誘導大範圍核酸酶。在一些實施例中，調節係使用基於蛋白質之組分來進行，其係條件性或可誘

導降解子方法。

【0603】在一些實施例中，細胞具有降低的在接受個體中誘導先天及/或適應性免疫反應之能力。

【0604】在某些實施例中，本文所揭示之技術藉由可調控地靶向及調節(*例如*減少或消除) Y連鎖原鈣黏蛋白-11基因(例如PCDH11Y)之表現來可調控地調節(*例如*減少或消除) Y連鎖原鈣黏蛋白-11抗原之表現。在一些實施例中，調節係使用基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)來進行。在一些實施例中，本文所揭示之技術藉由可調控地靶向及調節(*例如*減少或消除) Y染色體基因之表現來可調控地調節(*例如*減少或消除)一或多種Y染色體基因之表現。在一些實施例中，調節係使用CRISPR/Cas系統來進行。在一些實施例中，調節係使用選自由以下組成之群之基於RNA之組分來進行：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。在一些實施例中，調節係使用選自由敲除或敲低組成之群之基於DNA之組分來進行，該敲除或敲低使用選自由以下組成之群之方法：條件性或可誘導CRISPR、條件性或可誘導TALEN、條件性或可誘導鋅指核酸酶、條件性或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件性或可誘導大範圍核酸酶。在一些實施例中，調節係使用基於蛋白質之組分來進行，其係條件性或可誘導降解子方法。

【0605】在一些實施例中，細胞具有降低的在接受個體中誘導先天及/或適應性免疫反應之能力。

【0606】在一些實施例中，本揭示案之靶多核苷酸序列係PCDH11Y基因之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係PCDH11Y基因之同源物。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係PCDH11Y基因之異種同源物。

【0607】在一些實施例中，本文所述之細胞在編碼Y連鎖原鈣黏蛋白-11抗原 蛋白之基因座處包含可調控基因修飾。換言之，細胞在PCDH11Y基因座處包含可調控遺傳修飾。在一些情況下，編碼Y連鎖原鈣黏蛋白-11抗原蛋白之核苷酸序列闡述於參考序列號N NM_001278619.1、NM_032971.2 、 NM_032972.2 、 NM_032973.2 或XM_017030082.1 或 Genbank 編號 AJ276803 、 AF277053 、AF332216 、 AF332217 、 AJ564958 、 AJ564959 、AJ564960、 AJ564961、 AJ564962、 AJ564963、 AJ564966或AJ56496中。在一些情況下，PCDH11Y基因座闡述於NCBI基因ID編號83259中。在某些情形下，Y連鎖原鈣黏蛋白-11抗原之胺基酸序列繪示為NCBI GenBank編號CAC13122.1、AAL55729.1、AAK13468.1、AAK13469.1、CAD92429.1、CAD92430.1、CAD92431.1、CAD92432.1、CAD92433.1、CAD92434.1、CAD92437.1或CAD92440.1。Y連鎖原鈣黏蛋白-11抗原蛋白及基因座之其他描述可參見Uniprot編號Q9BZA8、HGNC參考編號15813及OMIM參考編號400022。

【0608】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含靶向PCDH11Y基因之可調控遺傳修飾。在一些實

施例中，靶向PCDH11Y基因之可調控遺傳修飾係藉由使用可調控基因編輯工具可調控地基因編輯PCDH11Y基因來生成，該等可調控基因編輯工具係例如(但不限於)可調控CRISPR/Cas、可調控TALE核酸酶、可調控鋅指核酸酶、基於病毒之其他可調控基因編輯系統或可調控RNA干擾。在一些實施例中，基因編輯靶向PCDH11Y基因之編碼序列。在一些情況下，細胞並不產生功能性PCDH11Y基因產物。在PCDH11Y基因產物不存在下，細胞完全缺乏Y連鎖原鈣黏蛋白-11抗原。

【0609】在一些實施例中，藉由稀切核酸內切酶靶向PCDH11Y基因之可調控遺傳修飾包含可調控Cas蛋白或編碼可調控Cas蛋白之多核苷酸及特異性靶向PCDH11Y基因之至少一條引導核糖核酸(gRNA)序列。可用於鑑別靶向PCDH11Y之gRNA序列之方法闡述於下文中。

【0610】測試PCDH11Y基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一個實施例中，可藉由FACS分析來分析PCDH11Y基因藉由PCR之所得遺傳修飾及Y連鎖原鈣黏蛋白-11抗原蛋白表現之減少。在另一實施例中，使用用針對Y連鎖原鈣黏蛋白-11抗原蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測Y連鎖原鈣黏蛋白-11抗原蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

M. Y連鎖神經配蛋白-4

【0611】在一些實施例中，本文所揭示之技術藉由可調控地靶向及調節(*例如*減少或消除) Y連鎖神經配蛋白-4基因(例如NLGN4Y)之表現來可調控地調節(*例如*減少或消除) Y連鎖神經配蛋白-4抗原之表現。在一些實施例中，調節係使用基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)來進行。在一些實施例中，調節係使用選自由以下組成之群之基於RNA之組分來進行：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。在一些實施例中，調節係使用選自由敲除或敲低組成之群之基於DNA之組分來進行，該敲除或敲低使用選自由以下組成之群之方法：條件性或可誘導CRISPR、條件性或可誘導TALEN、條件性或可誘導鋅指核酸酶、條件性或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件性或可誘導大範圍核酸酶。在一些實施例中，調節係使用基於蛋白質之組分來進行，其係條件性或可誘導降解子方法。

【0612】在一些實施例中，細胞具有降低的在接受個體中誘導先天及/或適應性免疫反應之能力。

【0613】在一些實施例中，本揭示案之靶多核苷酸序列係NLGN4Y基因之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係NLGN4Y基因之同源物。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係NLGN4Y基因之異種同源物。

【0614】在一些實施例中，本文所述之細胞在編碼Y連鎖神經配蛋白-4抗原蛋白之基因座處包含可調控基因修飾。換言之，細胞在NLGN4Y基因座處包含可調控遺傳修

飾。在一些情況下，編碼Y連鎖神經配蛋白-4抗原蛋白之核苷酸序列闡述於參考序列號NM_001164238.1、NM_001206850.1、NM_014893.4、XM_017030034.1、XM_017030035.1、XM_017030036.1、XM_017030037.1、XM_017030038.1、XM_017030040.1或XM_017030041.1或Genbank編號AF376804、AB023168、BX537428、AC010726、AC010879、AC010979、AC011903、BC032567、BC113525或BC113551中。在一些情況下，NLGN4Y基因座闡述於NCBI基因ID編號22829中。在某些情形下，Y連鎖神經配蛋白-4抗原之胺基酸序列繪示為NCBI GenBank編號 AAM46113.1、BAA76795.2、CAD97670.1、AAH32567.1、AAI13526.1或AAI13552.1。Y連鎖神經配蛋白-4抗原蛋白及基因座之其他描述可參見Uniprot編號Q8NFZ3、HGNC參考編號15529及OMIM參考編號400028。

【0615】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含靶向NLGN4Y基因之可調控遺傳修飾。在一些實施例中，靶向NLGN4Y基因之可調控遺傳修飾係藉由使用可調控基因編輯工具基因編輯NLGN4Y基因來生成，該等可調控基因編輯工具係例如(但不限於)可調控CRISPR/Cas、可調控TALE核酸酶、可調控鋅指核酸酶、基於病毒之其他可調控基因編輯系統或可調控RNA干擾。在一些實施例中，基因編輯靶向NLGN4Y基因之編碼序列。在一些情況下，細胞並不產生功能性NLGN4Y基因產

物。在NLGN4Y基因產物不存在下，細胞完全缺乏Y連鎖神經配蛋白-4抗原。

【0616】在一些實施例中，藉由稀切核酸內切酶靶向NLGN4Y基因之可調控遺傳修飾包含可調控Cas蛋白或編碼可調控Cas蛋白之多核苷酸及特異性靶向NLGN4Y基因之至少一條引導核糖核酸(gRNA)序列。可用於鑑別靶向NLGN4Y之gRNA序列之方法闡述於下文中。

【0617】測試NLGN4Y基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一個實施例中，可藉由FACS分析來分析NLGN4Y基因藉由PCR之所得遺傳修飾及Y連鎖神經配蛋白-4抗原蛋白表現之減少。在另一實施例中，使用用針對Y連鎖神經配蛋白-4抗原蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測Y連鎖神經配蛋白-4抗原蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

N. RHD

【0618】在一些實施例中，本文所揭示之技術藉由可調控地靶向及調節(*例如*減少或消除) RHD基因之表現來可調控地調節(*例如*減少或消除) RhD抗原之表現。在一些實施例中，調節係使用CRISPR/Cas系統來進行。在一些實施例中，調節係使用選自由以下組成之群之基於RNA之組分來進行：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾

(CRISPRi)。在一些實施例中，調節係使用選自由敲除或敲低組成之群之基於DNA之組分來進行，該敲除或敲低使用選自由以下組成之群之方法：條件性或可誘導CRISPR、條件性或可誘導TALEN、條件性或可誘導鋅指核酸酶、條件性或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件性或可誘導大範圍核酸酶。在一些實施例中，調節係使用基於蛋白質之組分來進行，其係條件性或可誘導降解子方法。

【0619】在一些實施例中，本揭示案之靶多核苷酸序列係RHD基因之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係RHD基因之同源物。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係RHD基因之異種同源物。

【0620】在一些實施例中，本文所述之細胞在編碼RhD抗原蛋白之基因座處包含可調控基因修飾。換言之，細胞在RHD基因座處包含可調控遺傳修飾。在一些情況下，編碼RhD抗原蛋白之核苷酸序列闡述於參考序列號NM_001127691.2、NM_001282868.1、NM_001282869.1、NM_001282871.1或NM_016124.4或Genbank編號L08429中。在一些情況下，RHD基因座闡述於NCBI基因ID編號6007中。在某些情形下，RhD抗原蛋白之胺基酸序列繪示為NCBI GenBank編號AAA02679.1。RhD蛋白及基因座之其他描述可參見Uniprot編號Q02161、HGNC參考編號10009及OMIM參考編號111680。

【0621】在一些實施例中，本文所概述之細胞包含靶向RHD基因之可調控遺傳修飾。在一些實施例中，靶向

RHD基因之遺傳修飾係藉由使用可調控基因編輯工具基因編輯RHD基因來生成，該等可調控基因編輯工具係例如(但不限於)可調控CRISPR/Cas、可調控TALE核酸酶、可調控鋅指核酸酶、基於病毒之其他可調控基因編輯系統或可調控RNA干擾。在一些實施例中，基因編輯靶向RHD基因之編碼序列。在一些情況下，細胞並不產生功能性RHD基因產物。在RHD基因產物不存在下，細胞完全缺乏Rh血型抗原。

【0622】在一些實施例中，藉由稀切核酸內切酶靶向RHD基因之可調控遺傳修飾包含可調控Cas蛋白或編碼可調控Cas蛋白之多核苷酸及特異性靶向RHD基因之至少一條引導核糖核酸(gRNA)序列。可用於鑑別靶向RHD之gRNA序列之方法闡述於下文中。

【0623】測試RHD基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一些實施例中，可藉由FACS分析來分析RHD基因藉由PCR之所得遺傳修飾及RHD表現之減少。在另一實施例中，使用用針對RhD蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測RhD蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

O. ABO

【0624】在一些實施例中，本文所揭示之技術藉由可調控地靶向及調節(*例如*減少或消除) ABO基因之表現來可

調控地調節(*例如*減少或消除) Histo血型ABO系統轉移酶(ABO)之表現。在一些實施例中，調節係使用基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)來進行。在一些實施例中，調節係使用選自由以下組成之群之基於RNA之組分來進行：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。在一些實施例中，調節係使用選自由敲除或敲低組成之群之基於DNA之組分來進行，該敲除或敲低使用選自由以下組成之群之方法：條件性或可誘導CRISPR、條件性或可誘導TALEN、條件性或可誘導鋅指核酸酶、條件性或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件性或可誘導大範圍核酸酶。在一些實施例中，調節係使用基於蛋白質之組分來進行，其係條件性或可誘導降解子方法。

【0625】在一些實施例中，細胞具有降低的在接受個體中誘導先天及/或適應性免疫反應之能力。

【0626】在一些實施例中，本揭示案之靶多核苷酸序列係ABO基因之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係ABO基因之同源物。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係ABO基因之異種同源物。

【0627】在一些實施例中，本文所述之細胞在編碼ABO蛋白之基因座處包含可調控基因修飾。換言之，細胞在ABO基因座處包含可調控遺傳修飾。在一些情況下，編碼ABO蛋白之核苷酸序列闡述於參考序列號NM_020469.2或Genbank編號AF134412中。在一些情況下，ABO基因座

闡述於NCBI基因ID編號28中。在某些情形下，ABO之胺基酸序列繪示為NCBI GenBank編號AAD26572.1。ABO蛋白及基因座之其他描述可參見Uniprot編號P16442、HGNC參考編號79及OMIM參考編號110300。

【0628】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含靶向ABO基因之可調控遺傳修飾。在一些實施例中，靶向ABO基因之可調控遺傳修飾係藉由使用可調控基因編輯工具基因編輯ABO基因來生成，該等可調控基因編輯工具係例如(但不限於)可調控CRISPR/Cas、可調控TALE核酸酶、可調控鋅指核酸酶、基於病毒之其他可調控基因編輯系統或可調控RNA干擾。在一些實施例中，基因編輯靶向ABO基因之編碼序列。在一些情況下，細胞並不產生功能性ABO基因產物。在ABO基因產物不存在下，細胞完全缺乏ABO蛋白。

【0629】在一些實施例中，藉由稀切核酸內切酶靶向ABO基因之可調控遺傳修飾包含可調控Cas蛋白或編碼可調控Cas蛋白之多核苷酸及特異性靶向ABO基因之至少一條引導核糖核酸(gRNA)序列。可用於鑑別靶向ABO之gRNA序列之方法闡述於下文中。

【0630】測試ABO基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一個實施例中，可藉由FACS分析來分析ABO基因藉由PCR之所得遺傳修飾及ABO蛋白表現之減少。在另一實施例中，使用用針對ABO蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測ABO蛋白表現。在另一實

施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

P. MIC-A

【0631】在一些實施例中，本文所揭示之技術藉由可調控地靶向及調節(*例如*減少或消除) MIC-A基因之表現可調控地調節(*例如*減少或消除)一或多種MHC I類多肽相關序列A (MIC-A)之表現。在一些實施例中，調節係使用基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)來進行。在一些實施例中，調節係使用選自由以下組成之群之基於RNA之組分來進行：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。在一些實施例中，調節係使用選自由敲除或敲低組成之群之基於DNA之組分來進行，該敲除或敲低使用選自由以下組成之群之方法：條件性或可誘導CRISPR、條件性或可誘導TALEN、條件性或可誘導鋅指核酸酶、條件性或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件性或可誘導大範圍核酸酶。在一些實施例中，調節係使用基於蛋白質之組分來進行，其係條件性或可誘導降解子方法。

【0632】在一些實施例中，細胞具有降低的在接受個體中誘導先天及/或適應性免疫反應之能力。

【0633】在一些實施例中，本揭示案之靶多核苷酸序列係MIC-A基因之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係MIC-A基因之同源物。在一些實施例中，靶多核苷

酸序列係MIC-A基因之異種同源物。

【0634】在一些實施例中，本文所述之細胞在編碼MIC-A蛋白之基因座處包含可調控基因修飾。換言之，細胞在MIC-A基因座處包含可調控遺傳修飾。在一些情況下，編碼MIC-A蛋白之核苷酸序列闡述於參考序列號NM_000247.2或Genbank編號BC016929中。在一些情況下，MIC-A基因座闡述於NCBI基因ID編號100507436中。在某些情形下，MIC-A之胺基酸序列繪示為NCBI GenBank編號AAH16929.1。MIC-A蛋白及基因座之其他描述可參見Uniprot編號Q29983、HGNC參考編號7090及OMIM參考編號600169。

【0635】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含靶向MIC-A基因之可調控遺傳修飾。在一些實施例中，靶向MIC-A基因之可調控遺傳修飾係藉由使用可調控基因編輯工具基因編輯MIC-A基因來生成，該等可調控基因編輯工具係例如(但不限於)可調控CRISPR/Cas、可調控TALE核酸酶、可調控鋅指核酸酶、基於病毒之其他可調控基因編輯系統或可調控RNA干擾。在一些實施例中，基因編輯靶向MIC-A基因之編碼序列。在一些情況下，細胞並不產生功能性MIC-A基因產物。在MIC-A基因產物不存在下，細胞完全缺乏MIC-A蛋白。

【0636】在一些實施例中，藉由稀切核酸內切酶靶向MIC-A基因之可調控遺傳修飾包含可調控Cas蛋白或編碼可調控Cas蛋白之多核苷酸及特異性靶向MIC-A基因之至

少一條引導核糖核酸(gRNA)序列。可用於鑑別靶向MIC-A之gRNA序列之方法闡述於下文中。

【0637】測試MIC-A基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一個實施例中，可藉由FACS分析來分析MIC-A基因藉由PCR之所得遺傳修飾及MIC-A蛋白表現之減少。在另一實施例中，使用用針對MIC-A蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測MIC-A蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

Q. MIC-B

【0638】在一些實施例中，本文所揭示之技術藉由可調控地靶向及調節(*例如*減少或消除) MIC-B基因之表現可調控地調節(*例如*減少或消除)一或多種MHC I類多肽相關序列B (MIC-B)之表現。在一些實施例中，調節係使用基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)來進行。在一些實施例中，調節係使用選自由以下組成之群之基於RNA之組分來進行：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。在一些實施例中，調節係使用選自由敲除或敲低組成之群之基於DNA之組分來進行，該敲除或敲低使用選自由以下組成之群之方法：條件性或可誘導CRISPR、條件性或可誘導TALEN、條件性或可誘導鋅指核酸酶、條件性或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件性或可誘導大範圍核酸酶。在一

些實施例中，調節係使用基於蛋白質之組分來進行，其係條件性或可誘導降解子方法。

【0639】在一些實施例中，細胞具有降低的在接受個體中誘導先天及/或適應性免疫反應之能力。

【0640】在一些實施例中，本揭示案之靶多核苷酸序列係MIC-B基因之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係MIC-B基因之同源物。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係MIC-B基因之異種同源物。

【0641】在一些實施例中，本文所述之細胞在編碼MIC-B蛋白之基因座處包含可調控基因修飾。換言之，細胞在MIC-B基因座處包含可調控遺傳修飾。在一些情況下，編碼MIC-B蛋白之核苷酸序列闡述於參考序列號NM_001289160.1或Genbank編號AK314228中。在一些情況下，MIC-B基因座闡述於NCBI基因ID編號4277中。在某些情形下，MIC-B之胺基酸序列繪示為NCBI GenBank編號BAG36899.1。MIC-B蛋白及基因座之其他描述可參見Uniprot編號Q29980、HGNC參考編號7091及OMIM參考編號602436。

【0642】在一些實施例中，本文所概述之低免疫原性細胞包含靶向MIC-B基因之可調控遺傳修飾。在一些實施例中，靶向MIC-B基因之可調控遺傳修飾係藉由使用可調控基因編輯工具基因編輯MIC-B基因來生成，該等可調控基因編輯工具係例如(但不限於)可調控CRISPR/Cas、可調控TALE核酸酶、可調控鋅指核酸酶、基於病毒之其他可

調控基因編輯系統或可調控RNA干擾。在一些實施例中，基因編輯靶向MIC-B基因之編碼序列。在一些情況下，細胞並不產生功能性MIC-B基因產物。在MIC-B基因產物不存在下，細胞完全缺乏MIC-B蛋白。

【0643】在一些實施例中，藉由稀切核酸內切酶靶向MIC-B基因之可調控遺傳修飾包含可調控Cas蛋白或編碼可調控Cas蛋白之多核苷酸及特異性靶向MIC-B基因之至少一條引導核糖核酸(gRNA)序列。可用於鑑別靶向MIC-B之gRNA序列之方法闡述於下文中。

【0644】測試MIC-B基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一個實施例中，可藉由FACS分析來分析MIC-B基因藉由PCR之所得遺傳修飾及MIC-B蛋白表現之減少。在另一實施例中，使用用針對MIC-B蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測MIC-B蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

R. CTLA-4

【0645】在一些實施例中，靶多核苷酸序列係CTLA-4或CTLA-4之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係CTLA-4之同源物。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係CTLA-4之異種同源物。

【0646】在一些實施例中，本文所概述之細胞包含靶向CTLA-4基因之遺傳修飾。在某些實施例中，原代T細胞

包含靶向CTLA-4基因之遺傳修飾。遺傳修飾可減少T細胞(包括原代T細胞及CAR-T細胞)中CTLA-4多核苷酸及CTLA-4多肽之表現。在一些實施例中，藉由稀切核酸內切酶靶向CTLA-4基因之遺傳修飾包含Cas蛋白或編碼Cas蛋白之多核苷酸及特異性靶向CTLA-4基因之至少一條引導核糖核酸(gRNA)序列。可用於鑑別靶向CTLA-4之gRNA序列之方法闡述於下文中。

【0647】測試CTLA-4基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一些實施例中，可藉由FACS分析來分析CTLA-4基因藉由PCR之所得遺傳修飾及CTLA-4表現之減少。在另一實施例中，使用用針對CTLA-4蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測CTLA-4蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

【0648】關於人類CTLA-4之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC02P203867、HGNC編號2505、NCBI基因ID 1493、NCBI參考序列號NM_005214.4、NM_001037631.2、NP_001032720.1及NP_005205.2、UniProt編號P16410及諸如此類中。

S. PD-1

【0649】在一些實施例中，靶多核苷酸序列係PD-1或PD-1之變異體。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係PD-1之同源物。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係PD-1之異

種同源物。

【0650】在一些實施例中，本文所概述之細胞包含靶向編碼程式化細胞死亡蛋白1 (PD-1)蛋白之基因或PDCD1基因之遺傳修飾。在某些實施例中，原代T細胞包含靶向PDCD1基因之遺傳修飾。遺傳修飾可減少T細胞(包括原代T細胞及CAR-T細胞)中PD-1多核苷酸及PD-1多肽之表現。在一些實施例中，藉由稀切核酸內切酶靶向PDCD1基因之遺傳修飾包含Cas蛋白或編碼Cas蛋白之多核苷酸及特異性靶向PDCD1基因之至少一條引導核糖核酸(gRNA)序列。可用於鑑別靶向PD-1之gRNA序列之方法闡述於下文中。

【0651】測試PDCD1基因是否已失活之分析為業內已知且闡述於本文中。在一些實施例中，可藉由FACS分析來分析PDCD1基因藉由PCR之所得遺傳修飾及PD-1表現之減少。在另一實施例中，使用用針對PD-1蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測PD-1蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認失活遺傳修飾之存在。

【0652】關於人類PD-1 (包括PDCD1基因)之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC02M241849、HGNC編號8760、NCBI基因ID 5133、Uniprot編號Q15116及NCBI參考序列號NM_005018.2及NP_005009.2中。

T. CD47

【0653】在一些實施例中，本揭示案提供已經修飾以可調控地過表現耐受原性因子(*例如*免疫調節多肽) CD47之細胞或其群體。在一些實施例中，本揭示案提供改變細胞基因體以可調控地過表現CD47之方法。在一些實施例中，幹細胞可調控地過表現外源CD47。在一些情況下，細胞可調控地表現包含編碼人類CD47多肽之核苷酸序列之表現載體。在一些實施例中，使用同源定向修復對細胞進行遺傳修飾以包含編碼可調控CD47之整合之外源多核苷酸。在一些情況下，細胞可調控地表現編碼人類CD47多肽之核苷酸序列，使得核苷酸序列插入安全港或靶基因座之至少一個對偶基因中。在一些情況下，細胞可調控地表現編碼人類CD47多肽之核苷酸序列，其中核苷酸序列插入*AAVS1*基因座之至少一個對偶基因中。在一些情況下，細胞可調控地表現編碼人類CD47多肽之核苷酸序列，其中核苷酸序列插入*CCR5*基因座之至少一個對偶基因中。在一些情況下，細胞可調控地表現編碼人類CD47多肽之核苷酸序列，其中核苷酸序列插入安全港或靶基因座之至少一個對偶基因中，該安全港或靶基因座係例如(但不限於) CCR5基因座、CXCR4基因座、PPP1R12C基因座、白蛋白基因座、SHS231基因座、CLYBL基因座、Rosa基因座、F3 (CD142)基因座、MICA基因座、MICB基因座、LRP1 (CD91)基因座、HMGB1基因座、ABO基因座、RHD基因座、FUT1基因座及KDM5D基因座。在一些情況下，細胞可調控地表現編碼人類CD47多肽之核苷酸

序列，其中核苷酸序列插入*TRAC*基因座之至少一個對偶基因中。

【0654】CD47係白血球表面抗原且在細胞黏附及整合素調節方面具有作用。其細胞表面上表現且信號傳導至循環巨噬細胞，以使其不會吞食該細胞。

【0655】在一些實施例中，本文所概述之細胞包含編碼CD47多肽之核苷酸序列，該CD47多肽與如NCBI參考序列號NP_001768.1及NP_942088.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性(*例如*95%、96%、97%、98%、99%或更大)。在一些實施例中，本文所概述之細胞包含編碼CD47多肽之核苷酸序列，該CD47多肽具有如NCBI參考序列號NP_001768.1及NP_942088.1中所述之胺基酸序列。在一些實施例中，細胞包含CD47之核苷酸序列，其與NCBI參考編號NM_001777.3及NM_198793.2中所述之序列具有至少85%序列一致性(*例如*85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大)。在一些實施例中，細胞包含如NCBI參考序列號NM_001777.3及NM_198793.2中所述之CD47之核苷酸序列。在一些實施例中，編碼CD47多核苷酸之核苷酸序列係密碼子最佳化序列。在一些實施例中，編碼CD47多核苷酸之核苷酸序列係人類密碼子最佳化序列。

【0656】在一些實施例中，細胞包含CD47多肽，其與如NCBI參考序列號NP_001768.1及NP_942088.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性(*例如*95%、96%、

97%、98%、99%或更大)。在一些實施例中，本文所概述之細胞包含CD47多肽，其具有如NCBI參考序列號NP_001768.1及NP_942088.1中所述之胺基酸序列。

【0657】具有信號序列及不具信號序列之人類CD47之例示性胺基酸序列提供於表1中。

表1. 人類CD47之胺基酸序列

蛋白質	SEQ ID NO:	序列	胺基酸殘基
人類CD47(不具信號序列)	129	QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE	aa 19-323
人類CD47(具有信號序列)	130	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE	aa 1-323

【0658】在一些實施例中，細胞包含與SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少80%序列一致性(*例如*80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大)之CD47多肽，其中CD47多肽具有與具有SEQ ID NO:129之胺基酸序列之CD47多肽實質上相同之生物功能及活性。在一些實施例中，細胞包含具有SEQ ID NO:129之胺基酸序列之CD47多肽。在一些實施例中，細胞包含與SEQ ID NO:14之胺基酸序列具有至少80%序列一致性(*例如*80%、85%、

90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大)之CD47多肽，其中CD47多肽具有與具有SEQ ID NO:130之胺基酸序列之CD47多肽實質上相同之生物功能及活性。在一些實施例中，細胞包含具有SEQ ID NO:14之胺基酸序列之CD47多肽。

【0659】在一些實施例中，細胞包含編碼CD47多肽之核苷酸序列，該CD47多肽與SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少95%序列一致性(*例如*95%、96%、97%、98%、99%或更大)。在一些實施例中，細胞包含編碼具有SEQ ID NO:129之胺基酸序列之CD47多肽之核苷酸序列。在一些實施例中，細胞包含編碼CD47多肽之核苷酸序列，該CD47多肽與SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少95%序列一致性(*例如*95%、96%、97%、98%、99%或更大)。在一些實施例中，細胞包含編碼具有SEQ ID NO:130之胺基酸序列之CD47多肽之核苷酸序列。在一些實施例中，核苷酸序列經密碼子最佳化以在特定細胞中表現。

【0660】在一些實施例中，使用適宜基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas系統或本文所述之任一基因編輯系統)來促進編碼CD47之可調控多核苷酸插入低免疫原性細胞之基因體基因座中。在一些情形下，編碼CD47之可調控多核苷酸插入安全港或靶基因座(例如但不限於AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3 (CD142)、MICA、MICB、LRP1 (CD91)、HMGB1、ABO、RHD、FUT1或KDM5D基因座)中。在一些實施例中，編碼CD47

之可調控多核苷酸插入B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座或TRB基因座中。在一些實施例中，編碼CD47之可調控多核苷酸插入本文所提供之表16中所繪示基因座之任一者中。在某些實施例中，編碼CD47之可調控多核苷酸可操作連接至啟動子。

【0661】在一些實施例中，啟動子係內源或組成型啟動子。在一些實施例中，啟動子係條件或可誘導啟動子。在一些實施例中，條件啟動子係細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。在一些實施例中，可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【0662】在一些實施例中，細胞經改造以表現相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞增加量之CD47。

【0663】增加的CD47表現量可量測為例如相對於未經改變或未經修飾之野生型細胞之表現之倍數(multiple)、倍數(fold)或百分比。舉例而言，在一些實施例中，本文所述之細胞表現未經改變或未經修飾之相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47水準的至少約1×、至少約1.1×、至少約1.2×、至少約1.3×、至少約1.4×、至少約1.5×、至少約1.6×、至少約1.7×、至少約1.8×、至少約1.9×、至少約2×、至少約2.1×、至少約2.2×、至少約2.3×、至少約2.4×、至少約2.5×、至少約2.6×、至少約2.7×、至少約2.8×、至少約2.9×、至少約3×、

至少約3.1×、至少約3.2×、至少約3.3×、至少約3.4×、至少約3.5×、至少約3.6×、至少約3.7×、至少約3.8×、至少約3.9×、至少約4×、至少約4.1×、至少約4.2×、至少約4.3×、至少約4.4×、至少約4.5×、至少約4.6×、至少約4.7×、至少約4.8×、至少約4.9×、至少約5×、至少約5.1×、至少約5.2×、至少約5.3×、至少約5.4×、至少約5.5×、至少約5.6×、至少約5.7×、至少約5.8×、至少約5.9×、至少約6×、至少約6.1×、至少約6.2×、至少約6.3×、至少約6.4×、至少約6.5×、至少約6.6×、至少約6.7×、至少約6.8×、至少約6.9×、至少約7×、至少約7.1×、至少約7.2×、至少約7.3×、至少約7.4×、至少約7.5×、至少約7.6×、至少約7.7×、至少約7.8×、至少約7.9×、至少約8×、至少約8.1×、至少約8.2×、至少約8.3×、至少約8.4×、至少約8.5×、至少約8.6×、至少約8.7×、至少約8.8×、至少約8.9×、至少約9×、至少約9.1×、至少約9.2×、至少約9.3×、至少約9.4×、至少約9.5×、至少約9.6×、至少約9.7×、至少約9.8×、至少約9.9×、至少約10×或更大。

【0664】在一些實施例中，本文所述之細胞表現未經改變或未經修飾之相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47水準的至少約1倍、至少約1.1倍、至少約1.2倍、至少約1.3倍、至少約1.4倍、至少約1.5倍、至少約1.6倍、至少約1.7倍、至少約1.8倍、至少約1.9倍、至少約2倍、至少約2.1倍、至少約2.2倍、至少約2.3倍、至少約2.4

倍、至少約2.5倍、至少約2.6倍、至少約2.7倍、至少約2.8倍、至少約2.9倍、至少約3倍、至少約3.1倍、至少約3.2倍、至少約3.3倍、至少約3.4倍、至少約3.5倍、至少約3.6倍、至少約3.7倍、至少約3.8倍、至少約3.9倍、至少約4倍、至少約4.1倍、至少約4.2倍、至少約4.3倍、至少約4.4倍、至少約4.5倍、至少約4.6倍、至少約4.7倍、至少約4.8倍、至少約4.9倍、至少約5倍、至少約5.1倍、至少約5.2倍、至少約5.3倍、至少約5.4倍、至少約5.5倍、至少約5.6倍、至少約5.7倍、至少約5.8倍、至少約5.9倍、至少約6倍、至少約6.1倍、至少約6.2倍、至少約6.3倍、至少約6.4倍、至少約6.5倍、至少約6.6倍、至少約6.7倍、至少約6.8倍、至少約6.9倍、至少約7倍、至少約7.1倍、至少約7.2倍、至少約7.3倍、至少約7.4倍、至少約7.5倍、至少約7.6倍、至少約7.7倍、至少約7.8倍、至少約7.9倍、至少約8倍、至少約8.1倍、至少約8.2倍、至少約8.3倍、至少約8.4倍、至少約8.5倍、至少約8.6倍、至少約8.7倍、至少約8.8倍、至少約8.9倍、至少約9倍、至少約9.1倍、至少約9.2倍、至少約9.3倍、至少約9.4倍、至少約9.5倍、至少約9.6倍、至少約9.7倍、至少約9.8倍、至少約9.9倍、至少約10倍或更大。

【0665】在一些實施例中，本文所述之細胞表現未經改變或未經修飾之相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47水準的至少約110%、至少約120%、至少約130%、至少約140%、至少約150%、至少約160%、至少約170%、至

少約180%、至少約190%、至少約200%、至少約250%、至少約300%、至少約350%、至少約400%、至少約450%、至少約500%、至少約550%、至少約600%、至少約650%、至少約700%、至少約750%、至少約800%、至少約850%、至少約900%、至少約950%、至少約1000%、至少約1500%、至少約2000%、至少約2500%、至少約3000%、至少約3500%、至少約4000%、至少約4500%、至少約5000%、至少約5500%、至少約6000%、至少約6500%、至少約7000%、至少約7500%、至少約8000%、至少約8500%、至少約9000%、至少約10000%或更大。

【0666】增加的CD47表現量亦可量測為例如相對於未經改變或未經修飾之野生型細胞之表現增加之倍數(multiple)、倍數(fold)或百分比。舉例而言，在一些實施例中，相對於未經改變或未經修飾之相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47水準，本文所述之細胞表現至少高約0.1×、至少高約0.1×、至少高約0.2×、至少高約0.3×、至少高約0.4×、至少高約0.5×、至少高約0.6×、至少高約0.7×、至少高約0.8×、至少高約0.9×、至少高約2×、至少高約1×、至少高約1.1×、至少高約1.2×、至少高約1.3×、至少高約1.4×、至少高約1.5×、至少高約1.6×、至少高約1.7×、至少高約1.8×、至少高約1.9×、至少高約2×、至少高約2.1×、至少高約2.2×、至少高約2.3×、至少高約2.4×、至少高約2.5×、至少高約2.6×、至少高約2.7×、至少高約2.8×、至少高約2.9×、至少高約3×、至少高約

3.1×、至少高約3.2×、至少高約3.3×、至少高約3.4×、至少高約3.5×、至少高約3.6×、至少高約3.7×、至少高約3.8×、至少高約3.9×、至少高約4×、至少高約4.1×、至少高約4.2×、至少高約4.3×、至少高約4.4×、至少高約4.5×、至少高約4.6×、至少高約4.7×、至少高約4.8×、至少高約4.9×、至少高約5×、至少高約5.1×、至少高約5.2×、至少高約5.3×、至少高約5.4×、至少高約5.5×、至少高約5.6×、至少高約5.7×、至少高約5.8×、至少高約5.9×、至少高約6×、至少高約6.1×、至少高約6.2×、至少高約6.3×、至少高約6.4×、至少高約6.5×、至少高約6.6×、至少高約6.7×、至少高約6.8×、至少高約6.9×、至少高約7×、至少高約7.1×、至少高約7.2×、至少高約7.3×、至少高約7.4×、至少高約7.5×、至少高約7.6×、至少高約7.7×、至少高約7.8×、至少高約7.9×、至少高約8×、至少高約8.1×、至少高約8.2×、至少高約8.3×、至少高約8.4×、至少高約8.5×、至少高約8.6×、至少高約8.7×、至少高約8.8×、至少高約8.9×、至少高約9×、至少高約9.1×、至少高約9.2×、至少高約9.3×、至少高約9.4×、至少高約9.5×、至少高約9.6×、至少高約9.7×、至少高約9.8×、至少高約9.9×、至少高約10×或更大之量之CD47表現。

【0667】在一些實施例中，相對於未經改變或未經修飾之相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47水準，本文所述之細胞表現至少高約0.1倍、至少高約0.2倍、至少

高約0.3倍、至少高約0.4倍、至少高約0.5倍、至少高約0.6倍、至少高約0.7倍、至少高約0.8倍、至少高約0.9倍、至少高約1倍、至少高約1.1倍、至少高約1.2倍、至少高約1.3倍、至少高約1.4倍、至少高約1.5倍、至少高約1.6倍、至少高約1.7倍、至少高約1.8倍、至少高約1.9倍、至少高約2倍、至少高約2.1倍、至少高約2.2倍、至少高約2.3倍、至少高約2.4倍、至少高約2.5倍、至少高約2.6倍、至少高約2.7倍、至少高約2.8倍、至少高約2.9倍、至少高約3倍、至少高約3.1倍、至少高約3.2倍、至少高約3.3倍、至少高約3.4倍、至少高約3.5倍、至少高約3.6倍、至少高約3.7倍、至少高約3.8倍、至少高約3.9倍、至少高約4倍、至少高約4.1倍、至少高約4.2倍、至少高約4.3倍、至少高約4.4倍、至少高約4.5倍、至少高約4.6倍、至少高約4.7倍、至少高約4.8倍、至少高約4.9倍、至少高約5倍、至少高約5.1倍、至少高約5.2倍、至少高約5.3倍、至少高約5.4倍、至少高約5.5倍、至少高約5.6倍、至少高約5.7倍、至少高約5.8倍、至少高約5.9倍、至少高約6倍、至少高約6.1倍、至少高約6.2倍、至少高約6.3倍、至少高約6.4倍、至少高約6.5倍、至少高約6.6倍、至少高約6.7倍、至少高約6.8倍、至少高約6.9倍、至少高約7倍、至少高約7.1倍、至少高約7.2倍、至少高約7.3倍、至少高約7.4倍、至少高約7.5倍、至少高約7.6倍、至少高約7.7倍、至少高約7.8倍、至少高約7.9倍、至少高約8倍、至少高約8.1倍、至少高約8.2倍、至少

高約8.3倍、至少高約8.4倍、至少高約8.5倍、至少高約8.6倍、至少高約8.7倍、至少高約8.8倍、至少高約8.9倍、至少高約9倍、至少高約9.1倍、至少高約9.2倍、至少高約9.3倍、至少高約9.4倍、至少高約9.5倍、至少高約9.6倍、至少高約9.7倍、至少高約9.8倍、至少高約9.9倍、至少高約10倍或更大之量之CD47表現。

【0668】在一些實施例中，相對於未經改變或未經修飾之相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47水準，本文所述之細胞表現至少高約10%、至少高約20%、至少高約30%、至少高約40%、至少高約50%、至少高約60%、至少高約70%、至少高約80%、至少高約90%、至少高約100%、至少高約125%、至少高約150%、至少高約200%、至少高約250%、至少高約300%、至少高約350%、至少高約400%、至少高約450%、至少高約500%、至少高約550%、至少高約600%、至少高約650%、至少高約700%、至少高約750%、至少高約800%、至少高約850%、至少高約900%、至少高約950%、至少高約1000%、至少高約1500%、至少高約2000%、至少高約2500%、至少高約3000%、至少高約3500%、至少高約4000%、至少高約4500%、至少高約5000%、至少高約5500%、至少高約6000%、至少高約6500%、至少高約7000%、至少高約7500%、至少高約8000%、至少高約8500%、至少高約9000%、至少高高約10000%或更大之量之CD47表現。

【0669】CD47表現量亦可量測為例如細胞之CD47分

子數。舉例而言，在一些實施例中，本文所述之細胞表現約150,000至約1,000,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約150,000至約200,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約200,000至約250,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約250,000至約300,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約300,000至約350,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約350,000至約400,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約400,000至約450,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約450,000至約500,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約500,000至約550,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約550,000至約600,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約600,000至約650,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約650,000至約700,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約700,000至約750,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約750,000至約800,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約800,000至約850,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約850,000至約900,000個CD47分

子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約900,000至約950,000個CD47分子/細胞。在一些實施例中，本文所述之細胞表現約950,000至約1,000,000個CD47分子/細胞。

【0670】在一些實施例中，本文所述之細胞表現至少約180,000個CD47分子、至少約190,000個CD47分子、至少約200,000個CD47分子、至少約210,000個CD47分子、至少約220,000個CD47分子、至少約230,000個CD47分子、至少約240,000個CD47分子、至少約250,000個CD47分子、至少約260,000個CD47分子、至少約270,000個CD47分子、至少約280,000個CD47分子、至少約290,000個CD47分子、至少約300,000個CD47分子、至少約210,000個CD47分子、至少約220,000個CD47分子、至少約230,000個CD47分子、至少約240,000個CD47分子、至少約250,000個CD47分子、至少約260,000個CD47分子、至少約270,000個CD47分子、至少約280,000個CD47分子、至少約290,000個CD47分子、至少約300,000個CD47分子、至少約210,000個CD47分子、至少約220,000個CD47分子、至少約230,000個CD47分子、至少約240,000個CD47分子、至少約250,000個CD47分子、至少約260,000個CD47分子、至少約270,000個CD47分子、至少約280,000個CD47分子、至少約290,000個CD47分子、至少約300,000個CD47分子、至少約310,000個CD47分子、至少約320,000個CD47分子、至少約330,000個CD47分

子、至少約340,000個CD47分子、至少約350,000個CD47分子、至少約360,000個CD47分子、至少約370,000個CD47分子、至少約380,000個CD47分子、至少約390,000個CD47分子、至少約400,000個CD47分子、至少約410,000個CD47分子、至少約420,000個CD47分子、至少約430,000個CD47分子、至少約440,000個CD47分子、至少約450,000個CD47分子、至少約460,000個CD47分子、至少約470,000個CD47分子、至少約480,000個CD47分子、至少約490,000個CD47分子、至少約500,000個CD47分子、至少約510,000個CD47分子、至少約520,000個CD47分子、至少約530,000個CD47分子、至少約540,000個CD47分子、至少約550,000個CD47分子、至少約560,000個CD47分子、至少約570,000個CD47分子、至少約580,000個CD47分子、至少約590,000個CD47分子、至少約600,000個CD47分子、至少約610,000個CD47分子、至少約620,000個CD47分子、至少約630,000個CD47分子、至少約640,000個CD47分子、至少約650,000個CD47分子、至少約660,000個CD47分子、至少約670,000個CD47分子、至少約680,000個CD47分子、至少約690,000個CD47分子、至少約700,000個CD47分子、至少約710,000個CD47分子、至少約720,000個CD47分子、至少約730,000個CD47分子、至少約240,000個CD47分子、至少約750,000個CD47分子、至少約760,000個CD47分子、至少約770,000個CD47分子、至少約780,000個CD47分

子、至少約790,000個CD47分子、至少約800,000個CD47分子、至少約810,000個CD47分子、至少約820,000個CD47分子、至少約830,000個CD47分子、至少約840,000個CD47分子、至少約850,000個CD47分子、至少約860,000個CD47分子、至少約870,000個CD47分子、至少約880,000個CD47分子、至少約890,000個CD47分子、至少約900,000個CD47分子、至少約910,000個CD47分子、至少約920,000個CD47分子、至少約930,000個CD47分子、至少約940,000個CD47分子、至少約950,000個CD47分子、至少約960,000個CD47分子、至少約970,000個CD47分子、至少約980,000個CD47分子、至少約990,000個CD47分子、或至少約1,000,000個CD47分子/細胞。

【0671】表現水準可歸因於熟習此項技術者已知之多種因素。舉例而言，編碼CD47之外源多核苷酸之表現水準可能尤其受以下因素之影響：細胞中外源多核苷酸之拷貝數，例如細胞中外源多核苷酸之1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個或更多個拷貝；所存在調控元件，例如本文所述或此項技術中已知之任一調控元件，包括本文所述或此項技術中已知之組成型、可誘導或條件啟動子中之任一者；外源多核苷酸插入細胞之基因體之位置；用於將外源多核苷酸引入細胞中之載體之類型；外源多核苷酸(例如雙順反子)中盒之順序等。

【0672】CD47表現水準係相對於未經改變或未經修飾之相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47水準來量

測。舉例而言，T細胞中由編碼CD47之外源多核苷酸賦予之CD47表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型T細胞之表現水準之表現水準；NK細胞中由編碼CD47之外源多核苷酸賦予之CD47表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型NK細胞之表現水準之表現水準；內皮細胞中由編碼CD47之外源多核苷酸賦予之CD47表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型內皮細胞之表現水準之表現水準；胰島細胞中由編碼CD47之外源多核苷酸賦予之CD47表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型胰島細胞之表現水準之表現水準；心肌細胞中由編碼CD47之外源多核苷酸賦予之CD47表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型心肌細胞之表現水準之表現水準；平滑肌細胞中由編碼CD47之外源多核苷酸賦予之CD47表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型平滑肌細胞之表現水準之表現水準；骨骼肌細胞中由編碼CD47之外源多核苷酸賦予之CD47表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型骨骼肌細胞之表現水準之表現水準；肝細胞中由編碼CD47之外源多核苷酸賦予之CD47表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型肝細胞之表現水準之表現水準；神經膠質祖細胞中由編碼CD47之外源多核苷酸賦予之CD47表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型神經膠質祖細胞之表現水準之表現水準；多巴胺能神經元中由編碼CD47之外源多核苷酸賦予之CD47表現水準

表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型多巴胺能神經元之表現水準之表現水準；視網膜色素上皮細胞中由編碼CD47之外源多核苷酸賦予之CD47表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型視網膜色素上皮細胞之表現水準之表現水準；甲狀腺細胞中由編碼CD47之外源多核苷酸賦予之CD47表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型甲狀腺細胞之表現水準之表現水準。

【0673】在另一實施例中，使用用針對CD47蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測CD47蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認外源CD47 mRNA之存在。

U. CD24

【0674】在一些實施例中，本揭示案提供已經修飾以表現耐受原性因子(*例如*免疫調節多肽) CD24之細胞或其群體。在一些實施例中，本揭示案提供改變細胞基因體以表現CD24之方法。在一些實施例中，幹細胞表現外源CD24。在一些情況下，細胞表現包含編碼人類CD24多肽之核苷酸序列之表現載體。

【0675】CD24 (亦稱為熱穩定抗原或小細胞肺癌簇4抗原)係糖基化糖基磷脂醯肌醇錨定之表面蛋白(Pirruccello等人，J Immunol, 1986, 136, 3779-3784；Chen等人，Glycobiology, 2017, 57, 800-806)。其結合至先天免疫細胞上之Siglec-10。最近已顯示，CD24經由Siglec-10

起先天免疫檢查點之作用(Barkal等人，Nature, 2019, 572, 392-396)。

【0676】在一些實施例中，本文所概述之細胞包含編碼CD24多肽之核苷酸序列，該CD24多肽與NCBI參考編號號NP_001278666.1、NP_001278667.1、NP_001278668.1及NP_037362.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性(*例如*95%、96%、97%、98%、99%或更大)。在一些實施例中，本文所概述之細胞包含編碼CD24多肽之核苷酸序列，該CD24多肽具有NCBI參考編號NP_001278666.1、NP_001278667.1、NP_001278668.1及NP_037362.1中所述之胺基酸序列。

【0677】在一些實施例中，細胞包含與NCBI參考編號NM_00129737.1、NM_00129738.1、NM_001291739.1及NM_013230.3中所述之序列具有至少85%序列一致性(*例如*85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大)之核苷酸序列。在一些實施例中，細胞包含如NCBI參考編號NM_00129737.1、NM_00129738.1、NM_001291739.1及NM_013230.3中所述之核苷酸序列。

【0678】在一些實施例中，使用適宜基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas系統或本文所述之任一基因編輯系統)來促進編碼CD24之多核苷酸插入低免疫原性細胞之基因體基因座中。在一些情形下，編碼CD24之多核苷酸插入安全港或靶基因座(例如但不限於AAVS1、CCR5、CLYBL、

ROSA26、SHS231、F3 (CD142)、MICA、MICB、LRP1 (CD91)、HMGB1、ABO、RHD、FUT1或KDM5D基因座)中。在一些實施例中，編碼CD24之多核苷酸插入B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座或TRB基因座中。在一些實施例中，編碼CD24之多核苷酸插入本文所提供之表15中所繪示基因座之任一者中。在某些實施例中，編碼CD24之多核苷酸可操作連接至啟動子。

【0679】在另一實施例中，使用用針對CD24蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測CD24蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認外源CD24 mRNA之存在。

【0680】在一些實施例中，使用適宜基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas系統或本文所述之任一基因編輯系統)來促進編碼CD24之多核苷酸插入低免疫原性細胞之基因體基因座中。在一些情形下，編碼CD24之多核苷酸插入安全港或靶基因座(例如但不限於AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3 (亦稱為CD142)、MICA、MICB、LRP1 (亦稱為CD91)、HMGB1、ABO、RHD、FUT1或KDM5D基因座)中。在一些實施例中，編碼CD24之多核苷酸插入B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座或TRB基因座中。在一些實施例中，編碼CD24之多核苷酸插入本文所提供之表15中所繪示基因座之任一者中。在某些實施

V. DUX4

【0681】在一些實施例中，本揭示案提供細胞(*例如*幹細胞、誘導性多能幹細胞、分化細胞、造血幹細胞、原代T細胞或CAR-T細胞)或其群體，其包含經修飾以增加耐受原性或免疫阻抑因子(例如DUX4)之表現之基因體。在一些實施例中，本揭示案提供改變細胞之基因體以提供增加的DUX4表現之方法。在一些實施例中，本揭示案提供包含外源表現之DUX4蛋白之細胞或其群體。在一些實施例中，增加的DUX4表現會阻抑、減少或消除以下MHC I分子中一或多者之表現：HLA-A、HLA-B及HLA-C。

【0682】DUX4係在胚胎組織及誘導性多能幹細胞中有活性、且在正常、健康體細胞組織中沈默之轉錄因子(Feng等人，2015, ELife4；De Iaco等人，2017, Nat Genet, 49, 941-945；Hendrickson等人，2017, Nat Genet, 49, 925-934；Snider等人，2010, PLoS Genet, e1001181；Whiddon等人，2017, Nat Genet)。DUX4表現用於阻斷主要組織相容性複合物(MHC) I類基因表現(*例如*，*B2M*、*HLA-A*、*HLA-B*及*HLA-C*之表現)之IFN-γ介導之誘導。DUX4表現與阻抑的MHC I類抗原呈遞相關(Chew等人，Developmental Cell, 2019, 50, 1-14)。DUX4在裂解階段基因表現(轉錄)程式中用作轉錄因子。其靶基因包括(但不限於)編碼基因、非編碼基因及重複元件。

【0683】存在至少兩種DUX4同功型，其中最長的同功型包含DUX4 C末端轉錄活化結構域。同功型係藉由選擇式剪接產生。參見例如Geng等人，2012, Dev Cell, 22,

38-51；Snider等人，2010, PLoS Genet, e1001181。DUX4之活性同功型包含其N末端DNA結合結構域及其C末端活化結構域。參見例如Choi等人，2016, Nucleic Acid Res, 44, 5161-5173。

【0684】已顯示，減少DUX4之CpG基元數會減少DUX4轉基因之沈默(Jagannathan等人，Human Molecular Genetics, 2016, 25(20):4419-4431)。Jagannathan等人，見上文中所提供之核酸序列代表DUX4之密碼子改變序列，其包含一或多個鹼基取代以減少CpG位點之總數，同時保留DUX4蛋白序列。核酸序列可自Addgene購得，目錄號99281。

【0685】在許多實施例中，可利用至少一或多種多核苷酸來促進細胞(例如幹細胞、誘導性多能幹細胞、分化細胞、造血幹細胞、原代T細胞或CAR-T細胞)對DUX4之外源表現。

【0686】在一些實施例中，使用適宜基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas系統或本文所述之任一基因編輯系統)來促進編碼DUX4之多核苷酸插入低免疫原性細胞之基因體基因座中。在一些情形下，編碼DUX4之多核苷酸插入安全港或靶基因座(例如但不限於AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3 (CD142)、MICA、MICB、LRP1 (CD91)、HMGB1、ABO、RHD、FUT1或KDM5D基因座)中。在一些實施例中，編碼DUX4之多核苷酸插入B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座或TRB基因座中。在一些實施例中，編碼DUX4之多核苷酸插入本文所提供之表

15中所繪示基因座之任一者中。在某些實施例中，編碼DUX4之多核苷酸可操作連接至啟動子。

【0687】在一些實施例中，編碼DUX4之多核苷酸序列包含含有DUX4之密碼子改變核苷酸序列之多核苷酸序列，該密碼子改變核苷酸序列包含一或多個鹼基取代以減少CpG位點之總數，同時保留DUX4蛋白序列。在一些實施例中，包含一或多個鹼基取代以減少CpG位點總數的編碼DUX4之多核苷酸序列與於2020年7月31日提出申請之PCT/US2020/44635之SEQ ID NO:1具有至少85%（*例如*85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列一致性。在一些實施例中，編碼DUX4之多核苷酸序列係PCT/US2020/44635之SEQ ID NO:1。

【0688】在一些實施例中，編碼DUX4之多核苷酸序列係編碼多肽序列之核苷酸序列，該多肽序列與選自包括以下之群之序列具有至少95%（*例如*95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列一致性：如PCT/US2020/44635中所提供之SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、

SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28及SEQ ID NO:29。在一些實施例中，編碼DUX4之多核苷酸序列係編碼多肽序列之核苷酸序列，該多肽序列選自包括以下之群：SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28及SEQ ID NO:29。如SEQ ID NO:2-29中所述之胺基酸序列顯示於PCT/US2020/44635之圖1A-1G中。

【0689】在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ACN62209.1中所述之序列或GenBank登錄號ACN62209.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與NCBI參考序列號NP_001280727.1中所述之序列或NCBI參考序列號NP_001280727.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ACP30489.1中所述之序列或GenBank登錄號ACP30489.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與UniProt編號P0CJ85.1中所述之序列或UniProt編號

P0CJ85.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號AUA60622.1中所述之序列或GenBank登錄號AUA60622.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24683.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24683.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ACN62210.1中所述之序列或GenBank登錄號ACN62210.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24706.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24706.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24685.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24685.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ACP30488.1中所述之序列或GenBank登錄號ACP30488.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24687.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24687.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ACP30487.1中所述之序列或GenBank登錄

號ACP30487.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24717.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24717.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24690.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24690.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24689.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24689.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24692.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24692.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24693.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24693.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24712.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24712.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24691.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24691.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與UniProt編號P0CJ87.1中所述之序列或UniProt編號

P0CJ87.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24714.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24714.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24684.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24684.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24695.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24695.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與GenBank登錄號ADK24699.1中所述之序列或GenBank登錄號ADK24699.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與NCBI參考序列號NP_001768.1中所述之序列或NCBI參考序列號NP_001768中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與NCBI參考序列號NP_942088.1中所述之序列或NCBI參考序列號NP_942088.1中所述之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與PCT/US2020/44635中所提供之SEQ ID NO:28或PCT/US2020/44635中所提供之SEQ ID NO:28之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。在一些情況下，DUX4多肽包含與PCT/US2020/44635中所提供之SEQ ID

NO:29或PCT/US2020/44635中所提供之SEQ ID NO:29之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。

【0690】在其他實施例中，使用表現載體來促進耐受原性因子之表現。在一些實施例中，表現載體包含編碼DUX4之多核苷酸序列，其係密碼子改變序列，該密碼子改變序列包含一或多個鹼基取代以減少CpG位點之總數，同時保留DUX4蛋白序列。在一些情形下，DUX4之密碼子改變序列包含PCT/US2020/44635之SEQ ID NO:1。在一些情形下，DUX4之密碼子改變序列係PCT/US2020/44635之SEQ ID NO:1。在其他實施例中，表現載體包含編碼DUX4之多核苷酸序列，其包含PCT/US2020/44635之SEQ ID NO:1。在一些實施例中，表現載體包含編碼DUX4多肽序列之多核苷酸序列，該多肽序列與選自包括以下之群之序列具有至少95%序列一致性：PCT/US2020/44635之SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28及SEQ ID NO:29。在一些實施例中，表現載體包含編碼DUX4多肽序列之多核苷酸序列，該多肽序列選自包括以下之群：PCT/US2020/44635之SEQ

ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28及SEQ ID NO:29。

【0691】DUX4表現之增加可使用已知技術(例如西方墨點、ELISA分析、FACS分析、免疫分析及諸如此類)來分析。

W. 其他耐受原性因子

【0692】在某些實施例中，一或多種耐受原性因子可插入或再插入基因體編輯細胞中以產生免疫特權通用供體細胞，例如通用供體幹細胞、通用供體T細胞或通用供體細胞。在某些實施例中，本文所揭示之低免疫原性細胞已進一步經修飾以表現一或多種耐受原性因子。例示性耐受原性因子包括(但不限於)以下中之一或多者：CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及Serpinb9。在一些實施例中，耐受原

性因子選自由以下組成之群：CD200、HLA-G、HLA-E、HLA-C、HLA-E重鏈、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、IL-10、IL-35、FasL、Serpinb9、CCL21、CCL22及Mfge8。在一些實施例中，耐受原性因子選自由以下組成之群：DUX4、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、PD-L1、CTLA-4-Ig、C1抑制劑及IL-35。在一些實施例中，耐受原性因子選自由以下組成之群：HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、PD-L1、CTLA-4-Ig、C1抑制劑及IL-35。在一些實施例中，耐受原性因子選自包括以下之群：CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及Serpinb9。

【0693】關於人類CD27 (其亦稱為CD27L受體、腫瘤壞死因子受體超家族成員7、TNFSF7、T細胞活化抗原S152、Tp55及T14)之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC12P008144、HGNC編號11922、NCBI基因ID 939、Uniprot編號P26842及NCBI參考序列號NM_001242.4及NP_001233.1中。

【0694】關於人類CD46之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC01P207752、HGNC編號6953、NCBI基因ID 4179、Uniprot編號P15529及NCBI參考序列號NM_002389.4、NM_153826.3、

NM_172350.2、NM_172351.2、NM_172352.2 NP_758860.1、NM_172353.2、NM_172359.2、NM_172361.2、NP_002380.3、NP_722548.1、NP_758860.1、NP_758861.1、NP_758862.1、NP_758863.1、NP_758869.1及NP_758871.1中。

【0695】關於人類CD55(亦稱為補體衰變加速因子)之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC01P207321、HGNC編號2665、NCBI基因ID 1604、Uniprot編號P08174及NCBI參考序列號NM_000574.4、NM_001114752.2、NM_001300903.1、NM_001300904.1、NP_000565.1、NP_001108224.1、NP_001287832.1及NP_001287833.1中。

【0696】關於人類CD59之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC11M033704、HGNC編號1689、NCBI基因ID 966、Uniprot編號P13987及NCBI參考序列號NP_000602.1、NM_000611.5、NP_001120695.1、NM_001127223.1、NP_001120697.1、NM_001127225.1、NP_001120698.1、NM_001127226.1、NP_001120699.1、NM_001127227.1、NP_976074.1、NM_203329.2、NP_976075.1、NM_203330.2、NP_976076.1及NM_203331.2中。

【0697】關於人類CD200之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC03P112332、HGNC編號7203、NCBI基因ID 4345、Uniprot編號P41217

及NCBI參考序列號NP_001004196.2、NM_001004196.3、NP_001305757.1、NM_001318828.1、NP_005935.4、NM_005944.6、XP_005247539.1及XM_005247482.2中。

【0698】關於人類HLA-C之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC06M031272、HGNC編號4933、NCBI基因ID 3107、Uniprot編號P10321及NCBI參考序列號NP_002108.4及NM_002117.5中。

【0699】關於人類HLA-E之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC06P047281、HGNC編號4962、NCBI基因ID 3133、Uniprot編號P13747及NCBI參考序列號NP_005507.3及NM_005516.5中。

【0700】關於人類HLA-G之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC06P047256、HGNC編號4964、NCBI基因ID 3135、Uniprot編號P17693及NCBI參考序列號NP_002118.1及NM_002127.5中。

【0701】關於人類PD-L1或CD274之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC09P005450、HGNC編號17635、NCBI基因ID 29126、Uniprot編號Q9NZQ7及NCBI參考序列號NP_001254635.1、NM_001267706.1、NP_054862.1及NM_014143.3中。

【0702】關於人類IDO1之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC08P039891、HGNC編號6059、NCBI基因ID 3620、Uniprot編號P14902及NCBI參考序列號NP_002155.1及NM_002164.5中。

【0703】關於人類IL-10之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC01M206767、HGNC編號5962、NCBI基因ID 3586、Uniprot編號P22301及NCBI參考序列號NP_000563.1及NM_000572.2中。

【0704】關於人類Fas配位體(其稱為FasL、FASLG、CD178、TNFSF6及諸如此類)之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC01P172628、HGNC編號11936、NCBI基因ID 356、Uniprot編號P48023及NCBI參考序列號NP_000630.1、NM_000639.2、NP_001289675.1及NM_001302746.1中。

【0705】關於人類CCL21之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC09M034709、HGNC編號10620、NCBI基因ID 6366、Uniprot編號O00585及NCBI參考序列號NP_002980.1及NM_002989.3中。

【0706】關於人類CCL22之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC16P057359、HGNC編號10621、NCBI基因ID 6367、Uniprot編號O00626及NCBI參考序列號NP_002981.2、NM_002990.4、XP_016879020.1及XM_017023531.1中。

【0707】關於人類Mfge8之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC15M088898、HGNC編號7036、NCBI基因ID 4240、Uniprot編號Q08431及NCBI參考序列號NP_001108086.1、NM_001114614.2、NP_001297248.1、NM_001310319.1、NP_001297249.1、

NM_001310320.1、NP_001297250.1、NM_001310321.1、NP_005919.2及NM_005928.3中。

【0708】關於人類SerpinB9之有用基因體、多核苷酸及多肽資訊提供於例如GeneCard標識符GC06M002887、HGNC編號8955、NCBI基因ID 5272、Uniprot編號P50453及NCBI參考序列號NP_004146.1、NM_004155.5、XP_005249241.1及XM_005249184.4中。

【0709】用於調節基因及因子(蛋白質)表現之方法包括基因體編輯技術及RNA或蛋白質表現技術及諸如此類。對於所有該等技術，使用熟知之重組技術，以生成如本文所概述之重組核酸。

【0710】在一些實施例中，細胞(*例如*幹細胞、誘導性多能幹細胞、分化細胞、造血幹細胞、原代T細胞或CAR-T細胞)具有使B2M及CIITA基因失活且表現複數種外源多肽之遺傳修飾，該複數種外源多肽選自包括以下之群：CD47及DUX4、CD47及CD24、CD47及CD27、CD47及CD46、CD47及CD55、CD47及CD59、CD47及CD200、CD47及HLA-C、CD47及HLA-E、CD47及HLA-E重鏈、CD47及HLA-G、CD47及PD-L1、CD47及IDO1、CD47及CTLA4-Ig、CD47及C1抑制劑、CD47及IL-10、CD47及IL-35、CD47及IL-39、CD47及FasL、CD47及CCL21、CD47及CCL22、CD47及Mfge8、以及CD47及Serpinb9及其任一組合。在一些情況下，該等細胞亦具有使CD142基因失活之遺傳修飾。

【0711】在一些情況下，使用基因編輯系統(例如CRISPR/Cas系統)促進耐受原性因子(例如耐受原性因子)插入安全港或靶基因座(例如AAVS1基因座)中，以主動抑制免疫排斥。在一些情況下，使用表現載體將耐受原性因子插入安全港或靶基因座中。在一些實施例中，安全港或靶基因座係AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3(亦稱為CD142)、MICA、MICB、LRP1(亦稱為CD91)、HMGB1、ABO、RHD、FUT1或KDM5D基因座。

【0712】在一些實施例中，藉由表現含有以下之融合蛋白或蛋白質複合物來增加靶基因(*例如*CD47或另一耐受原性因子基因)之表現：(1)特異性針對內源靶基因之位點特異性結合結構域(*例如*CD47或另一耐受原性因子基因)及(2)轉錄活化劑。

【0713】在一些實施例中，調控因子包含位點特異性DNA結合核酸分子，例如引導RNA (gRNA)。在一些實施例中，該方法係藉由位點特異性DNA結合靶向蛋白(例如鋅指蛋白(ZFP)或含有ZFP之融合蛋白，其亦稱為鋅指核酸酶(ZFN))來達成。

【0714】在一些實施例中，調控因子包含位點特異性結合結構域，例如使用DNA結合蛋白或DNA結合核酸，其與靶向區域之基因特異性結合或雜交。在一些實施例中，所提供多核苷酸或多肽與位點特異性核酸酶(例如經修飾核酸酶)偶合或複合。舉例而言，在一些實施例中，使用

包含經修飾核酸酶之DNA靶向蛋白之融合物來實現投與，該經修飾核酸酶係例如大範圍核酸酶或RNA引導核酸酶，例如成簇規則散佈之短迴文核酸(CRISPR)-Cas系統，例如CRISPR-Cas9系統。在一些實施例中，核酸酶經修飾以缺乏核酸酶活性。在一些實施例中，經修飾核酸酶係催化死亡之dCas9。

【0715】在一些實施例中，位點特異性結合結構域可衍生自核酸酶。舉例而言，歸巢核酸內切酶及大範圍核酸酶(例如I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII及I-TevIII)之識別序列。亦參見美國專利第5,420,032號；美國專利第6,833,252號；Belfort等人(1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388；Dujon等人(1989) Gene 82:115-118；Perler等人(1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127；Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228；Gimble等人(1996) J. Mol. Biol. 263:163-180；Argast等人(1998) J. Mol. Biol. 280:345-353及New England Biolabs目錄。另外，歸巢核酸內切酶及大範圍核酸酶之DNA結合特異性可經改造以結合非天然靶位點。參見例如Chevalier等人(2002) Molec. Cell 10:895-905；Epinat等人(2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962；Ashworth等人(2006) Nature 441:656-659；Paques等人(2007) Current Gene Therapy 7:49-66；美國專利公開案第2007/0117128號。

【0716】鋅指、TALE及CRISPR系統結合結構域可

「經改造」以結合至預定核苷酸序列，例如經由改造天然鋅指或TALE蛋白之識別螺旋區域(改變一或多個胺基酸)。經改造之DNA結合蛋白(鋅指或TALE)係非天然蛋白質。合理的設計標準包括應用取代規則及電腦化算法來處理資料庫中之資訊，該資料庫存儲現有ZFP及/或TALE設計及結合資料之資訊。參見例如美國專利第6,140,081號；美國專利第6,453,242號；及美國專利第6,534,261號；亦參見WO 98/53058；WO 98/53059；WO 98/53060；WO 02/016536及WO 03/016496及美國公開案第20110301073號。

【0717】在一些實施例中，位點特異性結合結構域包含一或多種鋅指蛋白(ZFP)或其以序列特異性方式結合至DNA之結構域。ZFP或其結構域係經由一或多個鋅指以序列特異性方式結合DNA之較大蛋白質內之蛋白質或結構域，該一或多個鋅指係結合結構域內之胺基酸序列之區域，其結構經由鋅離子之配位而穩定。

【0718】在ZFP中係人工ZFP結構域，其靶向特定DNA序列，通常長9-18個核苷酸，藉由個別指之組裝產生。ZFP包括其中單指結構域之長度為約30個胺基酸且含有α螺旋之彼等ZFP，該α螺旋含有經由鋅與單一β轉折之兩個半胱胺酸配位之兩個不變的組胺酸殘基，且具有兩個、三個、四個、五個或六個指。通常，ZFP之序列特異性可藉由在鋅指識別螺旋上之四個螺旋位置(-1、2、3及6)製造胺基酸取代來改變。因此，在一些實施例中，ZFP或含ZFP之分子係非天然的，例如經改造以結合至所選靶位

點。參見例如Beerli等人(2002) Nature Biotechnol. 20:135-141；Pabo等人(2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340；Isalan等人(2001) Nature Biotechnol. 19:656-660；Segal等人(2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637；Choo等人(2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416；美國專利第6,453,242號；美國專利第6,534,261號；美國專利第6,599,692號；美國專利第6,503,717號；美國專利第6,689,558號；美國專利第7,030,215號；美國專利第6,794,136號；美國專利第7,067,317號；美國專利第7,262,054號；美國專利第7,070,934號；美國專利第7,361,635號；美國專利第7,253,273號；及美國專利公開案第2005/0064474號；美國專利公開案第2007/0218528號；美國專利公開案第2005/0267061號，所有該等專利之全文皆以引用方式併入本文中。

【0719】許多基因特異性經改造鋅指在市面上有售。舉例而言，Sangamo Biosciences (Richmond, CA, USA)已與Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)合作開發出鋅指構築平台(CompoZr)，從而允許研究者完全繞過鋅指構築及驗證，且為數千種蛋白質提供特異性靶向之鋅指(Gaj等人，Trends in Biotechnology, 2013, 31(7), 397-405)。在一些實施例中，使用市售鋅指或經定制設計。

【0720】在一些實施例中，位點特異性結合結構域包含天然或經改造之(非天然)轉錄活化劑樣蛋白(TAL) DNA結合結構域，例如在轉錄活化劑樣蛋白效應物(TALE)蛋白

中，參見例如美國專利公開案第20110301073號，其全文皆以引用方式併入本文中。

【0721】在一些實施例中，位點特異性結合結構域衍生自CRISPR/Cas系統。一般而言，「CRISPR系統」統指參與CRISPR相關(「Cas」)基因之表現或引導其活性之轉錄物及其他元件，包括編碼Cas基因之序列、tracr (反式活化CRISPR)序列(*例如*tracrRNA或活性部分tracrRNA)、tracr配對序列(在內源CRISPR系統之上下文中涵蓋「直接重複」及tracrRNA處理之部分直接重複)、引導序列(在內源CRISPR系統之上下文中亦稱為「間隔體」，或「靶向序列」)及/或來自CRISPR基因座之其他序列及轉錄物。

【0722】一般而言，引導序列包括靶向結構域，其包含與靶多核苷酸序列具有足夠互補性以與靶序列雜交且引導CRISPR複合物與靶序列之序列特異性結合的多核苷酸序列。在一些實施例中，當使用適宜比對算法進行最佳比對時，引導序列與其相應靶序列之間之互補度為約或大於約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%或更大。在一些實例中，gRNA之靶向結構域與靶核酸上之靶序列互補，例如至少80%、85%、90%、95%、98%或99%互補，例如完全互補。

【0723】在一些實施例中，靶位點在靶基因之轉錄起始位點上游。在一些實施例中，靶位點鄰近基因之轉錄起始位點。在一些實施例中，靶位點鄰近基因之轉錄起始位點下游之RNA聚合酶暫停位點。

【0724】在一些實施例中，靶向結構域經構形以靶向靶基因之啟動子區域，以促進轉錄起始、一或多種轉錄增強子或活化劑及/或RNA聚合酶之結合。可使用一或多個gRNA來靶向基因之啟動子區。在一些實施例中，可靶向基因之一或多個區域。在某些態樣中，靶位點在基因之轉錄起始位點(TSS)之任一側之600個鹼基對內。

【0725】熟習此項技術者能夠設計或鑑別gRNA序列，其係或包含序列靶向基因，包括外顯子序列及調控區序列，包括啟動子及活化劑。可公開獲得用於CRISPR基因體編輯之全基因體gRNA資料庫，其含有人類基因體或小鼠基因體中基因之組成型外顯子中之例示性單一引導RNA (sgRNA)靶序列(參見例如genescript.com/gRNA-database.html；亦參見Sanjana等人(2014) Nat. Methods, 11:783-4；www.e-crisp.org/E-CRISP/; crispr.mit.edu/)。在一些實施例中，gRNA序列係或包含與非靶基因具有最小脫靶結合之序列。

【0726】在一些實施例中，調控因子進一步包含功能結構域，例如轉錄活化劑。

【0727】在一些實施例中，轉錄活化劑係或含有一或多種調控元件，例如靶基因之一或多種轉錄控制元件，藉此識別如上文所提供之位點特異性結構域以驅動該基因之表現。在一些實施例中，轉錄活化劑驅動靶基因之表現。在一些情形下，轉錄活化劑可為或含有異源反式活化結構域之全部或一部分。舉例而言，在一些實施例中，轉錄活

化劑選自單純疱疹源性反式活化結構域、Dnmt3a甲基轉移酶結構域、p65、VP16及VP64。

【0728】在一些實施例中，調控因子係鋅指轉錄因子(ZF-TF)。在一些實施例中，調控因子係VP64-p65-Rta(VPR)。

【0729】在某些實施例中，調控因子進一步包含轉錄調控結構域。常見結構域包括例如轉錄因子結構域(活化劑、抑制子、共活化劑、共抑制子)、沈默子、致癌基因(*例如*myc、jun、fos、myb、max、mad、rel、ets、bcl、myb、mos家族成員等)；DNA修復酶及其相關因子及修飾劑；DNA重排酶及其相關因子及修飾劑；染色質相關蛋白及其修飾劑(*例如*激酶、乙醯酶及去乙醯酶)；及DNA修飾酶(*例如*甲基轉移酶，例如DNMT家族之成員(*例如*DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L等、拓撲異構酶、解旋酶、連接酶、激酶、磷酸酶、聚合酶、核酸內切酶)及其相關因子及修飾劑。參見例如美國公開案第2013/0253040號，其全文皆以引用方式併入本文中。

【0730】適於達成活化之結構域包括HSV VP 16活化結構域(參見例如Hagmann等人，J. Virol. 71, 5952-5962 (197))、核激素受體(參見例如Torchia等人，Curr. Opin. Cell. Biol. 10:373-383 (1998))；核因子κB之p65次單元(Bitko及Bank, J. Virol. 72:5610-5618 (1998)以及Doyle及Hunt, Neuroreport 8:2937-2942 (1997))；Liu等人，Cancer Gene Ther. 5:3-28 (1998))或人工嵌合功能結構域(例如

VP64) (Beerli等人(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14623-33)及降解子(Molinari等人(1999) EMBO J. 18, 6439-6447)。其他例示性活化結構域包括Oct 1、Oct-2A、Spl、AP-2及CTF1 (Seipel等人，EMBOJ.11, 4961-4968 (1992))以及p300、CBP、PCAF、SRC1 PvALF、AtHD2A及ERF-2。參見例如Robyr等人(2000) Mol. Endocrinol. 14:329-347；Collingwood等人(1999) J. Mol. Endocrinol 23:255-275；Leo等人(2000) Gene 245:1-11；Manteuffel-Cymborowska (1999) Acta Biochim. Pol. 46:77-89；McKenna等人(1999) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 69:3-12；Malik等人(2000) Trends Biochem. Sci. 25:277-283；及Lemon等人(1999) Curr. Opin. Genet. Dev. 9:499-504。其他例示性活化結構域包括(但不限於) OsGAI、HALF-1、C1、AP1、ARF-5、ARF-6、ARF-1及ARF-8、CPRF1、CPRF4、MYC-RP/GP及TRAB1，參見例如Ogawa等人(2000) Gene 245:21-29；Okanami等人(1996) Genes Cells 1:87-99；Goff等人(1991) Genes Dev. 5:298-309；Cho等人(1999) Plant Mol Biol 40:419-429；Ulmason等人(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:5844-5849；Sprenger-Haussels等人(2000) Plant J. 22:1-8；Gong等人(1999) Plant Mol. Biol. 41:33-44；及Hobo等人(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:15,348-15,353。

【0731】可用於製造遺傳抑制子之例示性抑制結構域包括(但不限於) KRAB A/B、KOX、TGF-β可誘導早期基因

(TIEG)、v-erbA、SID、MBD2、MBD3、DNMT家族成員(*例如*DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L等)、Rb及MeCP2。參見例如Bird等人(1999) Cell 99:451-454；Tyler等人(1999) Cell 99:443-446；Knoepfler等人(1999) Cell 99:447-450；及Robertson等人(2000) Nature Genet. 25:338-342。其他例示性抑制結構域包括(但不限於) ROM2及AtHD2A。參見例如Chem等人(1996) Plant Cell 8:305-321；及Wu等人(2000) Plant J. 22:19-27。

【0732】在一些情況下，結構域參與染色體之表觀遺傳調控。在一些實施例中，結構域係組蛋白乙醯基轉移酶(HAT)，例如A型核定位HAT，例如MYST家族成員MOZ、Ybf2/Sas3、MOF及Tip60、GNAT家族成員Gcn5或pCAF、p300家族成員CBP、p300或Rtt109 (Bemdsen及Denu (2008) Curr Opin Struct Biol 18(6):682-689)。在其他情況下，結構域係組蛋白去乙醯酶(HD AC)，例如I類(HDAC-1、2、3及8)、II類(HDAC IIA (HDAC-4、5、7及9)、HD AC IIB (HDAC 6及10))、IV類(HDAC-11)、III類(亦稱為長壽蛋白(SIRT)；SIRT1-7) (參見Mottamal等人(2015) Molecules 20(3):3898-3941)。在一些實施例中使用之另一結構域係組蛋白磷酸化酶或激酶，其中實例包括MSK1、MSK2、ATR、ATM、DNA-PK、Bubl、VprBP、IKK-a、PKCpi、Dik/Zip、JAK2、PKC5、WSTF及CK2。在一些實施例中，使用甲基化結構域且其可選自諸如以下之群：Ezh2、PRMT1/6、PRMT5/7、PRMT 2/6、CARM1、set7/9、

MLL、ALL-1、Suv 39h、G9a、SETDB1、Ezh2、Set2、Dotl、PRMT 1/6、PRMT 5/7、PR-Set7及Suv4-20h。在一些實施例中亦可使用參與小泛素化及生物素化之結構域(Lys9、13、4、18及12)(綜述參見Kousarides (2007) Cell 128:693-705)。

【0733】融合分子係藉由熟習此項技術者熟知之選殖及生物化學結合方法來構築。融合分子包含DNA結合結構域及功能結構域(*例如*轉錄活化或抑制結構域)。融合分子亦視情況地包含核定位信號(例如來自SV40培養基T抗原)及抗原決定基標籤(例如FLAG及血球凝集素)。融合蛋白(及編碼其之核酸)經設計，使得轉譯閱讀框保留在融合物組分中。

【0734】一方面之功能結構域(或其功能片段)之多肽組分及另一方面之非蛋白質DNA結合結構域(*例如*抗生素、嵌入劑、小溝結合劑、核酸)之間的融合物係藉由熟習此項技術者已知之生物化學結合方法來構築。參見例如Pierce Chemical Company (Rockford, IL)目錄。業內已闡述用於製造小溝結合劑與多肽之間的融合物之方法及組合物。Mapp等人(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3930-3935。同樣，CRISPR/Cas TF及包含與多肽組分功能結構域相關之sgRNA核酸組分之核酸酶亦為熟習此項技術者已知且詳述於本文中。

【0735】在一些實施例中，本揭示案提供細胞(*例如*原代T細胞及低免疫原性幹細胞及其衍生物)或其群體，其

包含基因體，其中細胞基因體已經修飾以可調控地表現CD47。在一些實施例中，本揭示案提供改變細胞基因體以可調控地表現CD47之方法。在某些實施例中，可利用至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸來促進CD47插入細胞株中。在某些實施例中，至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸選自由WO2016183041之表29之SEQ ID NO:200784-231885組成之群，該專利以引用方式併入本文中。

【0736】在一些實施例中，本揭示案提供細胞(*例如*原代T細胞及低免疫原性幹細胞及其衍生物)或其群體，其包含基因體，其中細胞基因體已經修飾以表現HLA-C。在一些實施例中，本揭示案提供改變細胞基因體以表現HLA-C之方法。在某些實施例中，可利用至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸來促進HLA-C插入細胞株中。在某些實施例中，至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸選自由WO2016183041之表10之SEQ ID NO:3278-5183組成之群，該專利以引用方式併入本文中。

【0737】在一些實施例中，本揭示案提供細胞(*例如*原代T細胞及低免疫原性幹細胞及其衍生物)或其群體，其包含基因體，其中細胞基因體已經修飾以表現HLA-E。在一些實施例中，本揭示案提供改變細胞基因體以表現HLA-E之方法。在某些實施例中，可利用至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸來促進HLA-E插入細胞株中。在某些實施例中，至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸選自

由WO2016183041之表19之SEQ ID NO:189859-193183組成之群，該專利以引用方式併入本文中。

【0738】在一些實施例中，本揭示案提供細胞(*例如*原代T細胞及低免疫原性幹細胞及其衍生物)或其群體，其包含基因體，其中細胞基因體已經修飾以表現HLA-F。在一些實施例中，本揭示案提供改變細胞基因體以表現HLA-F之方法。在某些實施例中，可利用至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸來促進HLA-F插入細胞株中。在某些實施例中，至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸選自由WO2016183041之表45之SEQ ID NO: 688808-399754組成之群，該專利以引用方式併入本文中。

【0739】在一些實施例中，本揭示案提供細胞(*例如*原代T細胞及低免疫原性幹細胞及其衍生物)或其群體，其包含基因體，其中細胞基因體已經修飾以表現HLA-G。在一些實施例中，本揭示案提供改變細胞基因體以表現HLA-G之方法。在某些實施例中，可利用至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸來促進HLA-G插入幹細胞株中。在某些實施例中，至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸選自由WO2016183041之表18之SEQ ID NO:188372-189858組成之群，該專利以引用方式併入本文中。

【0740】在一些實施例中，本揭示案提供細胞(*例如*原代T細胞及低免疫原性幹細胞及其衍生物)或其群體，其包含基因體，其中細胞基因體已經修飾以表現PD-L1。在一些實施例中，本揭示案提供改變細胞基因體以表現PD-

L1之方法。在某些實施例中，可利用至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸來促進PD-L1插入幹細胞株中。在某些實施例中，至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸選自由WO2016183041之表21之SEQ ID NO:193184-200783組成之群，該專利以引用方式併入本文中。

【0741】在一些實施例中，本揭示案提供細胞(*例如*原代T細胞及低免疫原性幹細胞及其衍生物)或其群體，其包含基因體，其中細胞基因體已經修飾以表現CTLA4-Ig。在一些實施例中，本揭示案提供改變細胞基因體以表現CTLA4-Ig之方法。在某些實施例中，可利用至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸來促進CTLA4-Ig插入幹細胞株中。在某些實施例中，至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸選自WO2016183041中所揭示之任一者，包括序列表。

【0742】在一些實施例中，本揭示案提供細胞(*例如*原代T細胞及低免疫原性幹細胞及其衍生物)或其群體，其包含基因體，其中細胞基因體已經修飾以表現CI抑制劑。在一些實施例中，本揭示案提供改變細胞基因體以表現CI抑制劑之方法。在某些實施例中，可利用至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸來促進CI抑制劑插入幹細胞株中。在某些實施例中，至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸選自WO2016183041中所揭示之任一者，包括序列表。

【0743】在一些實施例中，本揭示案提供細胞(*例如*原代T細胞及低免疫原性幹細胞及其衍生物)或其群體，其

包含基因體，其中細胞基因體已經修飾以表現IL-35。在一些實施例中，本揭示案提供改變細胞基因體以表現IL-35之方法。在某些實施例中，可利用至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸來促進IL-35插入幹細胞株中。在某些實施例中，至少一種核糖核酸或至少一對核糖核酸選自WO2016183041中所揭示之任一者，包括序列表。

【0744】在一些實施例中，耐受原性因子係使用表現載體在細胞中表現。舉例而言，用於在細胞中表現CD47之表現載體包含編碼CD47之多核苷酸序列。表現載體可為可誘導表現載體。表現載體可為病毒載體，例如(但不限於)慢病毒載體。在一些實施例中，使用選自由以下組成之群之促融劑介導之遞送或轉座酶系統將耐受原性因子引入細胞中：條件或可誘導轉座酶、條件或可誘導PiggyBac轉座子、條件或可誘導睡美人(SB11)轉座子、條件或可誘導Mos1轉座子及條件或可誘導Tol2轉座子。

【0745】在一些實施例中，使用適宜基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas系統或本文所述之任一基因編輯系統)來促進編碼耐受原性因子之多核苷酸插入低免疫原性細胞之基因體基因座中。在一些情形下，編碼耐受原性因子之多核苷酸插入安全港或靶基因座(例如但不限於AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3 (CD142)、MICA、MICB、LRP1 (CD91)、HMGB1、ABO、RHD、FUT1或KDM5D基因座)中。在一些實施例中，編碼耐受原性因子之多核苷酸插入B2M基因座、CIITA基因座、TRAC

基因座或TRB基因座中。在一些實施例中，編碼耐受原性因子之多核苷酸插入本文所提供之表16中所繪示基因座之任一者中。在某些實施例中，編碼耐受原性因子之多核苷酸可操作連接至啟動子。

【0746】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞經改造以表現增加量之以下中之一或多者：CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。

【0747】增加的CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現量可量測為例如相對於未經改變或未經修飾之野生型細胞之表現的倍數(multiple)、倍數(fold)或百分比。舉例而言，在一些實施例中，本文所述之細胞表現未經改變或未經修飾之相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、

CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9水準的至少約1×、至少約1.1×、至少約1.2×、至少約1.3×、至少約1.4×、至少約1.5×、至少約1.6×、至少約1.7×、至少約1.8×、至少約1.9×、至少約2×、至少約2.1×、至少約2.2×、至少約2.3×、至少約2.4×、至少約2.5×、至少約2.6×、至少約2.7×、至少約2.8×、至少約2.9×、至少約3×、至少約3.1×、至少約3.2×、至少約3.3×、至少約3.4×、至少約3.5×、至少約3.6×、至少約3.7×、至少約3.8×、至少約3.9×、至少約4×、至少約4.1×、至少約4.2×、至少約4.3×、至少約4.4×、至少約4.5×、至少約4.6×、至少約4.7×、至少約4.8×、至少約4.9×、至少約5×、至少約5.1×、至少約5.2×、至少約5.3×、至少約5.4×、至少約5.5×、至少約5.6×、至少約5.7×、至少約5.8×、至少約5.9×、至少約6×、至少約6.1×、至少約6.2×、至少約6.3×、至少約6.4×、至少約6.5×、至少約6.6×、至少約6.7×、至少約6.8×、至少約6.9×、至少約7×、至少約7.1×、至少約7.2×、至少約7.3×、至少約7.4×、至少約7.5×、至少約7.6×、至少約7.7×、至少約7.8×、至少約7.9×、至少約8×、至少約8.1×、至少約8.2×、至少約8.3×、至少約8.4×、至少約8.5×、至少約8.6×、至少約8.7×、至少約8.8×、至少約8.9×、至少約9×、至少約9.1×、至少約9.2×、至少約9.3×、至少約9.4×、至少約9.5×、至少約9.6×、至少約9.7×、至少約9.8×、至少約9.9×、至少約10×或更大。

【0748】在一些實施例中，本文所述之細胞表現未經改變或未經修飾之相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9水準的至少約1倍、至少約1.1倍、至少約1.2倍、至少約1.3倍、至少約1.4倍、至少約1.5倍、至少約1.6倍、至少約1.7倍、至少約1.8倍、至少約1.9倍、至少約2倍、至少約2.1倍、至少約2.2倍、至少約2.3倍、至少約2.4倍、至少約2.5倍、至少約2.6倍、至少約2.7倍、至少約2.8倍、至少約2.9倍、至少約3倍、至少約3.1倍、至少約3.2倍、至少約3.3倍、至少約3.4倍、至少約3.5倍、至少約3.6倍、至少約3.7倍、至少約3.8倍、至少約3.9倍、至少約4倍、至少約4.1倍、至少約4.2倍、至少約4.3倍、至少約4.4倍、至少約4.5倍、至少約4.6倍、至少約4.7倍、至少約4.8倍、至少約4.9倍、至少約5倍、至少約5.1倍、至少約5.2倍、至少約5.3倍、至少約5.4倍、至少約5.5倍、至少約5.6倍、至少約5.7倍、至少約5.8倍、至少約5.9倍、至少約6倍、至少約6.1倍、至少約6.2倍、至少約6.3倍、至少約6.4倍、至少約6.5倍、至少約6.6倍、至少約6.7倍、至少約6.8倍、至少約6.9倍、至少約7倍、至少約7.1倍、至少約7.2倍、至少約7.3倍、至少約7.4倍、至少約7.5倍、至少約7.6

倍、至少約7.7倍、至少約7.8倍、至少約7.9倍、至少約8倍、至少約8.1倍、至少約8.2倍、至少約8.3倍、至少約8.4倍、至少約8.5倍、至少約8.6倍、至少約8.7倍、至少約8.8倍、至少約8.9倍、至少約9倍、至少約9.1倍、至少約9.2倍、至少約9.3倍、至少約9.4倍、至少約9.5倍、至少約9.6倍、至少約9.7倍、至少約9.8倍、至少約9.9倍、至少約10倍或更大。

【0749】在一些實施例中，本文所述之細胞表現未經改變或未經修飾之相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9水準的至少約110%、至少約120%、至少約130%、至少約140%、至少約150%、至少約160%、至少約170%、至少約180%、至少約190%、至少約200%、至少約250%、至少約300%、至少約350%、至少約400%、至少約450%、至少約500%、至少約550%、至少約600%、至少約650%、至少約700%、至少約750%、至少約800%、至少約850%、至少約900%、至少約950%、至少約1000%、至少約1500%、至少約2000%、至少約2500%、至少約3000%、至少約3500%、至少約4000%、至少約4500%、至少約5000%、至少約5500%、至少約6000%、至少約6500%、至少約7000%、至少約

7500%、至少約8000%、至少約8500%、至少約9000%、至少約10000%或更大。

【0750】增加的CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現量亦可量測為例如相對於未經改變或未經修飾之野生型細胞之表現增加的倍數(multiple)、倍數(fold)或百分比。舉例而言，在一些實施例中，相對於未經改變或未經修飾之相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9的水準，本文所述之細胞表現至少高約0.1×、至少高約0.1×、至少高約0.2×、至少高約0.3×、至少高約0.4×、至少高約0.5×、至少高約0.6×、至少高約0.7×、至少高約0.8×、至少高約0.9×、至少高約2×、至少高約1×、至少高約1.1×、至少高約1.2×、至少高約1.3×、至少高約1.4×、至少高約1.5×、至少高約1.6×、至少高約1.7×、至少高約1.8×、至少高約1.9×、至少高約2×、至少高約2.1×、至少高約2.2×、至少高約2.3×、至少高約2.4×、至少高約2.5×、至少高約2.6×、至

少高約2.7×、至少高約2.8×、至少高約2.9×、至少高約3×、至少高約3.1×、至少高約3.2×、至少高約3.3×、至少高約3.4×、至少高約3.5×、至少高約3.6×、至少高約3.7×、至少高約3.8×、至少高約3.9×、至少高約4×、至少高約4.1×、至少高約4.2×、至少高約4.3×、至少高約4.4×、至少高約4.5×、至少高約4.6×、至少高約4.7×、至少高約4.8×、至少高約4.9×、至少高約5×、至少高約5.1×、至少高約5.2×、至少高約5.3×、至少高約5.4×、至少高約5.5×、至少高約5.6×、至少高約5.7×、至少高約5.8×、至少高約5.9×、至少高約6×、至少高約6.1×、至少高約6.2×、至少高約6.3×、至少高約6.4×、至少高約6.5×、至少高約6.6×、至少高約6.7×、至少高約6.8×、至少高約6.9×、至少高約7×、至少高約7.1×、至少高約7.2×、至少高約7.3×、至少高約7.4×、至少高約7.5×、至少高約7.6×、至少高約7.7×、至少高約7.8×、至少高約7.9×、至少高約8×、至少高約8.1×、至少高約8.2×、至少高約8.3×、至少高約8.4×、至少高約8.5×、至少高約8.6×、至少高約8.7×、至少高約8.8×、至少高約8.9×、至少高約9×、至少高約9.1×、至少高約9.2×、至少高約9.3×、至少高約9.4×、至少高約9.5×、至少高約9.6×、至少高約9.7×、至少高約9.8×、至少高約9.9×、至少高約10×或更大之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、

IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現量。

【0751】在一些實施例中，相對於未經改變或未經修飾之相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9的水準，本文所述之細胞表現至少高約0.1倍、至少約0.2倍、至少高約0.3倍、至少高約0.4倍、至少高約0.5倍、至少高約0.6倍、至少高約0.7倍、至少高約0.8倍、至少高約0.9倍、至少高約1倍、至少高約1.1倍、至少高約1.2倍、至少高約1.3倍、至少高約1.4倍、至少高約1.5倍、至少高約1.6倍、至少高約1.7倍、至少高約1.8倍、至少高約1.9倍、至少高約2倍、至少高約2.1倍、至少高約2.2倍、至少高約2.3倍、至少高約2.4倍、至少高約2.5倍、至少高約2.6倍、至少高約2.7倍、至少高約2.8倍、至少高約2.9倍、至少高約3倍、至少高約3.1倍、至少高約3.2倍、至少高約3.3倍、至少高約3.4倍、至少高約3.5倍、至少高約3.6倍、至少高約3.7倍、至少高約3.8倍、至少高約3.9倍、至少高約4倍、至少高約4.1倍、至少高約4.2倍、至少高約4.3倍、至少高約4.4倍、至少高約4.5倍、至少高約4.6倍、至少高約4.7倍、至少高約4.8倍、至少高約4.9倍、至少高約5倍、至少高約

5.1倍、至少高約5.2倍、至少高約5.3倍、至少高約5.4倍、至少高約5.5倍、至少高約5.6倍、至少高約5.7倍、至少高約5.8倍、至少高約5.9倍、至少高約6倍、至少高約6.1倍、至少高約6.2倍、至少高約6.3倍、至少高約6.4倍、至少高約6.5倍、至少高約6.6倍、至少高約6.7倍、至少高約6.8倍、至少高約6.9倍、至少高約7倍、至少高約7.1倍、至少高約7.2倍、至少高約7.3倍、至少高約7.4倍、至少高約7.5倍、至少高約7.6倍、至少高約7.7倍、至少高約7.8倍、至少高約7.9倍、至少高約8倍、至少高約8.1倍、至少高約8.2倍、至少高約8.3倍、至少高約8.4倍、至少高約8.5倍、至少高約8.6倍、至少高約8.7倍、至少高約8.8倍、至少高約8.9倍、至少高約9倍、至少高約9.1倍、至少高約9.2倍、至少高約9.3倍、至少高約9.4倍、至少高約9.5倍、至少高約9.6倍、至少高約9.7倍、至少高約9.8倍、至少高約9.9倍、至少高約10倍或更大之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現量。

【0752】在一些實施例中，相對於未經改變或未經修飾之相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、

CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9的水準，本文所述之細胞表現至少高約10%、至少高約20%、至少高約30%、至少高約40%、至少高約50%、至少高約60%、至少高約70%、至少高約80%、至少高約90%、至少高約100%、至少高約125%、至少高約150%、至少高約200%、至少高約250%、至少高約300%、至少高約350%、至少高約400%、至少高約450%、至少高約500%、至少高約550%、至少高約600%、至少高約650%、至少高約700%、至少高約750%、至少高約800%、至少高約850%、至少高約900%、至少高約950%、至少高約1000%、至少高約1500%、至少高約2000%、至少高約2500%、至少高約3000%、至少高約3500%、至少高約4000%、至少高約4500%、至少高約5000%、至少高約5500%、至少高約6000%、至少高約6500%、至少高約7000%、至少高約7500%、至少高約8000%、至少高約8500%、至少高約9000%、至少高約10000%或更大之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現量。

【0753】表現水準可歸因於熟習此項技術者已知之多種因素。舉例而言，編碼CD47、DUX4、CD24、CD27、

CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9之外源多核苷酸之表現水準可能尤其受以下因素之影響：細胞中外源多核苷酸之拷貝數，例如細胞中外源多核苷酸之1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個或更多個拷貝；所存在調控元件，例如本文所述或此項技術中已知之任一調控元件，包括本文所述或此項技術中已知之組成型、可誘導或條件啟動子中之任一者；外源多核苷酸插入細胞之基因體之位置；用於將外源多核苷酸引入細胞中之載體之類型；外源多核苷酸(例如雙順反子)中盒之順序等。

【0754】相對於未經改變或未經修飾之相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9之水準來量測CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或

Serpinb9表現水準。舉例而言，T細胞中由編碼CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9之外源多核苷酸賦予之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型T細胞之表現水準之表現水準；NK細胞中由編碼CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9之外源多核苷酸賦予之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型NK細胞之表現水準之表現水準；內皮細胞中由編

碼CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9之外源多核苷酸賦予之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型內皮細胞之表現水準之表現水準；胰島細胞中由編碼CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9之外源多核苷酸賦予之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型胰島細胞之表現水準之表現水準；心肌細胞中由編碼CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、

CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9之外源多核苷酸賦予之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型心肌細胞之表現水準之表現水準；平滑肌細胞中由編碼CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9之外源多核苷酸賦予之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型平滑肌細胞之表現水準之表現水準；骨骼肌細胞中由編碼CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、

HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9之外源多核苷酸賦予之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型骨骼肌細胞之表現水準之表現水準；肝細胞中由編碼CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9之外源多核苷酸賦予之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型肝細胞之表現水準之表現水準；神經膠質祖細胞中由編碼CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-

Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9之外源多核苷酸賦予之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型神經膠質祖細胞之表現水準之表現水準；多巴胺能神經元中由編碼CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9之外源多核苷酸賦予之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型多巴胺能神經元之表現水準之表現水準；視網膜色素上皮細胞中由編碼CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、

IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9之外源多核苷酸賦予之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型視網膜色素上皮細胞之表現水準之表現水準；甲狀腺細胞中由編碼CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9之外源多核苷酸賦予之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9表現水準表示為相對於未經改變或未經修飾之野生型甲狀腺細胞之表現水準之表現水準。

【0755】在另一實施例中，使用用針對CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、

IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9蛋白之抗體探測之細胞溶解物之西方墨點來偵測CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9蛋白表現。在另一實施例中，使用反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)來確認外源CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9 mRNA之存在。

X. 嵌合抗原受體

【0756】本文提供包含嵌合抗原受體(CAR)之低免疫原性細胞。在一些實施例中，CAR結合至CD19。在一些實施例中，CAR結合至CD22。在一些實施例中，CAR結合至CD19。在一些實施例中，CAR結合至CD19及CD22。在一些實施例中，CAR選自由以下組成之群：第一代CAR、第二代CAR、第三代CAR及第四代CAR。在一些實施例中，CAR包括結合至單一靶抗原之單一結合結構域。在一

些實施例中，CAR包括結合至一種以上之靶抗原(例如2種、3種或更多種靶抗原)之單一結合結構域。在一些實施例中，CAR包括兩個結合結構域，使得每一結合結構域結合至不同之靶抗原。在一些實施例中，CAR包括兩個結合結構域，使得每一結合結構域結合至相同之靶抗原。例示性CAR (包括CD19特異性、CD22特異性及CD19/CD22雙特異性CAR)之詳細描述可參見WO2012/079000、WO2016/149578及WO2020/014482，該等揭示內容(包括序列表及圖)之全文皆以引用方式併入本文中。在一些實施例中，CAR包括兩個結合結構域，使得每一結合結構域結合至相同之靶抗原。例示性CAR (包括CD19特異性、CD22特異性及CD19/CD22雙特異性CAR)之詳細描述可參見WO2012/079000、WO2016/149578及WO2020/014482，該等揭示內容(包括序列表及圖)之全文皆以引用方式併入本文中。

【0757】在一些實施例中，CD19特異性CAR包括抗CD19單鏈抗體片段(scFv)、跨膜結構域(例如衍生自人類CD8α之一者)、4-1BB (CD137)共刺激信號傳導結構域及CD3ζ信號傳導結構域。在一些實施例中，CD20特異性CAR包括抗CD20 scFv、跨膜結構域(例如衍生自人類CD8α之一者)、4-1BB (CD137)共刺激信號傳導結構域及CD3ζ信號傳導結構域。在一些實施例中，CD19/CD20雙特異性CAR包括抗CD19 scFv、抗CD20 scFv、跨膜結構域(例如衍生自人類CD8α之一者)、4-1BB (CD137)共刺激信號傳導結

構域及CD3ζ信號傳導結構域。在一些實施例中，CD22特異性CAR包括抗CD22 scFv、跨膜結構域(例如衍生自人類CD8α之一者)、4-1BB (CD137)共刺激信號傳導結構域及CD3ζ信號傳導結構域。在一些實施例中，CD19/CD22雙特異性CAR包括抗CD19 scFv、抗CD22 scFv、跨膜結構域(例如衍生自人類CD8α之一者)、4-1BB (CD137)共刺激信號傳導結構域及CD3ζ信號傳導結構域。

【0758】在一些實施例中，CAR包含由T細胞攜載之商業CAR構築體。基於商業CAR-T細胞之療法之非限制性實例包括佈瑞基奧侖塞(brexucabtagene autoleucel，TECARTUS®)、阿基崙賽(YESCARTA®)、艾基維侖塞(idecabtagene vicleucel，ABECMA®)、利基邁崙賽(BREYANZI®)、替沙崙賽(KYMRIAH®)、來自Cartesian Therapeutics之Descartes-08及Descartes-11、來自Novartis之CTL110、來自Poseida Therapeutics之P-BMCA-101、來自Autolus Limited之AUTO4、來自Cellectis之UCARTCS、來自Precision Biosciences之PBCAR19B及PBCAR269A、來自Fate Therapeutics之FT819及來自Clyad Oncology之CYAD-211。

【0759】在一些實施例中，本文所述之低免疫原性細胞包含編碼嵌合抗原受體(CAR)之多核苷酸，該嵌合抗原受體包含抗原結合結構域。在一些實施例中，本文所述之低免疫原性細胞包含含有抗原結合結構域之嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，多核苷酸係或包含含有抗原結

合結構域之嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，CAR係或包含第一代CAR，其包含抗原結合結構域、跨膜結構域及至少一個信號傳導結構域(*例如*一個、兩個或三個信號傳導結構域)。在一些實施例中，CAR包含第二代CAR，其包含抗原結合結構域、跨膜結構域及至少兩個信號傳導結構域。在一些實施例中，CAR包含第三代CAR，其包含抗原結合結構域、跨膜結構域及至少三個信號傳導結構域。在一些實施例中，第四代CAR，其包含抗原結合結構域、跨膜結構域、三個或四個信號傳導結構域及在CAR之成功信號傳導後誘導細胞介素基因表現之結構域。在一些實施例中，抗原結合結構域係或包含抗體、抗體片段、scFv或Fab。

1. 抗原結合結構域(ABD)靶向贅瘤或癌細胞所特有之抗原

【0760】在一些實施例中，抗原結合結構域(ABD)靶向贅瘤細胞所特有之抗原。換言之，抗原結合結構域靶向由贅瘤或癌細胞表現之抗原。在一些實施例中，ABD結合腫瘤相關抗原。在一些實施例中，贅瘤細胞所特有之抗原(*例如*與贅瘤或癌細胞相關之抗原)或腫瘤相關抗原選自細胞表面受體、離子通道連接受體、酶連接受體、G蛋白偶合受體、受體酪胺酸激酶、酪胺酸激酶相關受體、受體樣酪胺酸磷酸酶、受體絲胺酸/蘇胺酸激酶、受體鳥苷酸環化酶、組胺酸激酶相關受體、表皮生長因子受體(EGFR)(包括ErbB1/EGFR、ErbB2/HER2、ErbB3/HER3及

ErbB4/HER4)、纖維母細胞生長因子受體(FGFR)(包括FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF18及FGF21)、血管內皮生長因子受體(VEGFR)(包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D及PIGF)、RET受體及Eph受體家族(包括EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA9、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4及EphB6)、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR8、CFTR、CIC-1、CIC-2、CIC-4、CIC-5、CIC-7、CIC-Ka、CIC-Kb、斑萎蛋白、TMEM16A、GABA受體、甘胺酸受體、ABC轉運子、NAV1.1、NAV1.2、NAV1.3、NAV1.4、NAV1.5、NAV1.6、NAV1.7、NAV1.8、NAV1.9、鞘胺醇-1磷酸受體(S1P1R)、NMDA通道、跨膜蛋白、多跨跨膜蛋白、T細胞受體基元、T細胞鏈、T細胞β鏈、T細胞γ鏈、T細胞δ鏈、CCR7、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD11b、CD11c、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD28、CD34、CD35、CD40、CD45RA、CD45RO、CD52、CD56、CD62L、CD68、CD80、CD95、CD117、CD127、CD133、CD137 (4-1BB)、CD163、F4/80、IL-4Ra、Sca-1、CTLA-4、GITR、GARP、LAP、顆粒酶B、LFA-1、轉鐵蛋白受體、NKp46、穿孔蛋白、CD4+、Th1、Th2、Th17、Th40、Th22、Th9、Tfh、規範Treg、FoxP3+、Tr1、Th3、Treg17、$T_{RE}G$；CDCP、NT5E、EpCAM、

CEA、gpA33、黏蛋白、TAG-72、碳酸酐酶IX、PSMA、葉酸結合蛋白、神經節苷脂(*例如*CD2、CD3、GM2)、Lewis-γ^2、VEGF、VEGFR 1/2/3、αVβ3、α5β1、ErbB1/EGFR、ErbB1/HER2、ErB3、c-MET、IGF1R、EphA3、TRAIL-R1、TRAIL-R2、RANKL、FAP、生腱蛋白、PDL-1、BAFF、HDAC、ABL、FLT3、KIT、MET、RET、IL-1β、ALK、RANKL、mTOR、CTLA-4、IL-6、IL-6R、JAK3、BRAF、PTCH、滑蛋白、PIGF、ANPEP、TIMP1、PLAUR、PTPRJ、LTBR、ANTXR1、葉酸受體α(FRa)、ERBB2 (Her2/neu)、EphA2、IL-13Ra2、表皮生長因子受體(EGFR)、間皮素、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、MUC16 (CA125)、L1CAM、LeY、MSLN、IL13Rα 1、L1-CAM、Tn Ag、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、介白素-11受體a (IL-11Ra)、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、血小板源性生長因子受體-β (PDGFR-β)、SSEA-4、CD20、MUC1、NCAM、前列腺酶、PAP、ELF2M、Ephrin B2、IGF-1受體、CAIX、LMP2、gp100、bcr-ab1、酪胺酸酶、岩藻糖基GM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-乙醯基-GD2、葉酸受體β、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、

UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、豆荚蛋白、HPV E6、E7、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、主要組織相容性複合物I類相關基因蛋白(MR1)、尿激酶型纖維蛋白溶酶原活化劑受體(uPAR)、Fos相關抗原1、p53、p53突變體、前列腺癌相關蛋白、生存素、端粒酶、PCTA-1/半乳糖凝集素8、MelanA/MART1、Ras突變體、hTERT、肉瘤易位斷裂點、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、雄激素受體、細胞週期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYPIB I、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人類端粒酶反轉錄酶、RU1、RU2、腸羧基酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、新抗原、CD133、CD15、CD184、CD24、CD56、CD26、CD29、CD44、HLA-A、HLA-B、HLA-C、(HLA-A,B,C) CD49f、CD151 CD340、CD200、tkrA、trkB或trkC或其抗原片段或抗原部分。

2. ABD靶向T細胞所特有之抗原

【0761】在一些實施例中，抗原結合結構域靶向T細胞所特有之抗原。在一些實施例中，ABD結合與T細胞相關之抗原。在一些情況下，該抗原係由T細胞表現或位於T

細胞表面上。在一些實施例中，T細胞所特有之抗原或T細胞相關抗原選自細胞表面受體、膜轉運蛋白(*例如*主動或被動轉運蛋白，例如離子通道蛋白、孔形成蛋白等)、跨膜受體、膜酶及/或T細胞所特有之細胞黏附蛋白。在一些實施例中，T細胞所特有之抗原可為G蛋白偶合受體、受體酪胺酸激酶、酪胺酸激酶相關受體、受體樣酪胺酸磷酸酶、受體絲胺酸/蘇胺酸激酶、受體鳥苷酸環化酶、組胺酸激酶相關受體、AKT1；AKT2；AKT3；ATF2；BCL10；CALM1；CD3D (CD3δ)；CD3E (CD3ε)；CD3G (CD3γ)；CD4；CD8；CD28；CD45；CD80 (B7-1)；CD86 (B7-2)；CD247 (CD3ζ)；CTLA-4 (CD152)；ELK1；ERK1 (MAPK3)；ERK2；FOS；FYN；GRAP2 (GADS)；GRB2；HLA-DRA；HLA-DRB1；HLA-DRB3；HLA-DRB4；HLA-DRB5；HRAS；IKBKA (CHUK)；IKBKB；IKBKE；IKBKG (NEMO)；IL2；ITPR1；ITK；JUN；KRAS2；LAT；LCK；MAP2K1 (MEK1)；MAP2K2 (MEK2)；MAP2K3 (MKK3)；MAP2K4 (MKK4)；MAP2K6 (MKK6)；MAP2K7 (MKK7)；MAP3K1 (MEKK1)；MAP3K3；MAP3K4；MAP3K5；MAP3K8；MAP3K14 (NIK)；MAPK8 (JNK1)；MAPK9 (JNK2)；MAPK10 (JNK3)；MAPK11 (p38β)；MAPK12 (p38γ)；MAPK13 (p38δ)；MAPK14 (p38α)；NCK；NFAT1；NFAT2；NFKB1；NFKB2；NFKBIA；NRAS；PAK1；PAK2；PAK3；PAK4；PIK3C2B；PIK3C3 (VPS34)；PIK3CA；PIK3CB；

PIK3CD；PIK3R1；PKCA；PKCB；PKCM；PKCQ；PLCY1；PRF1（穿孔蛋白）；PTEN；RAC1；RAF1；RELA；SDF1；SHP2；SLP76；SOS；SRC；TBK1；TCRA；TEC；TRAF6；VAV1；VAV2；或ZAP70。

3. ABD靶向自體免疫或發炎性病症所特有之抗原

【0762】在一些實施例中，抗原結合結構域靶向自體免疫或發炎性病症所特有之抗原。在一些實施例中，ABD結合與自體免疫或發炎性病症相關之抗原。在一些情況下，抗原係由與自體免疫或發炎性病症相關之細胞表現。在一些實施例中，自體免疫或發炎性病症選自慢性移植物抗宿主病(GVHD)、狼瘡、關節炎、免疫複合物腎小球腎炎、古德巴斯德症候群(goodpasture syndrome)、眼色素層炎、肝炎、全身性硬化或硬皮症、I型糖尿病、多發性硬化、冷凝集素疾病、尋常天疱瘡、格雷氏病、自體免疫溶血性貧血、A型血友病、原發性休格倫氏症候群、血栓性血小板減少性紫癜、視神經脊髓炎、伊凡氏症候群(Evan's syndrome)、IgM介導之神經病變、冷凝球蛋白血症、皮肌炎、特發性血小板減少症、僵直性脊椎炎、大疱性類天疱瘡、獲得性血管水腫、慢性蕁麻疹性抗磷脂脫髓鞘性多神經病變及自體免疫血小板減少症或嗜中性球減少症或純紅血球再生不良，而同種免疫疾病之例示性非限制性實例包括來自以下之同種致敏(參見例如Blazar等人，2015, Am. J. Transplant, 15(4):931-41)或異種致敏：造血或實體器官

移植、輸血、具有胎兒同種致敏之妊娠、新生同種免疫血小板減少症、新生兒溶血病、對外來抗原之致敏(例如可藉由替代用酶或蛋白質替代療法治療之遺傳性或獲得性缺陷病症來進行)、血液產品及基因療法。在一些實施例中，自體免疫或發炎性病症所特有之抗原選自細胞表面受體、離子通道連接受體、酶連接受體、G蛋白偶合受體、受體酪胺酸激酶、酪胺酸激酶相關受體、受體樣酪胺酸磷酸酶、受體絲胺酸/蘇胺酸激酶、受體鳥苷酸環化酶或組胺酸激酶相關受體。

【0763】在一些實施例中，CAR之抗原結合結構域結合至在B細胞、漿細胞或漿母細胞上表現之配位體。在一些實施例中，CAR之抗原結合結構域結合至CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD27、CD38、CD45R、CD138、CD319、BCMA、CD28、TNF、干擾素受體、GM-CSF、ZAP-70、LFA-1、CD3 γ、CD5或CD2。參見例如US 2003/0077249；WO 2017/058753；WO 2017/058850，該等專利之內容以引用方式併入本文中。

4. ABD靶向衰老細胞所特有之抗原

【0764】在一些實施例中，抗原結合結構域靶向衰老細胞所特有之抗原，例如尿激酶型纖維蛋白溶酶原活化劑受體(uPAR)。在一些實施例中，ABD結合與衰老細胞相關之抗原。在一些情況下，抗原係由衰老細胞表現。在一些實施例中，CAR可用於治療或預防特徵在於衰老細胞異常

累積之病症，例如肝及肺纖維化、動脈粥樣硬化、糖尿病及骨關節炎。

5. ABD靶向傳染病所特有之抗原

【0765】在一些實施例中，抗原結合結構域靶向傳染病所特有之抗原。在一些實施例中，ABD結合與傳染病相關之抗原。在一些情況下，抗原係由傳染病侵襲之細胞表現。在一些實施例中，其中傳染病選自HIV、B型肝炎病毒、C型肝炎病毒、人類疱疹病毒、人類疱疹病毒8 (HHV-8、卡波西氏肉瘤(Kaposi sarcoma)相關之疱疹病毒(KSHV))、人類T-親淋巴性病毒-1 (HTLV-1)、默克細胞多瘤病毒(Merkel cell polyomavirus，MCV)、猿猴病毒40 (SV40)、愛潑斯坦-巴爾病毒、CMV、人類乳頭瘤病毒。在一些實施例中，傳染病所特有之抗原選自細胞表面受體、離子通道連接受體、酶連接受體、G蛋白偶合受體、受體酪胺酸激酶、酪胺酸激酶相關受體、受體樣酪胺酸磷酸酶、受體絲胺酸/蘇胺酸激酶、受體鳥苷酸環化酶、組胺酸激酶相關受體、HIV Env、gp120或HIV-1 Env上CD4誘導之抗原決定基。

6. ABD結合至細胞之細胞表面抗原

【0766】在一些實施例中，抗原結合結構域結合至細胞之細胞表面抗原。在一些實施例中，細胞表面抗原為特定或特異性細胞類型所特有(*例如*由其表現)。在一些實施

例中，細胞表面抗原為一種以上類型之細胞所特有。

【0767】在一些實施例中，CAR抗原結合結構域結合T細胞所特有之細胞表面抗原，例如T細胞上之細胞表面抗原。在一些實施例中，T細胞所特有之抗原可為細胞表面受體、膜轉運蛋白(*例如*主動或被動轉運蛋白，例如離子通道蛋白、孔形成蛋白等)、跨膜受體、膜酶及/或T細胞所特有之細胞黏附蛋白。在一些實施例中，T細胞所特有之抗原可為G蛋白偶合受體、受體酪胺酸激酶、酪胺酸激酶相關受體、受體樣酪胺酸磷酸酶、受體絲胺酸/蘇胺酸激酶、受體鳥苷酸環化酶或組胺酸激酶相關受體。

【0768】在一些實施例中，CAR之抗原結合結構域結合T細胞受體。在一些實施例中，T細胞受體可為AKT1；AKT2；AKT3；ATF2；BCL10；CALM1；CD3D (CD3δ)；CD3E (CD3ε)；CD3G (CD3γ)；CD4；CD8；CD28；CD45；CD80 (B7-1)；CD86 (B7-2)；CD247 (CD3ζ)；CTLA-4 (CD152)；ELK1；ERK1 (MAPK3)；ERK2；FOS；FYN；GRAP2 (GADS)；GRB2；HLA-DRA；HLA-DRB1；HLA-DRB3；HLA-DRB4；HLA-DRB5；HRAS；IKBKA (CHUK)；IKBKB；IKBKE；IKBKG (NEMO)；IL2；ITPR1；ITK；JUN；KRAS2；LAT；LCK；MAP2K1 (MEK1)；MAP2K2 (MEK2)；MAP2K3 (MKK3)；MAP2K4 (MKK4)；MAP2K6 (MKK6)；MAP2K7 (MKK7)；MAP3K1 (MEKK1)；MAP3K3；MAP3K4；MAP3K5；MAP3K8；MAP3K14 (NIK)；MAPK8 (JNK1)；MAPK9 (JNK2)；

MAPK10 (JNK3)；MAPK11 (p38β)；MAPK12 (p38γ)；MAPK13 (p38δ)；MAPK14 (p38α)；NCK；NFAT1；NFAT2；NFKB1；NFKB2；NFKBIA；NRAS；PAK1；PAK2；PAK3；PAK4；PIK3C2B；PIK3C3 (VPS34)；PIK3CA；PIK3CB；PIK3CD；PIK3R1；PKCA；PKCB；PKCM；PKCQ；PLCY1；PRF1（穿孔蛋白）；PTEN；RAC1；RAF1；RELA；SDF1；SHP2；SLP76；SOS；SRC；TBK1；TCRA；TEC；TRAF6；VAV1；VAV2；或ZAP70。

7. 跨膜結構域

【0769】在一些實施例中，CAR跨膜結構域包含T細胞受體之α、β或ζ鏈、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154或其功能變異體之至少跨膜區。在一些實施例中，跨膜結構域包含CD8α、CD8β、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、FcεRIγ、CD16、OX40/CD134、CD3ζ、CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、TCRβ、TCRζ、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD37、CD80、CD86、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS及FGFR2B或其功能變異體之至少跨膜區。

8. 抗原結合結構域結合信號傳導結構域或複數個信號傳

導結構域

【0770】在一些實施例中，本文所述之CAR包含一個或至少一個選自以下中之一或多者之信號傳導結構域：B7-1/CD80；B7-2/CD86；B7-H1/PD-L1；B7-H2；B7-H3；B7-H4；B7-H6；B7-H7；BTLA/CD272；CD28；CTLA-4；Gi24/VISTA/B7-H5；ICOS/CD278；PD-1；PD-L2/B7-DC；PDCD6)；4-1BB/TNFSF9/CD137；4-1BB配位體/TNFSF9；BAFF/BLyS/TNFSF13B；BAFF R/TNFRSF13C；CD27/TNFRSF7；CD27配位體/TNFSF7；CD30/TNFRSF8；CD30配位體/TNFSF8；CD40/TNFRSF5；CD40/TNFSF5；CD40配位體/TNFSF5；DR3/TNFRSF25；GITR/TNFRSF18；GITR配位體/TNFSF18；HVEM/TNFRSF14；LIGHT/TNFSF14；淋巴毒素-α/TNF-β；OX40/TNFRSF4；OX40配位體/TNFSF4；RELT/TNFRSF19L；TACI/TNFRSF13B；TL1A/TNFSF15；TNF-α；TNF RII/TNFRSF1B)；2B4/CD244/SLAMF4；BLAME/SLAMF8；CD2；CD2F-10/SLAMF9；CD48/SLAMF2；CD58/LFA-3；CD84/SLAMF5；CD229/SLAMF3；CRACC/SLAMF7；NTB-A/SLAMF6；SLAM/CD150)；CD2；CD7；CD53；CD82/Kai-1；CD90/Thy1；CD96；CD160；CD200；CD300a/LMIR1；I類HLA；HLA-DR；Ikaros；整合素α4/CD49d；整合素α4β1；整合素α4 β7/LPAM-1；LAG-3；TCL1A；TCL1B；CRTAM；DAP12；Dectin-1/CLEC7A；DPPIV/CD26；

EphB6；TIM-1/KIM-1/HAVCR；TIM-4；TSLP；TSLP R；淋巴球功能相關抗原-1 (LFA-1)；NKG2C、CD3ζ結構域、基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、CD27、CD28、4-1BB、CD134/OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴球功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、與CD83特異性結合之配位體或其功能片段。

【0771】在一些實施例中，至少一個信號傳導結構域包含CD3ζ結構域或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)或其功能變異體。在其他實施例中，至少一個信號傳導結構域包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；及(ii) CD28結構域、或4-1BB結構域、或其功能變異體。在其他實施例中，至少一個信號傳導結構域包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；(ii) CD28結構域或其功能變異體；及(iii) 4-1BB結構域、或CD134結構域、或其功能變異體。在一些實施例中，至少一個信號傳導結構域包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；(ii) CD28結構域或其功能變異體；(iii) 4-1BB結構域、或CD134結構域、或其功能變異體；及(iv)細胞介素或共刺激配位體轉基因。

【0772】在一些實施例中，至少兩個信號傳導結構域包含CD3ζ結構域或基於酪胺酸之免疫受體活化基元

(ITAM)或其功能變異體。在其他實施例中，至少兩個信號傳導結構域包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；及(ii) CD28結構域、或4-1BB結構域、或其功能變異體。在其他實施例中，至少一個信號傳導結構域包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；(ii) CD28結構域或其功能變異體；及(iii) 4-1BB結構域、或CD134結構域、或其功能變異體。在一些實施例中，至少兩個信號傳導結構域包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；(ii) CD28結構域或其功能變異體；(iii) 4-1BB結構域、或CD134結構域、或其功能變異體；及(iv)細胞介素或共刺激配位體轉基因。

【0773】在一些實施例中，至少三個信號傳導結構域包含CD3ζ結構域或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)或其功能變異體。在其他實施例中，至少三個信號傳導結構域包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；及(ii) CD28結構域、或4-1BB結構域、或其功能變異體。在其他實施例中至少三個信號傳導結構域包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；(ii) CD28結構域或其功能變異體；及(iii) 4-1BB結構域、或CD134結構域、或其功能變異體。在一些實施例中，至少三個信號傳導結構域包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸

之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；(ii) CD28結構域或其功能變異體；(iii) 4-1BB結構域、或CD134結構域、或其功能變異體；及(iv)細胞介素或共刺激配位體轉基因。

【0774】在一些實施例中，CAR包含CD3ζ結構域或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)或其功能變異體。在一些實施例中，CAR包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；及(ii) CD28結構域、或4-1BB結構域、或其功能變異體。

【0775】在一些實施例中，CAR包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；(ii) CD28結構域或其功能變異體；及(iii) 4-1BB結構域、或CD134結構域、或其功能變異體。

【0776】在一些實施例中，CAR包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；(ii) CD28結構域、或4-1BB結構域、或其功能變異體，及/或(iii) 4-1BB結構域、或CD134結構域、或其功能變異體。

【0777】在一些實施例中，CAR包含(i) CD3ζ結構域、或基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、或其功能變異體；(ii) CD28結構域或其功能變異體；(iii) 4-1BB結構域、或CD134結構域、或其功能變異體；及(iv)細胞介素或共刺激配位體轉基因。

9. 在CAR之成功信號傳導後誘導細胞介素基因表現之結構域

【0778】在一些實施例中，第一、第二、第三或第四代CAR進一步包含在CAR之成功信號傳導後誘導細胞介素基因表現之結構域。在一些實施例中，細胞介素基因為包含CAR之靶細胞之內源或外源，該CAR包含在CAR之成功信號傳導後誘導細胞介素基因表現之結構域。在一些實施例中，細胞介素基因編碼促發炎細胞介素。在一些實施例中，細胞介素基因編碼IL-1、IL-2、IL-9、IL-12、IL-18、TNF、IL-4、IL-10或IFN-γ或其功能片段。在一些實施例中，在CAR之成功信號傳導後誘導細胞介素基因表現之結構域係或包含轉錄因子或其功能結構域或片段。在一些實施例中，在CAR之成功信號傳導後誘導細胞介素基因表現之結構域係或包含轉錄因子或其功能結構域或片段。在一些實施例中，轉錄因子或其功能結構域或片段係或包含活化T細胞核因子(NFAT)、NF-kB或其功能結構域或片段。參見例如Zhang. C.等人，Engineering CAR-T cells. Biomarker Research. 5:22 (2017)；WO 2016126608；Sha, H.等人，Chimaeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy. Bioscience Reports，2017年1月27日, 37 (1)。

【0779】在一些實施例中，CAR進一步包含一或多個間隔體，例如，其中間隔體係介於抗原結合結構域與跨膜結構域之間的第一間隔體。在一些實施例中，第一間隔體

包括免疫球蛋白恆定區或其變異體或經修飾形式之至少一部分。在一些實施例中，間隔體係介於跨膜結構域與信號傳導結構域之間的第二間隔體。在一些實施例中，第二間隔體係寡肽，例如，其中寡肽包含甘胺酸及絲胺酸殘基，例如(但不限於)甘胺酸-絲胺酸雙聯體。在一些實施例中，CAR包含兩個或更多個間隔體，例如介於抗原結合結構域與跨膜結構域之間的間隔體及介於跨膜結構域與信號傳導結構域之間的間隔體。

【0780】在一些實施例中，本文所述細胞中之任一者包含編碼CAR或第一代CAR之核酸。在一些實施例中，第一代CAR包含抗原結合結構域、跨膜結構域及信號傳導結構域。在一些實施例中，信號傳導結構域在T細胞活化期間調介下游信號傳導。

【0781】在一些實施例中，本文所述細胞中之任一者包含編碼CAR或第二代CAR之核酸。在一些實施例中，第二代CAR包含抗原結合結構域、跨膜結構域及兩個信號傳導結構域。在一些實施例中，信號傳導結構域在T細胞活化期間調介下游信號傳導。在一些實施例中，信號傳導結構域係共刺激結構域。在一些實施例中，共刺激結構域在T細胞活化期間增強體細胞介素產生、CAR-T細胞增殖及/或CAR-T細胞持久性。

【0782】在一些實施例中，本文所述細胞中之任一者包含編碼CAR或第三代CAR之核酸。在一些實施例中，第三代CAR包含抗原結合結構域、跨膜結構域及至少三個信

號傳導結構域。在一些實施例中，信號傳導結構域在T細胞活化期間調介下游信號傳導。在一些實施例中，信號傳導結構域係共刺激結構域。在一些實施例中，共刺激結構域在T細胞活化期間增強體細胞介素產生、CAR-T細胞增殖及或CAR-T細胞持久性。在一些實施例中，第三代CAR包含至少兩個共刺激結構域。在一些實施例中，至少兩個共刺激結構域並不相同。

【0783】在一些實施例中，本文所述細胞中之任一者包含編碼CAR或第四代CAR之核酸。在一些實施例中，第四代CAR包含抗原結合結構域、跨膜結構域及至少兩個、三個或四個信號傳導結構域。在一些實施例中，信號傳導結構域在T細胞活化期間調介下游信號傳導。在一些實施例中，信號傳導結構域係共刺激結構域。在一些實施例中，共刺激結構域在T細胞活化期間增強體細胞介素產生、CAR-T細胞增殖及或CAR-T細胞持久性。

10. 包含抗體或其抗原結合部分之ABD

【0784】在一些實施例中，CAR抗原結合結構域係或包含抗體或其抗原結合部分。在一些實施例中，CAR抗原結合結構域係或包含scFv或Fab。在一些實施例中，CAR抗原結合結構域包含以下抗體之scFv或Fab片段：CD19抗體；CD22抗體；T細胞α鏈抗體；T細胞β鏈抗體；T細胞γ鏈抗體；T細胞δ鏈抗體；CCR7抗體；CD3抗體；CD4抗體；CD5抗體；CD7抗體；CD8抗體；CD11b抗體；CD11c

抗體；CD16抗體；CD20抗體；CD21抗體；CD25抗體；CD28抗體；CD34抗體；CD35抗體；CD40抗體；CD45RA抗體；CD45RO抗體；CD52抗體；CD56抗體；CD62L抗體；CD68抗體；CD80抗體；CD95抗體；CD117抗體；CD127抗體；CD133抗體；CD137 (4-1 BB)抗體；CD163抗體；F4/80抗體；IL-4Ra抗體；Sca-1抗體；CTLA-4抗體；GITR抗體GARP抗體；LAP抗體；顆粒酶B抗體；LFA-1抗體；MR1抗體；uPAR抗體；或轉鐵蛋白受體抗體。

【0785】在一些實施例中，CAR包含信號傳導結構域，其係共刺激結構域。在一些實施例中，CAR包含第二共刺激結構域。在一些實施例中，CAR包含至少兩個共刺激結構域。在一些實施例中，CAR包含至少三個共刺激結構域。在一些實施例中，CAR包含選自以下中之一或多者之共刺激結構域：CD27、CD28、4-1BB、CD134/OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴球功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、與CD83特異性結合之配位體。在一些實施例中，若CAR包含兩個或更多個共刺激結構域，則兩個共刺激結構域係不同的。在一些實施例中，若CAR包含兩個或更多個共刺激結構域，則兩個共刺激結構域係相同的。

【0786】除本文所述之CAR外，多種嵌合抗原受體及編碼其之核苷酸序列為此項技術中已知且將適用於如本文所述之活體內及活體外靶細胞之融合體遞送及再程式化。參見例如WO2013040557；WO2012079000；WO2016030414；

Smith T等人，Nature Nanotechnology. 2017. DOI: 10.1038/NNANO.2017.57，該等文獻之揭示內容以引用方式併入本文中。

11. CAR之其他描述

【0787】在某些實施例中，細胞可包含編碼CAR之外源多核苷酸。CAR(亦稱為嵌合免疫受體、嵌合T細胞受體或人工T細胞受體)係已經改造以給予宿主細胞(例如T細胞)靶向特定蛋白質之新能力的受體蛋白。受體係嵌合的，此乃因其將抗原結合功能及T細胞活化功能組合至單一受體中。可使用本揭示案之多順反子載體在宿主細胞(例如T細胞)中表現一或多種CAR用於針對多種靶抗原之基於細胞之療法。由一或多種表現盒表現之CAR可相同或不同。在該等實施例中，CAR可包含特異性結合靶抗原之細胞外結合結構域(亦稱為「結合劑」)、跨膜結構域及細胞內信號傳導結構域。在某些實施例中，CAR可進一步包含一或多個其他元件，包括一或多種信號肽、一或多個細胞外鉸鏈結構域及/或一或多個細胞內共刺激結構域。結構域可彼此直接鄰近，或可存在連接結構域之一或多個胺基酸。編碼CAR之核苷酸序列可衍生自哺乳動物序列，例如小鼠序列、靈長類動物序列、人類序列或其組合。在編碼CAR之核苷酸序列為非人類之情形下，CAR之序列可經人類化。編碼CAR之核苷酸序列亦可經密碼子最佳化用於在哺乳動物細胞(例如人類細胞)中表現。在該等實施例中

之任一者中，編碼CAR之核苷酸序列可與本文所揭示之任一核苷酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)。序列變異可歸因於密碼子最佳化、人類化、基於限制酶之選殖瘢痕及/或連接功能結構域之其他胺基酸殘基等。

【0788】在某些實施例中，CAR可在N末端包含信號肽。信號肽之非限制性實例包括CD8α信號肽、IgK信號肽及顆粒球-巨噬細胞群落刺激因子受體次單元α (GMCSFR-α，亦稱為群落刺激因子2受體次單元α (CSF2RA))信號肽及其變異體，其胺基酸序列提供於下**表2**中。

表2. 信號肽之例示性序列

SEQ ID NO:	序列	描述
6	MALPVTALLLPLALLLHAARP	CD8α信號肽
7	METDTLLLWVLLLWVPGSTG	IgK信號肽
8	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	GMCSFR-α (CSF2RA)信號肽

【0789】在某些實施例中，CAR之細胞外結合結構域可包含特異性針對一種靶抗原或多種靶抗原之一或多種抗體。抗體可為抗體片段(例如scFv)或單結構域抗體片段(例如VHH)。在某些實施例中，scFv可包含抗體之藉由連接體連結之重鏈可變區(V_H)及輕鏈可變區(V_L)。V_H及V_L可以任一順序連結，即V_H-連接體-V_L或V_L-連接體-V_H。連接體之非限制性實例包括Whitlow連接體、$(G_4S)_n$ (n可為正整數，例如1、2、3、4、5、6等)連接體及其變異體。在某些實施例中，抗原可為在腫瘤細胞上排他性或優先表現之

抗原或為自體免疫或發炎性疾病所特有之抗原。例示性靶抗原包括(但不限於) CD5、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD70、κ、λ及B細胞成熟劑(BCMA)、G蛋白偶合受體家族C群5成員D (GPRC5D) (與白血病相關)；CS1/SLAMF7、CD38、CD138、GPRC5D、TACI及BCMA (與骨髓瘤相關)；GD2、HER2、EGFR、EGFRvIII、B7H3、PSMA、PSCA、CAIX、CD171、CEA、CSPG4、EPHA2、FAP、FRα、IL-13Rα、間皮素、MUC1、MUC16及ROR1 (與實體腫瘤相關)。在該等實施例中之任一者中，CAR之細胞外結合結構域可經密碼子最佳化用於在宿主細胞中表現或具有變異體序列以增加細胞外結合結構域之功能。

【0790】在某些實施例中，CAR可包含鉸鏈結構域，亦稱為間隔體。術語「鉸鏈」及「間隔體」在本揭示案中可互換使用。鉸鏈結構域之非限制性實例包括CD8α鉸鏈結構域、CD28鉸鏈結構域、IgG4鉸鏈結構域、IgG4鉸鏈-CH2-CH3結構域及其變異體，其胺基酸序列提供於下**表3**中。

表 3. 鉸鏈結構域之例示性序列

SEQ ID NO:	序列	描述
9	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	CD8α 鉸鏈結構域
10	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP	CD28 鉸鏈結構域
113	AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP	CD28 鉸鏈結構域
11	ESKYGPPCPPCP	IgG4 鉸鏈結構域
12	ESKYGPPCPSCP	IgG4 鉸鏈結構域
13	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	IgG4 鉸鏈-CH2-CH3 結構域

【0791】在某些實施例中，CAR之跨膜結構域可包含T細胞受體之α、β或ζ鏈、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154或其功能變異體之跨膜區，包括該等序列中每一者之人類形式。在其他實施例中，跨膜結構域可包含CD8α、CD8β、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、FcεRIγ、CD16、OX40/CD134、CD3ζ、CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、TCRβ、TCRζ、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD37、CD80、CD86、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS及FGFR2B或其功能變異體之跨膜區，包括該等序列中每一者之人類形式。**表 4**提供幾個例示性跨膜結構域之

胺基酸序列。

表 4. 跨膜結構域之例示性序列

SEQ ID NO:	序列	描述
14	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	CD8α 跨膜結構域
15	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 跨膜結構域
114	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 跨膜結構域

【0792】在某些實施例中，CAR之細胞內信號傳導結構域及/或細胞內共刺激結構域可包含一或多個選自以下之信號傳導結構域：B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA/CD272、CD28、CTLA-4、Gi24/VISTA/B7-H5、ICOS/CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC、PDCD6、4-1BB/TNFSF9/CD137、4-1BB 配位體/TNFSF9、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BAFF R/TNFRSF13C、CD27/TNFRSF7、CD27 配位體/TNFSF7、CD30/TNFRSF8、CD30配位體/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、CD40/TNFSF5、CD40 配位體/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、GITR/TNFRSF18、GITR 配位體/TNFSF18、HVEM/TNFRSF14、LIGHT/TNFSF14、淋巴毒素-α/TNFβ、OX40/TNFRSF4、OX40 配位體/TNFSF4、RELT/TNFRSF19L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNFα、TNF RII/TNFRSF1B、2B4/CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SLAMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、CD229/SLAMF3、

CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6、SLAM/CD150、CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、CD200、CD300a/LMIR1、I類HLA、HLA-DR、Ikaros、整合素α4/CD49d、整合素α4 β1、整合素α4 β7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DAP12、Dectin-1/CLEC7A、DPPIV/CD26、EphB6、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLP R、淋巴球功能相關抗原-1 (LFA-1)、NKG2C、CD3ζ、基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)、CD27、CD28、4-1BB、CD134/OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴球功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、與CD83特異性結合之配位體及其功能變異體，包括該等序列中每一者之人類形式。在一些實施例中，細胞內信號傳導結構域及/或細胞內共刺激結構域包含一或多個選自以下之信號傳導結構域：CD3ζ結構域、ITAM、CD28結構域、4-1BB結構域或其功能變異體。**表5**提供幾個例示性細胞內共刺激及/或信號傳導結構域之胺基酸序列。在某些實施例中，如在如下文所述之替沙崙賽之情形下，SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域可在胺基酸位置14具有突變，例如麩醯胺酸(Q)至離胺酸(K)突變(參見SEQ ID NO:115)。

表 5. 細胞內共刺激及/或信號傳導結構域之例示性序列

SEQ ID NO:	E	描述
16	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB 共刺激結構域
17	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 共刺激結構域
18	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ信號傳導結構域
115	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ信號傳導結構域 (在位置 14 處具有 Q 至 K 突變)

【0793】在其中多順反子載體編碼兩個或更多個CAR之某些實施例中，兩個或更多個CAR可包含相同之功能結構域、或一或多個不同之功能結構域，如所述。舉例而言，兩個或更多個CAR可包含不同之信號肽、細胞外結合結構域、鉸鏈結構域、跨膜結構域、共刺激結構域及/或細胞內信號傳導結構域，以最小化因序列相似性所致之重組風險。或替代地，兩個或更多個CAR可包含相同結構域。在其中使用相同結構域及/或骨架之情形下，視情況地在核苷酸序列水準上引入密碼子趨異性以最小化重組之風險。

CD19 CAR

【0794】在一些實施例中，CAR係CD19 CAR(「CD19-CAR」)，且在該等實施例中，多順反子載體包

含含有編碼CD19 CAR之核苷酸序列之表現盒。在一些實施例中，CD19 CAR可包含信號肽、特異性結合CD19之細胞外結合結構域、鉸鏈結構域、跨膜結構域、細胞內共刺激結構域及/或串聯細胞內信號傳導結構域。

【0795】在一些實施例中，CD19 CAR之信號肽包含CD8α信號肽。在一些實施例中，CD8α信號肽包含SEQ ID NO:6中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:6中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，信號肽包含IgK信號肽。在一些實施例中，IgK信號肽包含SEQ ID NO:7中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:7中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，信號肽包含GMCSFR-α或CSF2RA信號肽。在一些實施例中，GMCSFR-α或CSF2RA信號肽包含SEQ ID NO:8中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:8中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0796】在一些實施例中，CD19 CAR之細胞外結合結構域特異性針對CD19，例如人類CD19。CD19 CAR之細胞外結合結構域可經密碼子最佳化用於在宿主細胞中表現

或具有變異體序列以增加細胞外結合結構域之功能。在一些實施例中，細胞外結合結構域包含免疫球蛋白分子之免疫原性活性部分，例如scFv。

【0797】在一些實施例中，CD19 CAR之細胞外結合結構域包含衍生自FMC63單株抗體(FMC63)之scFv，其包含FMC63之藉由連接體連結之重鏈可變區(V_H)及輕鏈可變區(V_L)。FMC63及衍生之scFv已闡述於Nicholson等人，Mol. Immun. 34(16-17):1157-1165 (1997)及PCT申請公開案第WO2018/213337號中，該等文獻中每一者之全部內容皆以引用方式併入本文中。在一些實施例中，完整FMC63源性scFv (亦稱為 FMC63 scFv)及其不同部分之胺基酸序列提供於下**表6**中。在一些實施例中，CD19特異性scFv包含SEQ ID NO:19、20、25中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:19、20、25中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，CD19特異性scFv可包含一或多個CDR，其具有SEQ ID NO: 21-23及26-28中所述之胺基酸序列。在一些實施例中，CD19特異性scFv可包含具有一或多個CDR之輕鏈，該一或多個CDR具有SEQ ID NO: 21-23中所述之胺基酸序列。在一些實施例中，CD19特異性scFv可包含具有一或多個CDR之重鏈，該一或多個CDR具有SEQ ID NO: 26-28中所述之胺基酸序列。在該等實施例中之任一者中，CD19特異性scFv可包含一或多個

CDR，其包含一或多個胺基酸取代，或包含與所鑑別之任一序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之序列。在一些實施例中，CD19 CAR之細胞外結合結構域包含如本文所述之一或多個CDR或由其組成。

【0798】在一些實施例中，連接scFv之V_H及V_L部分之連接體係Whitlow連接體，其具有SEQ ID NO:24中所述之胺基酸序列。在一些實施例中，Whitlow連接體可由不同連接體(例如具有SEQ ID NO:30中所述之胺基酸序列之3×G_4S連接體)替代，此產生具有SEQ ID NO:29中所述之胺基酸序列之不同之FMC63源性scFv。在某些該等實施例中，CD19特異性scFv包含SEQ ID NO:29中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:29中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

表 6. 抗 CD19 scFv 及組分之例示性序列

SEQ ID NO:	胺基酸序列	描述
19	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPYTFGGGTKLEITGS TSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQ ESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL GVIWGSETTYYNSALKSRLTII KDNSKSQVFLKMNSLQTDDTA IYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSS	抗 CD19 FMC63 scFv 完整序列，具有 Whitlow 連接體
20	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPYTFGGGTKLEIT	抗 CD19 FMC63 scFv 輕鏈可變區
21	QDISKY	抗 CD19 FMC63 scFv 輕鏈 CDR1
22	HTS	抗 CD19 FMC63 scFv 輕鏈 CDR2
23	QQGNTLPYT	抗 CD19 FMC63 scFv 輕鏈 CDR3
24	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Whitlow 連接體
25	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTC TVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYYNSALK SRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYYGGSYA MDYWGQGTSVTVSS	抗 CD19 FMC63 scFv 重鏈可變區
26	GVSLPDYG	抗 CD19 FMC63 scFv 重鏈 CDR1
27	IWGSETT	抗 CD19 FMC63 scFv 重鏈 CDR2
28	AKHYYYGGSYAMDY	抗 CD19 FMC63 scFv 重鏈 CDR3
29	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYF	抗 CD19 FMC63 scFv 完整序列，具有 3×G_4S 連接體

	CQQGNTLPYTFGGGTKLEITG GGGSGGGGSGGGGSEVKLQES GPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGV IWGSETTYYNSALKSRLTIIKD NSKSQVFLKMNSLQTDDTAIY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQ GTSVTVSS	
30	GGGGSGGGGSGGGGS	3×G_4S 連接體

【0799】在一些實施例中，CD19 CAR之細胞外結合結構域衍生自特異性針對CD19之抗體，包括例如SJ25C1 (Bejcek等人，Cancer Res. 55:2346-2351 (1995))、HD37 (Pezutto等人，J. Immunol. 138(9):2793-2799 (1987))、4G7 (Meeker等人，Hybridoma 3:305-320 (1984))、B43 (Bejcek (1995))、BLY3 (Bejcek (1995))、B4 (Freedman等人，70:418-427 (1987))、B4 HB12b (Kansas及Tedder, J. Immunol. 147:4094-4102 (1991)；Yazawa等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:15178-15183 (2005)；Herbst等人，J. Pharmacol. Exp. Ther. 335:213-222 (2010))、BU12 (Callard等人，J. Immunology, 148(10): 2983-2987 (1992))及CLB-CD19 (De Rie Cell. Immunol. 118:368-381(1989))。在該等實施例中之任一者中，CD19 CAR之細胞外結合結構域可包含任一抗體之V_H、V_L及/或一或多個CDR或由其組成。

【0800】在一些實施例中，CD19 CAR之鉸鏈結構域包含CD8α鉸鏈結構域，例如人類CD8α鉸鏈結構域。在一些實施例中，CD8α鉸鏈結構域包含SEQ ID NO:9中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:9中所述之胺基酸序列至少

80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含CD28鉸鏈結構域，例如人類CD28鉸鏈結構域。在一些實施例中，CD28鉸鏈結構域包含SEQ ID NO:10中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:10中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含IgG4鉸鏈結構域，例如人類IgG4鉸鏈結構域。在一些實施例中，IgG4鉸鏈結構域包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含IgG4鉸鏈-Ch2-Ch3結構域，例如人類IgG4鉸鏈-Ch2-Ch3結構域。在一些實施例中，IgG4鉸鏈-Ch2-Ch3結構域包含SEQ ID NO:13中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:13中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0801】在一些實施例中，CD19 CAR之跨膜結構域包含CD8α跨膜結構域，例如人類CD8α跨膜結構域。在一

些實施例中，CD8α跨膜結構域包含SEQ ID NO:14中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:14中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，跨膜結構域包含CD28跨膜結構域，例如人類CD28跨膜結構域。在一些實施例中，CD28跨膜結構域包含SEQ ID NO:15中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:15中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0802】在一些實施例中，CD19 CAR之細胞內共刺激結構域包含4-1BB共刺激結構域。4-1BB (亦稱為CD137)將強效共刺激信號傳遞至T細胞，從而促進T淋巴球之分化並增強其長期存活。在一些實施例中，4-1BB共刺激結構域為人類。在一些實施例中，4-1BB共刺激結構域包含SEQ ID NO:16中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:16中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，細胞內共刺激結構域包含CD28共刺激結構域。CD28係T細胞上之另一共刺激分子。在一些實施例中，CD28共刺激結構域為人類。在一些實施例中，CD28共刺激結構域包含SEQ ID NO:17中所述之胺基酸序

列，或與SEQ ID NO:17中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，CD19 CAR之細胞內共刺激結構域包含如所述之4-1BB共刺激結構域及CD28共刺激結構域。

【0803】在一些實施例中，CD19 CAR之細胞內信號傳導結構域包含CD3 zeta (ζ)信號傳導結構域。CD3ζ與T細胞受體(TCR)締合以產生信號且含有基於酪胺酸之免疫受體活化基元(ITAM)。CD3ζ信號傳導結構域係指來自ζ鏈之細胞質結構域之足以在功能上傳遞T細胞活化所需之初始信號之胺基酸殘基。在一些實施例中，CD3ζ信號傳導結構域為人類。在一些實施例中，CD3ζ信號傳導結構域包含SEQ ID NO:18中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:18中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0804】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD19 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD19 CAR包括例如包含以下之CD19 CAR：具有SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:29中所述之序列之CD19特異性scFv、SEQ ID NO:9之CD8α鉸鏈結構域、SEQ ID NO:14之CD8α跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示

之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。在該等實施例中之任一者中，CD19 CAR可另外包含如所述之信號肽(例如CD8α信號肽)。

【0805】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD19 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD19 CAR包括例如包含以下之CD19 CAR：具有SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:29中所述之序列之CD19特異性scFv、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12之IgG4鉸鏈結構域、SEQ ID NO:15之CD28跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。在該等實施例中之任一者中，CD19 CAR可另外包含如所述之信號肽(例如CD8α信號肽)。

【0806】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD19 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD19 CAR包括例如包含以下之CD19 CAR：具有SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:29中所述之序列之CD19特異性scFv、SEQ ID NO:10之CD28鉸鏈結構域、SEQ ID NO:15之CD28跨膜結構域、SEQ ID NO:17之CD28共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少

90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。在該等實施例中之任一者中，CD19 CAR可另外包含如所述之信號肽(例如CD8α信號肽)。

【0807】在一些實施例中，多順反子載體包含表現盒，其含有如SEQ ID NO:116中所述之編碼CD19 CAR之核苷酸序列或與SEQ ID NO:116中所述之核苷酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)(參見**表7**)。經編碼CD19 CAR具有SEQ ID NO:117中所述之相應胺基酸序列或與SEQ ID NO:117中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)，具有以下組分：CD8α信號肽、FMC63 scFv (V_L-Whitlow連接體-V_H)、CD8α鉸鏈結構域、CD8α跨膜結構域、4-1BB共刺激結構域及CD3ζ信號傳導結構域。

【0808】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD19 CAR之市售實施例之核苷酸序列之表現盒。由T細胞表現及/或編碼之CD19 CAR之市售實施例的非限制性實例包括替沙崙賽、利基邁崙賽、阿基崙賽及佈瑞基奧侖塞。

【0809】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼替沙崙賽或其部分之核苷酸序列之表現盒。替沙崙賽包含具有以下組分之CD19 CAR：CD8α信號肽、FMC63 scFv (V_L-3×G_4S連接體-V_H)、CD8α鉸鏈結構域、CD8α跨膜結構

域、4-1BB共刺激結構域及CD3ζ信號傳導結構域。替沙崙賽中CD19 CAR之核苷酸及胺基酸序列提供於**表7**中，且序列之注解提供於**表8**中。

【0810】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼利基邁崙賽或其部分之核苷酸序列之表現盒。利基邁崙賽包含具有以下組分之CD19 CAR：GMCSFR-α或CSF2RA信號肽、FMC63 scFv (V_L-Whitlow連接體-V_H)、IgG4鉸鏈結構域、CD28跨膜結構域、4-1BB共刺激結構域及CD3ζ信號傳導結構域。利基邁崙賽中CD19 CAR之核苷酸及胺基酸序列提供於**表7**中，且序列之注解提供於**表9**中。

【0811】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼阿基崙賽或其部分之核苷酸序列之表現盒。阿基崙賽包含具有以下組分之CD19 CAR：GMCSFR-α或CSF2RA信號肽、FMC63 scFv (V_L-Whitlow連接體-V_H)、CD28鉸鏈結構域、CD28跨膜結構域、CD28共刺激結構域及CD3ζ信號傳導結構域。阿基崙賽中CD19 CAR之核苷酸及胺基酸序列提供於**表7**中，且序列之注解提供於**表10**中。

【0812】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼佈瑞吉奧侖塞或其部分之核苷酸序列之表現盒。佈瑞基奧侖塞包含具有以下組分之CD19 CAR：GMCSFR-α信號肽、FMC63 scFv、CD28鉸鏈結構域、CD28跨膜結構域、CD28共刺激結構域及CD3ζ信號傳導結構域。

【0813】在一些實施例中，多順反子載體包含表現盒，其含有如SEQ ID NO: 31、33或35中所述之編碼CD19

CAR之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 31、33或35中所述之核苷酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)。經編碼CD19 CAR分別具有SEQ ID NO: 32、34或36中所述之相應胺基酸序列，或分別與SEQ ID NO: 32、34或36中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)。

表 7. CD19 CAR 之例示性序列

SEQ ID NO:	序列	描述
116	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggcct tgctgctccacgccgccaggccggacatccagatgaca cagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagag tcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaata tttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaac tcctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtccca tcaaggttcagtggcagtgggtctggaacagattattctct caccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttac ttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggag gggggaccaagctggagatcacaggctccacctctgga tccggcaagcccggatctggcgagggatccaccaagg gcgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtg gcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctca ggggtctcattacccgactatggtgtaagctggattcgcc agcctccacgaaagggtctggagtggctgggagtaatat ggggtagtgaaaccacatactataattcagctctcaaatc cagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagt tttcttaaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagcca tttactactgtgccaaacattattactacggtggtagctatg ctatggactactggggccaaggaacctcagtcaccgtct cctcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacacc ggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcc cagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtgc acacgagggggctggacttcgcctgtgatatctacatctg ggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtca ctggttatcacccctttactgcaaacggggcagaaagaaa ctcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaa actactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccag aagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttc agcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggc cagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaaga gaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggga ccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccct caggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagat ggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgag cgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagg gtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttc acatgcaggccctgcccccctcgc	例示性 CD19 CAR 核苷酸序列
117	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQM TQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISK YLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI	例示性 CD19 CAR 胺基酸序列

	ATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGS TSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGP GLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVS WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYW GQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	
31	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggcct tgctgctccacgccgccaggccggacatccagatgaca cagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagag tcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaata tttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaac tcctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtccca tcaaggttcagtggcagtgggtctggaacagattattctct caccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttac ttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggag gggggaccaagctggagatcacaggtggcggtggctc gggcggtggtgggtcgggtggcggcggatctgaggtg aaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctc acagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctca ttacccgactatggtgtaagctggattcgccagcctccac gaaagggtctggagtggctgggagtaatatggggtagtg aaaccacatactataattcagctctcaaatccagactgacc atcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaat gaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgt gccaaacattattactacggtggtagctatgctatggacta ctggggccaaggaacctcagtcaccgtctcctcaaccac gacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccac catcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgt gccggccagcggcgggggggcgcagtgcacacgaggg ggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttg gccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcac cctttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatata ttcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaag aggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaag aaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagc	替沙崙賽 CD19 CAR 核苷酸序列

	gcagacgcccccgcgtacaagcagggccagaaccagc tctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacg atgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgg ggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcct gtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcct acagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggg caaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagc caccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccct gccccctcgc	
32	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQM TQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISK YLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITG GGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGL VAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSA LKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	替沙崙賽 CD19 CAR 胺基酸序列
33	atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgagctgc cccaccccgcctttctgctgatccccgacatccagatgac ccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcgac cgggtgaccatcagctgccgggccagccaggacatca gcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggc accgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcac agcggcgtgcccagccggtttagcggcagcggctccg gcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacag gaagatatcgccacctacttttgccagcagggcaacaca ctgccctacacctttggcggcggaacaaagctggaaatc accggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcg gcgagggcagcaccaagggcgaggtgaagctgcagg aaagcggccctggcctggtggcccccagccagagcct gagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccg actacggcgtgagctggatccggcagcccccaggaa gggcctggaatggctgggcgtgatctggggcagcgag	利基邁崙賽 CD19 CAR 核苷酸序列

	accacctactacaacagcgccctgaagagccggctgac catcatcaaggacaacagcaagagccaggtgttcctgaa gatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctact actgcgccaagcactactactacggcggcagctacgcc atggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgag cagcgaatctaagtacggaccgccctgccccccttgccc tatgttctgggtgctggtggtggtcggaggcgtgctggcc tgctacagcctgctggtcaccgtggccttcatcatcttttgg gtgaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaa caaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaa gatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaagga ggatgtgaactgcgggtgaagttcagcagaagcgccga cgcccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtaca acgagctgaacctgggcagaagggaagagtacgacgt cctggataagcggagaggccgggaccctgagatgggc ggcaagcctcggcggaagaacccccaggaaggcctgt ataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctac agcgagatcggcatgaagggcgagcggaggcggggc aagggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgc caccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccc tgcccccaagg	
34	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMT QTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKY LNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGST SGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPG LVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVS WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYW GQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFW VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	利基邁崙賽 CD19 CAR 胺基酸序列
35	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttacca cacccagcattcctcctgatcccagacatccagatgacac agactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagt caccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaatat ttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaact	阿基崙賽 CD19 CAR 核苷酸序列

	cctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcccat caaggttcagtggcagtgggtctggaacagattattctctc accattagcaacctggagcaagaagatattgccacttact tttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggagg ggggactaagttggaaataacaggctccacctctggatc cggcaagcccggatctggcgagggatccaccaagggc gaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggc gccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcagg ggtctcattacccgactatggtgtaagctggattcgccag cctccacgaaagggtctggagtggctgggagtaatatgg ggtagtgaaaccacatactataattcagctctcaaatccag actgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttc ttaaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagccattta ctactgtgccaaacattattactacggtggtagctatgctat ggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctc agcggccgcaattgaagttatgtatcctcctccttacctag acaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaag ggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttct aagccctttgggtgctggtggtggttgggggagtcctgg cttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgg gtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgacta catgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgca agcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcag cctatcgctccagagtgaagttcagcaggagcgcagac gcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataa cgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttt ggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggg aaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtac aatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacag tgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaag gggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccacc aaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcc ccctcgc	
36	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMT QTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKY LNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGST SGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPG LVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVS WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYW GQGTSVTVSSAAAIEVMYPPPYLDN EKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP	阿基崙賽 CD19 CAR 胺基酸序列

	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF WVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	

表 8. 替沙崙賽 CD19 CAR 序列之注解

特徵	核苷酸序列位置	胺基酸序列位置
CD8α 信號肽	1-63	1-21
FMC63 scFv (V_L-3×G_4S 連接體-V_H)	64-789	22-263
CD8α 鉸鏈結構域	790-924	264-308
CD8α 跨膜結構域	925-996	309-332
4-1BB 共刺激結構域	997-1122	333-374
CD3ζ 信號傳導結構域	1123-1458	375-486

表 9. 利基邁崙賽 CD19 CAR 序列之注解

特徵	核苷酸序列位置	胺基酸序列位置
GMCSFR-α 信號肽	1-66	1-22
FMC63 scFv (V_L-Whitlow 連接體-V_H)	67-801	23-267
IgG4 鉸鏈結構域	802-837	268-279
CD28 跨膜結構域	838-921	280-307
4-1BB 共刺激結構域	922-1047	308-349
CD3ζ 信號傳導結構域	1048-1383	350-461

表 10. 阿基崙賽 CD19 CAR 序列之注解

特徵	核苷酸序列位置	胺基酸序列位置
CSF2RA 信號肽	1-66	1-22
FMC63 scFv (V_L-Whitlow 連接體-V_H)	67-801	23-267
CD28 鉸鏈結構域	802-927	268-309
CD28 跨膜結構域	928-1008	310-336
CD28 共刺激結構域	1009-1131	337-377
CD3ζ 信號傳導結構域	1132-1467	378-489

【0814】在一些實施例中，多順反子載體包含表現盒，其含有如SEQ ID NO: 31、33或35中所述之編碼CD19 CAR之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 31、33或35中所述之核苷酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)。經編碼CD19 CAR分別具有SEQ ID NO: 32、34或36中所述之相應胺基酸序列，分別與SEQ ID NO: 32、34或36中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)。

CD20 CAR

【0815】在一些實施例中，CAR係CD20 CAR(「CD20-CAR」)，且在該等實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD20 CAR之核苷酸序列之表現盒。CD20係早在前B期即在B細胞表面上以逐漸增加直至B細胞成熟之水準以及在大多數B細胞贅瘤之細胞上發現之抗原。CD20陽性細胞有時亦發現於霍奇金氏病、骨髓瘤及胸腺瘤之病例

中。在一些實施例中，CD20 CAR可包含信號肽、特異性結合CD20之細胞外結合結構域、鉸鏈結構域、跨膜結構域、細胞內共刺激結構域及/或串聯細胞內信號傳導結構域。

【0816】在一些實施例中，CD20 CAR之信號肽包含CD8α信號肽。在一些實施例中，CD8α信號肽包含SEQ ID NO:6中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:6中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，信號肽包含IgK信號肽。在一些實施例中，IgK信號肽包含SEQ ID NO:7中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:7中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，信號肽包含GMCSFR-α或CSF2RA信號肽。在一些實施例中，GMCSFR-α或CSF2RA信號肽包含SEQ ID NO:8中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:8中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0817】在一些實施例中，CD20 CAR之細胞外結合結構域特異性針對CD20，例如人類CD20。CD20 CAR之細胞外結合結構域可經密碼子最佳化用於在宿主細胞中表現

或具有變異體序列以增加細胞外結合結構域之功能。在一些實施例中，細胞外結合結構域包含免疫球蛋白分子之免疫原性活性部分，例如scFv。

【0818】在一些實施例中，CD20 CAR之細胞外結合結構域衍生自特異性針對CD20之抗體，包括例如Leu16、IF5、1.5.3、利妥昔單抗(rituximab)、奧妥珠單抗(obinutuzumab)、替伊莫單抗(ibritumomab)、奧法木單抗(ofatumumab)、托西莫單抗(tositumumab)、奧尼妥單抗(odronextamab)、維妥珠單抗(veltuzumab)、烏妥昔單抗(ublituximab)及歐瑞珠單抗(ocrelizumab)。在一些實施例中，CD20 CAR衍生自特異性針對CD20之CAR，包括例如MB-106、UCART20或C-CAR066，如**表11A**中所詳述。在該等實施例中之任一者中，CD20 CAR之細胞外結合結構域可包含**表11A**中所詳述之任一抗體或CAR之V_H、V_L及/或一或多個CDR或由其組成。

表11A. 例示性CD20特異性CAR

CAR名稱	抗原	公司	參考文獻
MB-106	CD20	Fred Hutchinson Cancer Research Center	Shadman等人，Blood 134 (增刊_1):3235 (2019)
UCART20	CD20	Cellectis	www.cellbiomedgroup.com
C-CAR066	CD20	Cellular Biomedicine Group	Liang等人，J Clin Oncol 39(15)_增刊:2508-2508 (2021)

【0819】在一些實施例中，CD20 CAR之細胞外結合結構域包含衍生自Leu16單株抗體之scFv，其包含Leu16之藉由連接體連結之重鏈可變區(V_H)及輕鏈可變區(V_L)。參

見Wu等人，Protein Engineering. 14(12):1025-1033 (2001)。在一些實施例中，連接體係3×G_4S連接體。在其他實施例中，連接體係如本文所述之Whitlow連接體。在一些實施例中，完整Leu16源性scFv (亦稱為Leu16 scFv)及其不同部分之胺基酸序列提供於下**表11B**中。在一些實施例中，CD20特異性scFv包含SEQ ID NO:37、38、42中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:37、38、42中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，CD20特異性scFv可包含具有SEQ ID NO: 39-41、43及44中所述之胺基酸序列之一或多個CDR。在一些實施例中，CD20特異性scFv可包含具有一或多個CDR之輕鏈，該一或多個CDR具有SEQ ID NO: 39-41中所述之胺基酸序列。在一些實施例中，CD20特異性scFv可包含具有一或多個CDR之重鏈，該一或多個CDR具有SEQ ID NO: 43-44中所述之胺基酸序列。在該等實施例中之任一者中，CD20特異性scFv可包含一或多個CDR，其包含一或多個胺基酸取代，或包含與所鑑別之任一序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之序列。在一些實施例中，CD20 CAR之細胞外結合結構域包含如本文所述之一或多個CDR或由其組成。

表 11B. 抗 CD20 scFv 及組分之例示性序列

SEQ ID NO:	胺基酸序列	描述
37	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMT CRASSSVNYMDWYQKKPGSSP KPWIYATSNLASGVPARFSGSG SGTSYSLTISRVEAEDAATYYC QQWSFNPPTFGGGTKLEIKGST SGSGKPGSGEGSTKGEVQLQQ SGAELVKPGASVKMSCKASGY TFTSYNMHWVKQTPGQGLEW IGAIYPGNGDTSYNQKFKGKA TLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SADYYCARSNYYGSSYWFFDV WGAGTTVTVSS	抗 CD20 Leu16 scFv 完整序列，具有 Whitlow 連接體
38	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMT CRASSSVNYMDWYQKKPGSSP KPWIYATSNLASGVPARFSGSG SGTSYSLTISRVEAEDAATYYC QQWSFNPPTFGGGTKLEIK	抗 CD20 Leu16 scFv 輕鏈可變區
39	RASSSVNYMD	抗 CD20 Leu16 scFv 輕鏈 CDR1
40	ATSNLAS	抗 CD20 Leu16 scFv 輕鏈 CDR2
41	QQWSFNPPT	抗 CD20 Leu16 scFv 輕鏈 CDR3
42	EVQLQQSGAELVKPGASVKMS CKASGYTFTSYNMHWVKQTP GQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQ KFKGKATLTADKSSSTAYMQL SSLTSEDSADYYCARSNYYGSS YWFFDVWGAGTTVTVSS	抗 CD20 Leu16 scFv 重鏈
43	SYNMH	抗 CD20 Leu16 scFv 重鏈 CDR1
44	AIYPGNGDTSYNQKFKG	抗 CD20 Leu16 scFv 重鏈 CDR2

【0820】在一些實施例中，CD20 CAR之鉸鏈結構域包含CD8α鉸鏈結構域，例如人類CD8α鉸鏈結構域。在一

些實施例中，CD8α鉸鏈結構域包含SEQ ID NO:9中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:9中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含CD28鉸鏈結構域，例如人類CD28鉸鏈結構域。在一些實施例中，CD28鉸鏈結構域包含SEQ ID NO:10中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:10中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含IgG4鉸鏈結構域，例如人類IgG4鉸鏈結構域。在一些實施例中，IgG4鉸鏈結構域包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含IgG4鉸鏈-Ch2-Ch3結構域，例如人類IgG4鉸鏈-Ch2-Ch3結構域。在一些實施例中，IgG4鉸鏈-Ch2-Ch3結構域包含SEQ ID NO:13中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:13中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0821】在一些實施例中，CD20 CAR之跨膜結構域包含CD8α跨膜結構域，例如人類CD8α跨膜結構域。在一些實施例中，CD8α跨膜結構域包含SEQ ID NO:14中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:14中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，跨膜結構域包含CD28跨膜結構域，例如人類CD28跨膜結構域。在一些實施例中，CD28跨膜結構域包含SEQ ID NO:15中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:15中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0822】在一些實施例中，CD20 CAR之細胞內共刺激結構域包含4-1BB共刺激結構域，例如人類4-1BB共刺激結構域。在一些實施例中，4-1BB共刺激結構域包含SEQ ID NO:16中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:16中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，細胞內共刺激結構域包含CD28共刺激結構域，例如人類CD28共刺激結構域。在一些實施例中，CD28共刺激結構域包含SEQ ID NO:17中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:17中所述之胺基酸序列至少80%

一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0823】在一些實施例中，CD20 CAR之細胞內信號傳導結構域包含CD3 zeta (ζ)信號傳導結構域，例如人類CD3ζ信號傳導結構域。在一些實施例中，CD3ζ信號傳導結構域包含SEQ ID NO:18中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:18中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0824】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD20 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD20 CAR包括例如包含以下之CD20 CAR：具有SEQ ID NO:37中所述之序列之CD20特異性scFv、SEQ ID NO:9之CD8α鉸鏈結構域、SEQ ID NO:14之CD8α跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。

【0825】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD20 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD20 CAR包括例如包含以下之CD20 CAR：具有SEQ ID NO:37中所述之序列之CD20特異性scFv、SEQ ID NO:10之CD28鉸鏈結構

域、SEQ ID NO:14之CD8α跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。

【0826】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD20 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD20 CAR包括例如包含以下之CD20 CAR：具有SEQ ID NO:37中所述之序列之CD20特異性scFv、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12之IgG4鉸鏈結構域、SEQ ID NO:14之CD8α跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。

【0827】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD20 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD20 CAR包括例如包含以下之CD20 CAR：具有SEQ ID NO:37中所述之序列之CD20特異性scFv、SEQ ID NO:9之CD8α鉸鏈結構域、SEQ ID NO:15之CD28跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。

【0828】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD20 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD20 CAR包括例如包含以下之CD20 CAR：具有SEQ ID NO:37中所述之序列之CD20特異性scFv、SEQ ID NO:10之CD28鉸鏈結構域、SEQ ID NO:15之CD28跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。

【0829】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD20 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD20 CAR包括例如包含以下之CD20 CAR：具有SEQ ID NO:37中所述之序列之CD20特異性scFv、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:1之IgG4鉸鏈結構域、SEQ ID NO:15之CD28跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。

CD22 CAR

【0830】在一些實施例中，CAR係CD22 CAR(「CD22-CAR」)，且在該等實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD22 CAR之核苷酸序列之表現盒。CD22係主

要在成熟B細胞表面上發現之跨膜蛋白，其用作B細胞受體(BCR)信號傳導之抑制性受體。CD22在60%-70%之B細胞淋巴瘤及白血病(例如B-慢性淋巴球性白血病、毛細胞白血病、急性淋巴球性白血病(ALL)及伯基特氏淋巴瘤)中表現且不存在於B細胞發育之早期階段之細胞表面或幹細胞上。在一些實施例中，CD22 CAR可包含信號肽、特異性結合CD22之細胞外結合結構域、鉸鏈結構域、跨膜結構域、細胞內共刺激結構域及/或串聯細胞內信號傳導結構域。

【0831】在一些實施例中，CD22 CAR之信號肽包含CD8α信號肽。在一些實施例中，CD8α信號肽包含SEQ ID NO:6中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:6中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，信號肽包含IgK信號肽。在一些實施例中，IgK信號肽包含SEQ ID NO:7中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:7中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，信號肽包含GMCSFR-α或CSF2RA信號肽。在一些實施例中，GMCSFR-α或CSF2RA信號肽包含SEQ ID NO:8中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:8中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少

85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0832】在一些實施例中，CD22 CAR之細胞外結合結構域特異性針對CD22，例如人類CD22。CD22 CAR之細胞外結合結構域可經密碼子最佳化用於在宿主細胞中表現或具有變異體序列以增加細胞外結合結構域之功能。在一些實施例中，細胞外結合結構域包含免疫球蛋白分子之免疫原性活性部分，例如scFv。

【0833】在一些實施例中，CD22 CAR之細胞外結合結構域衍生自特異性針對CD22之抗體，包括例如SM03、伊珠單抗(inotuzumab)、依帕珠單抗(epratuzumab)、莫妥莫單抗(moxetumomab)及匹那妥珠單抗(pinatuzumab)。在該等實施例中之任一者中，CD22 CAR之細胞外結合結構域可包含任一抗體之V_H、V_L及/或一或多個CDR或由其組成。

【0834】在一些實施例中，CD22 CAR之細胞外結合結構域包含衍生自m971單株抗體(m971)之scFv，其包含m971之藉由連接體連結之重鏈可變區(V_H)及輕鏈可變區(V_L)。在一些實施例中，連接體係3×G_4S連接體。在其他實施例中，可使用Whitlow連接體來替代。在一些實施例中，完整m971源性scFv (亦稱為m971 scFv)及其不同部分之胺基酸序列提供於下**表12**中。在一些實施例中，CD22特異性scFv包含SEQ ID NO:45、46、50中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:45、46、50中所述之胺基酸序列至少

80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，CD22特異性scFv可包含具有SEQ ID NO: 47-49及51-53中所述之胺基酸序列之一或多個CDR。在一些實施例中，CD22特異性scFv可包含具有一或多個CDR之重鏈，該一或多個CDR具有SEQ ID NO: 47-49中所述之胺基酸序列。在一些實施例中，CD22特異性scFv可包含具有一或多個CDR之輕鏈，該一或多個CDR具有SEQ ID NO: 51-53中所述之胺基酸序列。在該等實施例中之任一者中，CD22特異性scFv可包含一或多個CDR，其包含一或多個胺基酸取代，或包含與所鑑別之任一序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之序列。在一些實施例中，CD22 CAR之細胞外結合結構域包含如本文所述之一或多個CDR或由其組成。

【0835】在一些實施例中，CD22 CAR之細胞外結合結構域包含衍生自m971-L7之scFv，m971-L7係m971之親和力成熟變異體，其具有與母體抗體m971相比顯著改良之CD22結合親和力(自約2 nM改良至小於50 pM)。在一些實施例中，衍生自m971-L7之scFv包含m971-L7之藉由3×G_4S連接體連結之V_H及V_L。在其他實施例中，可使用Whitlow連接體來替代。在一些實施例中，完整m971-L7源性scFv (亦稱為m971-L7 scFv)及其不同部分之胺基酸序列

提供於下**表12**中。在一些實施例中，CD22特異性scFv包含SEQ ID NO:54、55、59中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:54、55、59中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，CD22特異性scFv可包含具有SEQ ID NO: 56-58及60-62中所述之胺基酸序列之一或多個CDR。在一些實施例中，CD22特異性scFv可包含具有一或多個CDR之重鏈，該一或多個CDR具有SEQ ID NO: 56-58中所述之胺基酸序列。在一些實施例中，CD22特異性scFv可包含具有一或多個CDR之輕鏈，該一或多個CDR具有SEQ ID NO: 60-62中所述之胺基酸序列。在該等實施例中之任一者中，CD22特異性scFv可包含一或多個CDR，其包含一或多個胺基酸取代，或包含與所鑑別之任一序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之序列。在一些實施例中，CD22 CAR之細胞外結合結構域包含如本文所述之一或多個CDR或由其組成。

表 12. 抗 CD22 scFv 及組分之例示性序列

SEQ ID NO:	胺基酸序列	描述
45	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCA ISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRG LEWLGRTYYRSKWYNDYAVSV KSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTP EDTAVYYCAREVTGDLEDAFDI WGQGTMVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQTIWSYLNWYQQRPG KAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGR GSGTDFTLTISSLQAEDFATYYC QQSYSIPQTFGQGTKLEIK	抗 CD22 m971 scFv 完整序列，具有 3×G_4S 連接體
46	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCA ISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRG LEWLGRTYYRSKWYNDYAVSV KSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTP EDTAVYYCAREVTGDLEDAFDI WGQGTMVTVSS	抗 CD22 m971 scFv 重鏈可變區
47	GDSVSSNSAA	抗 CD22 m971 scFv 重鏈 CDR1
48	TYYRSKWYN	抗 CD22 m971 scFv 重鏈 CDR2
49	AREVTGDLEDAFDI	抗 CD22 m971 scFv 重鏈 CDR3
50	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNL LIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTD FTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSI PQTFGQGTKLEIK	抗 CD22 m971 scFv 輕鏈
51	QTIWSY	抗 CD22 m971 scFv 輕鏈 CDR1
52	AAS	抗 CD22 m971 scFv 輕鏈 CDR2
53	QQSYSIPQT	抗 CD22 m971 scFv 輕鏈 CDR3
54	QVQLQQSGPGMVKPSQTLSLTC AISGDSVSSNSVAWNWIRQSPSR GLEWLGRTYYRSTWYNDYAVS MKSRITINPDTNKNQFSLQLNSV TPEDTAVYYCAREVTGDLEDAF DIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGG	抗 CD22 m971-L7 scFv 完整序列，具有 3×G_4S 連接體

	SGGGGSDIQMIQSPSSLSASVGD RVTITCRASQTIWSYLNWYRQRP GEAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSG RGSGTDFTLTISSLQAEDFATYY CQQSYSIPQTFGQGTKLEIK	
55	QVQLQQSGPGMVKPSQTLSLTC AISGDSVSSNSVAWNWIRQSPSR GLEWLGRTYYRSTWYNDYAVS MKSRITINPDTNKNQFSLQLNSV TPEDTAVYYCAREVTGDLEDAF DIWGQGTMVTVSS	抗 CD22 m971-L7 scFv 重鏈可變區
56	GDSVSSNSVA	抗 CD22 m971-L7 scFv 重鏈 CDR1
57	TYYRSTWYN	抗 CD22 m971-L7 scFv 重鏈 CDR2
58	AREVTGDLEDAFDI	抗 CD22 m971-L7 scFv 重鏈 CDR3
59	DIQMIQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQTIWSYLNWYRQRPGEAPNL LIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTD FTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSI PQTFGQGTKLEIK	抗 CD22 m971-L7 scFv 輕鏈可變區
60	QTIWSY	抗 CD22 m971-L7 scFv 輕鏈 CDR1
61	AAS	抗 CD22 m971-L7 scFv 輕鏈 CDR2
62	QQSYSIPQT	抗 CD22 m971-L7 scFv 輕鏈 CDR3

【0836】在一些實施例中，CD22 CAR之細胞外結合結構域包含免疫毒素HA22或BL22。免疫毒素BL22及HA22係治療劑，其包含特異性針對融合至細菌毒素之CD22之scFv，且因此可結合至表現CD22之癌細胞之表面並殺傷癌細胞。BL22包含抗CD22抗體RFB4之dsFv，其融合至*假單胞菌(Pseudomonas)*外毒素A之38-kDa截短形式(Bang等人，Clin. Cancer Res., 11:1545-50 (2005))。HA22

(CAT8015，莫妥莫單抗帕蘇托(moxetumomab pasudotox))係BL22之突變之更高親和力形式(Ho等人，J. Biol. Chem., 280(1): 607-17 (2005))。特異性針對CD22之HA22及BL22之抗原結合結構域之適宜序列揭示於例如美國專利第7,541,034號；美國專利第7,355,012號；及美國專利第7,982,011號中，該等美國專利之全文皆以引用方式併入本文中。

【0837】在一些實施例中，CD22 CAR之鉸鏈結構域包含CD8α鉸鏈結構域，例如人類CD8α鉸鏈結構域。在一些實施例中，CD8α鉸鏈結構域包含SEQ ID NO:9中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:9中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含CD28鉸鏈結構域，例如人類CD28鉸鏈結構域。在一些實施例中，CD28鉸鏈結構域包含SEQ ID NO:10中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:10中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含IgG4鉸鏈結構域，例如人類IgG4鉸鏈結構域。在一些實施例中，IgG4鉸鏈結構域包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12中所述之胺基酸序列至少80%一

致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含IgG4鉸鏈-Ch2-Ch3結構域，例如人類IgG4鉸鏈-Ch2-Ch3結構域。在一些實施例中，IgG4鉸鏈-Ch2-Ch3結構域包含SEQ ID NO:13中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:13中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0838】在一些實施例中，CD22 CAR之跨膜結構域包含CD8α跨膜結構域，例如人類CD8α跨膜結構域。在一些實施例中，CD8α跨膜結構域包含SEQ ID NO:14中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:14中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，跨膜結構域包含CD28跨膜結構域，例如人類CD28跨膜結構域。在一些實施例中，CD28跨膜結構域包含SEQ ID NO:15中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:15中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0839】在一些實施例中，CD22 CAR之細胞內共刺激結構域包含4-1BB共刺激結構域，例如人類4-1BB共刺

激結構域。在一些實施例中，4-1BB共刺激結構域包含SEQ ID NO:16中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:16中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，細胞內共刺激結構域包含CD28共刺激結構域，例如人類CD28共刺激結構域。在一些實施例中，CD28共刺激結構域包含SEQ ID NO:17中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:17中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0840】在一些實施例中，CD22 CAR之細胞內信號傳導結構域包含CD3 zeta (ζ)信號傳導結構域，例如人類CD3ζ信號傳導結構域。在一些實施例中，CD3ζ信號傳導結構域包含SEQ ID NO:18中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:18中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0841】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD22 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD22 CAR包括例如包含以下之CD22 CAR：具有SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:54中所述之序列之CD22特異性scFv、SEQ ID NO:9之

CD8α鉸鏈結構域、SEQ ID NO:14之CD8α跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。

【0842】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD22 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD22 CAR包括例如包含以下之CD22 CAR：具有SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:54中所述之序列之CD22特異性scFv、SEQ ID NO:10之CD28鉸鏈結構域、SEQ ID NO:14之CD8α跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。

【0843】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD22 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD22 CAR包括例如包含以下之CD22 CAR：具有SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:54中所述之序列之CD22特異性scFv、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12之IgG4鉸鏈結構域、SEQ ID NO:14之CD8α跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少

85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。

【0844】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD22 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD22 CAR包括例如包含以下之CD22 CAR：具有SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:54中所述之序列之CD22特異性scFv、SEQ ID NO:9之CD8α鉸鏈結構域、SEQ ID NO:15之CD28跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。

【0845】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD22 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD22 CAR包括例如包含以下之CD22 CAR：具有SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:54中所述之序列之CD22特異性scFv、SEQ ID NO:10之CD28鉸鏈結構域、SEQ ID NO:15之CD28跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。

【0846】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼CD22 CAR之核苷酸序列之表現盒，該CD22 CAR包括例

如包含以下之CD22 CAR：具有SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:54中所述之序列之CD22特異性scFv、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12之IgG4鉸鏈結構域、SEQ ID NO:15之CD28跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。

BCMA CAR

【0847】在一些實施例中，CAR係BCMA CAR(「BCMA-CAR」)，且在該等實施例中，多順反子載體包含含有編碼BCMA CAR之核苷酸序列之表現盒。BCMA係在B細胞譜系細胞上表現之腫瘤壞死家族受體(TNFR)成員，且在終末分化B細胞或成熟B淋巴球上具有最高表現。BCMA參與調介漿細胞之存活以維持長期體液免疫。最近，BCMA之表現與多種癌症(例如多發性骨髓瘤、霍奇金氏及非霍奇金氏淋巴瘤、各種白血病及神經膠母細胞瘤)相關。在一些實施例中，BCMA CAR可包含信號肽、特異性結合BCMA之細胞外結合結構域、鉸鏈結構域、跨膜結構域、細胞內共刺激結構域及/或串聯細胞內信號傳導結構域。

【0848】在一些實施例中，BCMA CAR之信號肽包含CD8α信號肽。在一些實施例中，CD8α信號肽包含SEQ ID

NO:6中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:6中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，信號肽包含IgK信號肽。在一些實施例中，IgK信號肽包含SEQ ID NO:7中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:7中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，信號肽包含GMCSFR-α或CSF2RA信號肽。在一些實施例中，GMCSFR-α或CSF2RA信號肽包含SEQ ID NO:8中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:8中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0849】在一些實施例中，BCMA CAR之細胞外結合結構域特異性針對BCMA，例如人類BCMA。BCMA CAR之細胞外結合結構域可經密碼子最佳化用於在宿主細胞中表現或具有變異體序列以增加細胞外結合結構域之功能。

【0850】在一些實施例中，細胞外結合結構域包含免疫球蛋白分子之免疫原性活性部分，例如scFv。在一些實施例中，BCMA CAR之細胞外結合結構域衍生自特異性針對BCMA之抗體，包括例如貝蘭他單抗(belantamab)、埃那妥單抗(erlanatamab)、特立妥單抗(teclistamab)、LCAR-

B38M及西達基(ciltacabtagene)。在該等實施例中之任一者中，BCMA CAR之細胞外結合結構域可包含任一抗體之V_H、V_L及/或一或多個CDR或由其組成。

【0851】在一些實施例中，BCMA CAR之細胞外結合結構域包含如Carpenter等人，Clin. Cancer Res. 19(8):2048-2060 (2013)中所述之衍生自鼠類單株抗體C11D5.3之scFv。亦參見PCT申請公開案第WO2010/104949號。C11D5.3源性scFv可包含C11D5.3之藉由Whitlow連接體連結之重鏈可變區(V_H)及輕鏈可變區(V_L)，其胺基酸序列提供於下**表13**中。在一些實施例中，BCMA特異性細胞外結合結構域包含SEQ ID NO:63、64或68中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:63、64或68中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，BCMA特異性細胞外結合結構域可包含具有SEQ ID NO: 65-67及69-71中所述之胺基酸序列之一或多個CDR。在一些實施例中，BCMA特異性細胞外結合結構域可包含輕鏈，其具有一或多個具有SEQ ID NO: 65-67中所述之胺基酸序列之CDR。在一些實施例中，BCMA特異性細胞外結合結構域可包含重鏈，其具有一或多個具有SEQ ID NO: 69-71中所述之胺基酸序列之CDR。在該等實施例中之任一者中，BCMA特異性scFv可包含一或多個CDR，其包含一或多個胺基酸取代，或包含與所鑑別之任一序列至少80%一致(例

如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之序列。在一些實施例中，BCMA CAR之細胞外結合結構域包含如本文所述之一或多個CDR或由其組成。

【0852】在一些實施例中，BCMA CAR之細胞外結合結構域包含如Carpenter等人，Clin. Cancer Res. 19(8):2048-2060 (2013)及PCT申請公開案第WO2010/104949號中所述之衍生自另一鼠類單株抗體C12A3.2之scFv，其胺基酸序列亦提供於下**表13**中。在一些實施例中，BCMA特異性細胞外結合結構域包含SEQ ID NO:72、73或77中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:72、73或77中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，BCMA特異性細胞外結合結構域可包含具有SEQ ID NO: 74-76及78-80中所述之胺基酸序列之一或多個CDR。在一些實施例中，BCMA特異性細胞外結合結構域可包含輕鏈，其具有一或多個具有SEQ ID NO: 74-76中所述之胺基酸序列之CDR。在一些實施例中，BCMA特異性細胞外結合結構域可包含重鏈，其具有一或多個具有SEQ ID NO: 78-80中所述之胺基酸序列之CDR。在該等實施例中之任一者中，BCMA特異性scFv可包含一或多個CDR，其包含一或多個胺基酸取代，或包含與所鑑別之任一序列至少80%一致(例如，至少80%、至少

85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之序列。在一些實施例中，BCMA CAR之細胞外結合結構域包含如本文所述之一或多個CDR或由其組成。

【0853】在一些實施例中，BCMA CAR之細胞外結合結構域包含對人類BCMA具有高特異性之鼠類單株抗體，在Friedman等人，Hum. Gene Ther. 29(5):585-601 (2018)中稱為BB2121。亦參見PCT申請公開案第WO2012163805號。

【0854】在一些實施例中，BCMA CAR之細胞外結合結構域包含如Zhao等人，J. Hematol. Oncol. 11(1):141 (2018)中所述之可結合至BCMA之兩個抗原決定基之兩條重鏈(VHH)之單一可變片段，亦稱為LCAR-B38M。亦參見PCT申請公開案第WO2018/028647號。

【0855】在一些實施例中，BCMA CAR之細胞外結合結構域包含如Lam等人，Nat. Commun. 11(1):283 (2020)中所述之全人類重鏈可變結構域(FHVH)，亦稱為FHVH33。亦參見PCT申請公開案第WO2019/006072號。FHVH33及其CDR之胺基酸序列提供於下**表13**中。在一些實施例中，BCMA特異性細胞外結合結構域包含SEQ ID NO:81中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:81中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，BCMA

特異性細胞外結合結構域可包含具有SEQ ID NO: 82-84中所述之胺基酸序列之一或多個CDR。在該等實施例中之任一者中，BCMA特異性細胞外結合結構域可包含一或多個CDR，其包含一或多個胺基酸取代，或包含與所鑑別之任一序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之序列。在一些實施例中，BCMA CAR之細胞外結合結構域包含如本文所述之一或多個CDR或由其組成。

【0856】在一些實施例中，BCMA CAR之細胞外結合結構域包含如美國專利第11,026,975 B2號中所述之衍生自CT103A (或CAR0085)之scFv，其胺基酸序列提供於下**表13**中。在一些實施例中，BCMA特異性細胞外結合結構域包含SEQ ID NO:118、119或123中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:118、119或123中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，BCMA特異性細胞外結合結構域可包含具有SEQ ID NO: 120-122及124-126中所述之胺基酸序列之一或多個CDR。在一些實施例中，BCMA特異性細胞外結合結構域可包含輕鏈，其具有一或多個具有SEQ ID NO: 120-122中所述之胺基酸序列之CDR。在一些實施例中，BCMA特異性細胞外結合結構域可包含重鏈，其具有一或多個具有SEQ ID NO: 124-

126中所述之胺基酸序列之CDR。在該等實施例中之任一者中，BCMA特異性scFv可包含一或多個CDR，其包含一或多個胺基酸取代，或包含與所鑑別之任一序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之序列。在一些實施例中，BCMA CAR之細胞外結合結構域包含如本文所述之一或多個CDR或由其組成。

【0857】另外，針對BCMA之CAR及結合劑已闡述於美國申請公開案第2020/0246381 A1號及美國申請公開案第2020/0339699 A1號中，該等美國申請公開案中每一者之全部內容皆以引用方式併入本文中。

表 13. 抗 BCMA 結合劑及組分之例示性序列

SEQ ID NO:	胺基酸序列	描述
63	DIVLTQSPASLAMSLGKRATIS CRASESVSVIGAHLIHWYQQK PGQPPKLLIYLASNLETGVPAR FSGSGSGTDFTLTIDPVEEDDV AIYSCLQSRIFPRTFGGGTKLEI KGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQ LVQSGPELKKPGETVKISCKAS GYTFTDYSINWVKRAPGKGLK WMGWINTETREPAYAYDFRG RFAFSLETSASTAYLQINNLKY EDTATYFCALDYSYAMDYWG QGTSVTVSS	抗 BCMA C11D5.3 scFv 完整序列，具有 Whitlow 連接體
64	DIVLTQSPASLAMSLGKRATIS CRASESVSVIGAHLIHWYQQK PGQPPKLLIYLASNLETGVPAR FSGSGSGTDFTLTIDPVEEDDV AIYSCLQSRIFPRTFGGGTKLEI K	抗 BCMA C11D5.3 scFv 輕鏈可變區
65	RASESVSVIGAHLIH	抗 BCMA C11D5.3 scFv 輕鏈 CDR1
66	LASNLET	抗 BCMA C11D5.3 scFv 輕鏈 CDR2
67	LQSRIFPRT	抗 BCMA C11D5.3 scFv 輕鏈 CDR3
68	QIQLVQSGPELKKPGETVKISC KASGYTFTDYSINWVKRAPGK GLKWMGWINTETREPAYAYD FRGRFAFSLETSASTAYLQINN LKYEDTATYFCALDYSYAMD YWGQGTSVTVSS	抗 BCMA C11D5.3 scFv 重鏈可變區
69	DYSIN	抗 BCMA C11D5.3 scFv 重鏈 CDR1
70	WINTETREPAYAYDFRG	抗 BCMA C11D5.3 scFv 重鏈 CDR2
71	DYSYAMDY	抗 BCMA C11D5.3 scFv 重鏈 CDR3
72	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATIS CRASESVTILGSHLIYWYQQKP GQPPTLLIQLASNVQTGVPARF SGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVA	抗 BCMA C12A3.2 scFv 完整序列，具有 Whitlow 連接體

	VYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEI KGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQ LVQSGPELKKPGETVKISCKAS GYTFRHYSMNWVKQAPGKGL KWMGRINTESGVPIYADDFKG RFAFSVETSASTAYLVINNLKD EDTASYFCSNDYLYSLDFWGQ GTALTVSS	
73	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATIS CRASESVTILGSHLIYWYQQKP GQPPTLLIQLASNVQTGVPARF SGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVA VYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEI K	抗 BCMA C12A3.2 scFv 輕鏈可變區
74	RASESVTILGSHLIY	抗 BCMA C12A3.2 scFv 輕鏈 CDR1
75	LASNVQT	抗 BCMA C12A3.2 scFv 輕鏈 CDR2
76	LQSRTIPRT	抗 BCMA C12A3.2 scFv 輕鏈 CDR3
77	QIQLVQSGPELKKPGETVKISC KASGYTFRHYSMNWVKQAPG KGLKWMGRINTESGVPIYADD FKGRFAFSVETSASTAYLVINN LKDEDTASYFCSNDYLYSLDF WGQGTALTVSS	抗 BCMA C12A3.2 scFv 重鏈可變區
78	HYSMN	抗 BCMA C12A3.2 scFv 重鏈 CDR1
79	RINTESGVPIYADDFKG	抗 BCMA C12A3.2 scFv 重鏈 CDR2
80	DYLYSLDF	抗 BCMA C12A3.2 scFv 重鏈 CDR3
81	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGDYIYYADSV KGRFTISRDISKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKEGTGANSSL ADYRGQGTLVTVSS	抗 BCMA FHVH33 完整序列
82	GFTFSSYA	抗 BCMA FHVH33 CDR1
83	ISGSGDYI	抗 BCMA FHVH33 CDR2

84	AKEGTGANSSLADY	抗 BCMA FHVH33 CDR3
118	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQKYDLLTFGGGTKVEIKGS TSGSGKPGSGEGSTKGQLQLQ ESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYYWGWIRQPPGKGLE WIGSISYSGSTYYNPSLKSRVTI SVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARDRGDTILDVWGQG TMVTVSS	抗 BCMA CT103A scFv 完整序列，具有 Whitlow 連接體
119	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQKYDLLTFGGGTKVEIK	抗 BCMA CT103A scFv 輕鏈可變區
120	QSISSY	抗 BCMA CT103A scFv 輕鏈 CDR1
121	AAS	抗 BCMA CT103A scFv 輕鏈 CDR2
122	QQKYDLLT	抗 BCMA CT103A scFv 輕鏈 CDR3
123	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTC TVSGGSISSSSYYWGWIRQPPG KGLEWIGSISYSGSTYYNPSLK SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARDRGDTILDV WGQGTMVTVSS	抗 BCMA CT103A scFv 重鏈可變區
124	GGSISSSSYY	抗 BCMA CT103A scFv 重鏈 CDR1
125	ISYSGST	抗 BCMA CT103A scFv 重鏈 CDR2
126	ARDRGDTILDV	抗 BCMA CT103A scFv 重鏈 CDR3

【0858】在一些實施例中，BCMA CAR之鉸鏈結構域包含CD8α鉸鏈結構域，例如人類CD8α鉸鏈結構域。在一

些實施例中，CD8α鉸鏈結構域包含SEQ ID NO:9中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:9中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含CD28鉸鏈結構域，例如人類CD28鉸鏈結構域。在一些實施例中，CD28鉸鏈結構域包含SEQ ID NO:10中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:10中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含IgG4鉸鏈結構域，例如人類IgG4鉸鏈結構域。在一些實施例中，IgG4鉸鏈結構域包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含IgG4鉸鏈-Ch2-Ch3結構域，例如人類IgG4鉸鏈-Ch2-Ch3結構域。在一些實施例中，IgG4鉸鏈-Ch2-Ch3結構域包含SEQ ID NO:13中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:13中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0859】在一些實施例中，BCMA CAR之跨膜結構域包含CD8α跨膜結構域，例如人類CD8α跨膜結構域。在一些實施例中，CD8α跨膜結構域包含SEQ ID NO:14中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:14中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，跨膜結構域包含CD28跨膜結構域，例如人類CD28跨膜結構域。在一些實施例中，CD28跨膜結構域包含SEQ ID NO:15中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:15中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0860】在一些實施例中，BCMA CAR之細胞內共刺激結構域包含4-1BB共刺激結構域，例如人類4-1BB共刺激結構域。在一些實施例中，4-1BB共刺激結構域包含SEQ ID NO:16中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:16中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。在一些實施例中，細胞內共刺激結構域包含CD28共刺激結構域，例如人類CD28共刺激結構域。在一些實施例中，CD28共刺激結構域包含SEQ ID NO:17中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:17中所述之胺基酸序列至少80%

一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0861】在一些實施例中，BCMA CAR之細胞內信號傳導結構域包含CD3 zeta (ζ)信號傳導結構域，例如人類CD3ζ信號傳導結構域。在一些實施例中，CD3ζ信號傳導結構域包含SEQ ID NO:18中所述之胺基酸序列，或與SEQ ID NO:18中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)之胺基酸序列，或由其組成。

【0862】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼BCMA CAR之核苷酸序列之表現盒，該BCMA CAR包括例如包含以下之BCMA CAR：如所述之任一BCMA特異性細胞外結合結構域、SEQ ID NO:9之CD8α鉸鏈結構域、SEQ ID NO:14之CD8α跨膜結構域、SEQ ID NO:16之4-1BB共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。在該等實施例中之任一者中，BCMA CAR可另外包含如所述之信號肽(例如CD8α信號肽)。

【0863】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼BCMA CAR之核苷酸序列之表現盒，該BCMA CAR包括

例如包含以下之BCMA CAR：如所述之任一BCMA特異性細胞外結合結構域、SEQ ID NO:9之CD8α鉸鏈結構域、SEQ ID NO:14之CD8α跨膜結構域、SEQ ID NO:17之CD28共刺激結構域、SEQ ID NO:18之CD3ζ信號傳導結構域，及/或其變異體(即，具有與所揭示之序列至少80%一致、例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%一致之序列)。在該等實施例中之任一者中，BCMA CAR可另外包含如所述之信號肽。

【0864】在一些實施例中，多順反子載體包含表現盒，其含有如SEQ ID NO:127中所述之編碼BCMA CAR之核苷酸序列，或與SEQ ID NO:127中所述之核苷酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)(參見**表14**)。經編碼BCMA CAR具有SEQ ID NO:128中所述之相應胺基酸序列或與SEQ ID NO:128中所述之胺基酸序列至少80%一致(例如，至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致)，具有以下組分：CD8α信號肽、CT103A scFv (V_L-Whitlow連接體-V_H)、CD8α鉸鏈結構域、CD8α跨膜結構域、4-1BB共刺激結構域及CD3ζ信號傳導結構域。

【0865】在一些實施例中，多順反子載體包含含有編碼BCMA CAR (包括例如艾基維侖塞(ide-cel，亦稱為bb2121))之市售實施例之核苷酸序列之表現盒。在一些實

施例中，多順反子載體包含含有編碼艾基維侖塞或其部分之核苷酸序列之表現盒。艾基維侖塞包含具有以下組分之BCMA CAR：BB2121結合劑、CD8α鉸鏈結構域、CD8α跨膜結構域、4-1BB共刺激結構域及CD3ζ信號傳導結構域。

表 14. BCMA CAR 之例示性序列

SEQ ID NO:	序列	描述
127	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggcc ttgctgctccacgccgccaggccggacatccagatgac ccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacaga gtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcag ctatttaaattggtatcagcagaaaccagggaaagcccc taagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggg gtcccatcaaggttcagtggcagtggatctgggacagat ttcactctcaccatcagcagtctgcaacctgaagattttgc aacttactactgtcagcaaaaatacgacctcctcacttttg gcggagggaccaaggttgagatcaaaggcagcacca gcggctccggcaagcctggctctggcgagggcagca caaagggacagctgcagctgcaggagtcgggcccag gactggtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgca ctgtctctggtggctccatcagcagtagtagttactactg gggctggatccgccagcccccagggaaggggctgga gtggattgggagtatctcctatagtgggagcacctacta caacccgtccctcaagagtcgagtcaccatatccgtaga cacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagttctgt gaccgccgcagacacggcggtgtactactgcgccaga gatcgtggagacaccatactagacgtatggggtcaggg tacaatggtcaccgtcagctcattcgtgcccgtgttcctg cccgccaaacctaccaccaccccctgcccctagacctcc caccccagccccaacaatcgccagccagcctctgtctc tgcggcccgaagcctgtagacctgctgccggcggagc cgtgcacaccagaggcctggacttcgcctgcgacatct acatctgggcccctctggccggcacctgtggcgtgctg ctgctgagcctggtgatcaccctgtactgcaaccaccgg aacaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaa caaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaa gatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaagg aggatgtgaactgagagtgaagttcagcagatccgccg acgcccctgcctaccagcagggacagaaccagctgta caacgagctgaacctgggcagacgggaagagtacga cgtgctggacaagcggagaggccgggaccccgagat gggcggaaagcccagacggaagaacccccaggaag gcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccga ggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggag gcgcggcaagggccacgatggcctgtaccagggcct gagcaccgccaccaaggacacctacgacgccctgcac atgcaggccctgcccccaga	例示性 BCMA CAR 核苷酸序列
128	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQM TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISS	例示性 BCMA

	YLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQKYDLLTFGGGTKVEIK GSTSGSGKPGSGEGSTKGQLQLQES GPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSS YYWGWIRQPPGKGLEWIGSISYSGS TYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARDRGDTILDV WGQGTMVTVSSFVPVFLPAKPTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG TCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR	CAR 胺基酸序列

Y. 低免疫原性細胞之特徵

【0866】在一些實施例中，與對照幹細胞(*例如*野生型幹細胞或免疫原性幹細胞)相比，低免疫原性幹細胞之群體保持多能性。在一些實施例中，與對照幹細胞(*例如*野生型幹細胞或免疫原性幹細胞)相比，低免疫原性幹細胞之群體保持分化潛能。

【0867】在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞(例如低免疫原性分化細胞及CAR-T細胞)之群體在個體或患者中引發降低或較低水準之免疫活化。在一些情況下，與藉由投與免疫原性細胞產生之免疫活化之水準相比，由細胞引發之免疫活化之水準低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、

65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞之群體無法在個體或患者中引發免疫活化。

【0868】在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞(例如低免疫原性分化細胞及CAR-T細胞)之群體在個體或患者中引發降低或較低水準之T細胞反應。在一些情況下，與藉由投與免疫原性細胞產生之T細胞反應之水準相比，由細胞引發之T細胞反應之水準低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞之群體無法在個體或患者中引發針對細胞之T細胞反應。

【0869】在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞(例如低免疫原性分化細胞及CAR-T細胞)之群體在個體或患者中引發降低或較低水準之NK細胞反應。在一些情況下，與藉由投與免疫原性細胞產生之NK細胞反應之水準相比，由細胞引發之NK細胞反應之水準低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞之群體無法在個體或患者中引發針對細胞之NK細胞反應。

【0870】在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞(例如低免疫原性分化細胞及CAR-T細胞)之群體在個體或患者中引發降低或較低水準之巨噬細胞吞噬。在一些情況下，與藉由投與免疫原性細胞產生之巨噬細胞吞噬之水準相比，由細胞引發之NK細胞反應之水準低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞之群體無法在個體或患者中引發細胞之巨噬細胞吞噬。

【0871】在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞(例如低免疫原性分化細胞及CAR-T細胞)之群體在個體或患者中引發降低或較低水準之全身性TH1活化。在一些情況下，與藉由投與免疫原性細胞產生之全身性TH1活化之水準相比，由細胞引發之全身性TH1活化之水準低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞之群體無法在個體或患者中引發全身性TH1活化。

【0872】在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞(例如低免疫原性分化細胞及CAR-T細胞)之群體在個體或患者中引發降低或較低水準之NK細胞殺傷。在一些情況下，與藉由投與免疫原性細胞產生之NK細胞殺傷之水準

相比，由細胞引發之NK細胞殺傷之水準低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞之群體無法在個體或患者中引發NK細胞殺傷。

【0873】在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞(例如低免疫原性分化細胞及CAR-T細胞)之群體在個體或患者中引發降低或較低水準之外周血單核細胞(PBMC)免疫活化。在一些情況下，與藉由投與免疫原性細胞產生之PBMC免疫活化之水準相比，由細胞引發之PBMC免疫活化之水準低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞之群體無法在個體或患者中引發PBMC免疫活化。

【0874】在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞(例如低免疫原性分化細胞及CAR-T細胞)之群體在個體或患者中引發降低或較低水準之供體特異性IgG抗體。在一些情況下，與藉由投與免疫原性細胞產生之供體特異性IgG抗體之水準相比，由細胞引發之供體特異性IgG抗體之水準低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98%或99%。在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞之群體無法在個體或患者中引發供體特異性IgG抗體。

【0875】在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞(例如低免疫原性分化細胞及CAR-T細胞)之群體在個體或患者中引發降低或較低水準之供體特異性IgM抗體。在一些情況下，與藉由投與免疫原性細胞產生之供體特異性IgM抗體之水準相比，由細胞引發之供體特異性IgM抗體之水準低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞之群體無法在個體或患者中引發供體特異性IgM抗體。

【0876】在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞(例如低免疫原性分化細胞及CAR-T細胞)之群體在個體或患者中引發降低或較低水準之IgM及IgG抗體產生。在一些情況下，與藉由投與免疫原性細胞產生之IgM及IgG抗體產生之水準相比，由細胞引發之IgM及IgG抗體產生之水準低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞之群體無法在個體或患者中引發IgM及IgG抗體產生。

【0877】在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞(例如低免疫原性分化細胞及CAR-T細胞)之群體在個體或

患者中引發降低或較低水準之細胞毒性T細胞殺傷。在一些情況下，與藉由投與免疫原性細胞產生之細胞毒性T細胞殺傷之水準相比，由細胞引發之細胞毒性T細胞殺傷之水準低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞之群體無法在個體或患者中引發細胞毒性T細胞殺傷。

【0878】在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞(例如低免疫原性分化細胞及CAR-T細胞)之群體在個體或患者中引發降低或較低水準之補體依賴性細胞毒性(CDC)。在一些情況下，與藉由投與免疫原性細胞產生之CDC之水準相比，由細胞引發之CDC之水準低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，所投與低免疫原性細胞之群體無法在個體或患者中引發CDC。

Z. 來自原代T細胞之治療細胞

【0879】本文提供低免疫原性細胞，包括(但不限於)逃避免疫識別之原代T細胞。在一些實施例中，低免疫原性細胞係自T細胞(例如原代T細胞)產生(*例如*生成、培養或衍生而來)。在一些情況下，原代T細胞係自個體

(subject)或個體(individual)獲得(*例如*收穫、提取、去除或獲取)。在一些實施例中，原代T細胞係自T細胞之集合產生，使得T細胞來自一或多個個體(*例如*一或多個人類，包括一或多個健康人類)。在一些實施例中，原代T細胞之集合來自1-100個、1-50個、1-20個、1-10個、1個或多個、2個或更多個、3個或更多個、4個或更多個、5個或更多個、10個或更多個、20個或更多個、30個或更多個、40個或更多個、50個或更多個、或100個或更多個個體。在一些實施例中，供體個體不同於患者(*例如*投與治療細胞之接受者)。在一些實施例中，T細胞之集合不包括來自患者之細胞。在一些實施例中，自其獲得T細胞集合之一或多個供體個體不同於患者。

【0880】在一些實施例中，低免疫原性細胞不會活化患者(*例如*投與後之接受者)之先天及/或適應性免疫反應。提供藉由向有需要之個體(*例如*接受者)或患者投與低免疫原性細胞群體來治療病症的方法。在一些實施例中，本文所述之低免疫原性細胞包含經改造(*例如*經修飾)以表現嵌合抗原受體(包括但不限於本文所述之嵌合抗原受體)之T細胞。在一些情況下，T細胞係來自一或多個個體之原代T細胞之群體或亞群。在一些實施例中，本文所述之T細胞(例如經改造或經修飾之T細胞)包含減少的內源T細胞受體表現。

【0881】在一些實施例中，本揭示案係關於低免疫原性原代T細胞，其可調控地過表現CD47及CAR，且具有一

或多種MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現或缺乏其表現並具有TCR複合物分子之減少的表現或缺乏其表現。本文所概述之細胞可調控地過表現CD47及CAR且逃避免疫識別。在一些實施例中，原代T細胞展示MHC I類抗原/分子、MHC II類抗原/分子及/或TCR複合物分子之可調控降低的水準或活性。在某些實施例中，原代T細胞可調控地過表現CD47及CAR且在B2M基因中具有可調控基因體修飾。在一些實施例中，T細胞可調控地過表現CD47及CAR且在CIITA基因中具有可調控基因體修飾。在一些實施例中，原代T細胞可調控地過表現CD47及CAR且在TRAC基因中具有可調控基因體修飾。在一些實施例中，原代T細胞可調控地過表現CD47及CAR且在TRB基因中具有可調控基因體修飾。在一些實施例中，T細胞可調控地過表現CD47及CAR且在以下基因中之一或多者中具有可調控基因體修飾：B2M、CIITA、TRAC及TRB基因。

【0882】本揭示案之例示性T細胞選自由以下組成之群：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、記憶T細胞、中央記憶T細胞、效應記憶T細胞、效應記憶RA T細胞、調控T細胞、組織浸潤淋巴球及其組合。在某些實施例中，T細胞表現CCR7、CD27、CD28及CD45RA。在一些實施例中，中央T細胞表現CCR7、CD27、CD28及CD45RO。在其他實施例中，效應記憶T細胞表現PD-1、CD27、CD28及CD45RO。在其他實施例中，效應記憶RA T細胞表現PD-1、

CD57及CD45RA。

【0883】在一些實施例中，T細胞係經修飾(*例如*經改造)之T細胞。在一些情形下，經修飾T細胞包含使細胞表現至少一種嵌合抗原受體之修飾，該嵌合抗原受體特異性結合至在以下中之至少一者之表面上表現之所關注抗原或抗原決定基：受損細胞、發育不良細胞、受感染細胞、免疫原性細胞、發炎細胞、惡性細胞、組織變形細胞、突變體細胞及其組合。在其他情形下，經修飾T細胞包含使細胞表現至少一種蛋白質之修飾，當細胞靠近鄰近細胞、組織或器官時，該蛋白質調節鄰近細胞、組織或器官中之所關注生物效應。可用於原代T細胞之修飾詳細闡述於US2016/0348073及WO2020/018620中，該等專利之揭示內容之全文皆併入本文中。

【0884】在一些實施例中，本文所述之低免疫原性細胞包含經改造(*例如*經修飾)以表現嵌合抗原受體(包括但不限於本文所述之嵌合抗原受體)之T細胞。在一些情況下，T細胞係來自一或多個個體之原代T細胞之群體或亞群。在一些實施例中，本文所述之T細胞(例如經改造或經修飾之T細胞)包括減少的內源T細胞受體表現。在一些實施例中，本文所述之T細胞(例如經改造或經修飾之T細胞)包括減少的細胞毒性T淋巴球相關蛋白4 (CTLA-4)表現。在其他實施例中，本文所述之T細胞(例如經改造或經修飾之T細胞)包括減少的程式化細胞死亡(PD-1)表現。在某些實施例中，本文所述之T細胞(例如經改造或經修飾之T細胞)包

括減少的CTLA-4及PD-1表現。減少或消除CTLA-4、PD-1以及CTLA-4及PD-1二者之表現之方法可包括熟習此項技術者意識到之任一方法，例如(但不限於)利用稀切核酸內切酶之遺傳修飾技術及RNA沈默或RNA干擾技術。稀切核酸內切酶之非限制性實例包括任一Cas蛋白、TALEN、鋅指核酸酶、大範圍核酸酶及歸巢核酸內切酶。在一些實施例中，將編碼如本文所揭示之多肽(*例如*嵌合抗原受體、CD47或本文所揭示之另一耐受原性因子)之外源核酸插入CTLA-4及/或PD-1基因座處。

【0885】在一些實施例中，本文所述之T細胞(例如經改造或經修飾之T細胞)包括增強的PD-L1表現。

【0886】在一些實施例中，低免疫原性T細胞包括編碼CAR之多核苷酸，其中多核苷酸插入基因體基因座中。在一些實施例中，多核苷酸插入安全港或靶基因座(例如(但不限於)AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3 (亦稱為CD142)、MICA、MICB、LRP1 (亦稱為CD91)、HMGB1、ABO、RHD、FUT1或KDM5D基因座)中。在一些實施例中，多核苷酸插入B2M、CIITA、TRAC、TRB、PD-1或CTLA-4基因中。

【0887】在一些實施例中，低免疫原性T細胞包括編碼CAR之多核苷酸，該CAR使用表現載體可調控地在細胞中表現。在一些實施例中，使用病毒表現載體將CAR引入細胞中，該病毒表現載體調介CAR序列整合至細胞之基因體中。舉例而言，用於在細胞中表現CAR之表現載體包含

編碼CAR之多核苷酸序列。表現載體可為可誘導表現載體。表現載體可為病毒載體，例如(但不限於)慢病毒載體。

【0888】本文所提供之低免疫原性T細胞可用於治療適宜癌症，包括(但不限於) B細胞急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤、肝癌、胰臟癌、乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、急性骨髓性淋巴性白血病、多發性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰臟腺癌、神經膠母細胞瘤、神經母細胞瘤、肺鱗狀細胞癌、肝細胞癌及膀胱癌。

AA. 自低免疫原性多能幹細胞分化之治療細胞

【0889】本文提供逃避免疫識別之低免疫原性細胞，包括衍生自多能幹細胞之細胞。在一些實施例中，細胞不會活化患者或個體(*例如*投與後之接受者)之先天及/或適應性免疫反應。提供治療病症之方法，其包括向有需要之接受個體重複投用低免疫原性細胞之群體。

【0890】在態樣中，本文提供HIP細胞，其分化成不同之細胞類型用於隨後移植至接受個體中。分化可如此項技術中已知、通常藉由評估細胞特異性標記物之存在來分析。如熟習此項技術者將瞭解，分化的低免疫原性多能細胞衍生物可使用此項技術中已知之技術移植，此端視該等細胞之細胞類型及最終用途而定。

【0891】在一些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹

細胞分化之任一細胞經修飾以展現一或多種MHC I類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現。在其他實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以展現一或多種MHC II類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現。在某些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以展現TCR複合物之可調控減少的表現。在一些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以展現一或多種MHC I類及II類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現。在一些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以展現一或多種MHC I類及II類人類白血球抗原分子及TCR複合物之可調控減少的表現。

【0892】在一些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以展現一或多種MHC I類及/或II量人類白血球抗原分子之可調控減少的表現且展現可調控增加的CD47表現。在一些情況下，細胞藉由納入編碼一或多種耐受原性因子之一或多種轉基因來可調控地過表現CD47。在一些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以可調控地展現一或多種MHC I類及II類人類白血球抗原分子之減少的表現且展現可調控增加的CD47表現。在一些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以展現一或多種MHC I類及II類人類白血球抗原分子及TCR複合物之可調控減少的表現且展現可調控增加的CD47表現。

【0893】在一些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以展現一或多種MHC I類及/或II量人類白血球抗原分子之可調控減少的表現，展現可調控增加的CD47表現，且可調控地外源表現嵌合抗原受體。在一些情況下，細胞藉由納入編碼一或多種耐受原性因子之一或多種轉基因來可調控地過表現一或多種耐受原性因子。在一些情況下，細胞藉由納入一或多種CAR轉基因來可調控地過表現CAR。在一些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以可調控地展現一或多種MHC I類及II類人類白血球抗原分子之減少的表現，展現一或多種耐受原性因子之增加的可調控表現，且可調控地外源表現嵌合抗原受體。在一些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以可調控地展現一或多種MHC I類及II類人類白血球抗原分子及TCR複合物之減少的表現，展現一或多種耐受原性因子之可調控增加的表現，且可調控地外源表現嵌合抗原受體。

【0894】在一些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以展現一或多種MHC I類及/或II量人類白血球抗原分子之可調控減少的表現且展現可調控增加的CD47表現。在一些情況下，細胞藉由納入一或多種CD47轉基因來過表現CD47。在一些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以展現一或多種MHC I類及II類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現且展現可調控增加的CD47表現。在一些實施例

中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以展現一或多種MHC I類及II類人類白血球抗原分子及TCR複合物之可調控減少的表現且展現可調控增加的CD47表現。

【0895】在一些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以展現一或多種MHC I類及/或II量人類白血球抗原分子之可調控減少的表現，展現可調控增加的CD47表現，且外源表現嵌合抗原受體。在一些情況下，細胞藉由納入一或多種CD47轉基因來過表現CD47多肽。在一些情況下，細胞藉由納入一或多種CAR轉基因來過表現CAR多肽。在一些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以展現一或多種MHC I類及II類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現，展現可調控增加的CD47表現，且外源表現嵌合抗原受體。在一些實施例中，多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞經修飾以展現一或多種MHC I類及II類人類白血球抗原分子及TCR複合物之可調控減少的表現，展現可調控增加的CD47表現，且外源表現嵌合抗原受體。

【0896】該等多能幹細胞係低免疫原性幹細胞。該等分化細胞係低免疫原性細胞。

【0897】本文所述之任一多能幹細胞可分化成生物體及組織之任何細胞。在一些實施例中，細胞展現一或多種MHC I類及/或II量人類白血球抗原分子之可調控減少的表現及TCR複合物之可調控減少的表現。在一些情況下，與

相同細胞類型之未經修飾之細胞或野生型細胞相比，一或多種MHC I類及/或II量人類白血球抗原分子之表現可調控地減少。在一些情況下，與相同細胞類型之未經修飾之細胞或野生型細胞相比，TCR複合物之表現可調控地減少。在一些實施例中，細胞展現增加的CD47表現。在一些情況下，與相同細胞類型之未經修飾之細胞或野生型細胞相比，CD47之表現在本揭示案所涵蓋之細胞中有所增加。在一些實施例中，細胞展現外源CAR表現。本文闡述降低MHC I類及/或II量人類白血球抗原分子及TCR複合物之水準且增加CD47及CAR表現之方法。

【0898】在一些實施例中，用於本文所述方法中之細胞在投與患者(*例如*接受個體)時逃避免疫識別及反應。細胞可逃避活體外及活體內免疫細胞之殺傷。在一些實施例中，細胞逃避巨噬細胞及NK細胞之殺傷。在一些實施例中，細胞被免疫細胞或個體之免疫系統忽略。換言之，免疫系統之免疫細胞無法偵測到根據本文所述方法投與之細胞。在一些實施例中，細胞經遮掩且因此避免免疫排斥。

【0899】確定多能幹細胞及自該多能幹細胞分化之任一細胞是否逃避免疫識別之方法包括(但不限於) IFN-γ Elispot分析、微膠質細胞殺傷分析、細胞植入動物模型、細胞介素釋放分析、ELISA、使用生物發光成像或鉻釋放分析之殺傷分析或用於細胞分析之實時、定量微電子生物感測系統(xCELLigence® RTCA系統，Agilent)、混合淋巴球反應、免疫螢光分析等。

【0900】本文所概述之治療細胞可用於治療病症，例如(但不限於)癌症、遺傳病症、慢性傳染病、自體免疫病症、神經病症及諸如此類。

1. 自低免疫原性多能細胞分化之心臟細胞

【0901】本文提供自低免疫原性誘導性多能(HIP)細胞分化之心臟細胞類型用於隨後移植或植入個體(*例如*接受者)中。如熟習此項技術者將瞭解，分化方法取決於使用已知技術之期望細胞類型。例示性心臟細胞類型包括(但不限於)心肌細胞(cardiomyocyte)、結節心肌細胞、傳導心肌細胞、工作心肌細胞、心肌細胞前體細胞、心肌細胞祖細胞、心臟幹細胞、心肌細胞(cardiac muscle cell)、心房心臟幹細胞、心室心臟幹細胞、心外膜細胞、造血細胞、血管內皮細胞、心內膜內皮細胞、心臟瓣膜間質細胞、心臟起搏細胞及諸如此類。

【0902】在一些實施例中，將本文所述之心臟細胞投與接受個體來治療選自由以下組成之群之心臟病症：兒童心肌病、年齡相關之心肌病、擴張性心肌病、肥厚性心肌病、限制性心肌病、慢性缺血性心肌病、圍產期心肌病、發炎性心肌病、特發性心肌病、其他心肌病、心肌缺血性再灌注損傷、心室功能障礙、心臟衰竭、充血性心臟衰竭、冠狀動脈疾病、終末期心臟病、動脈粥樣硬化、缺血、高血壓、再狹窄、心絞痛、風濕性心臟病、動脈發炎、心血管疾病、心肌梗塞、心肌缺血、心肌梗塞、心臟

缺血、心臟損傷、心肌缺血、血管疾病、獲得性心臟病、先天性心臟病、冠狀動脈疾病、傳導系統功能障礙、冠狀動脈功能障礙、肺部高血壓、心律不整、肌肉萎縮症、肌肉質量異常、肌肉變性、心肌炎、感染性心肌炎、藥物或毒素誘發之肌肉異常、過敏性心肌炎、二尖瓣閉鎖不全、自體免疫性心內膜炎、原發性心律不整疾病、心臟通道病、長QT症候群、短QT症候群、布魯格達氏症候群、兒茶酚胺能多型性心室性心搏過速及傑維爾及朗格-尼爾森症候群(參見van den Brink等人，*Stem Cells*. 2020年2月;38(2):174-186)。

【0903】因此，本文提供治療及預防有需要之個體之心臟損傷或心臟疾病或病症的方法。本文所述之方法可用於治療、改善、預防或減緩多種心臟疾病或其症狀之進展，例如對心臟之結構及/或功能造成病理學損害之彼等疾病或其症狀。術語「心臟疾病」、「心臟病症」及「心臟損傷」在本文中可互換使用且係指與心臟(包括心臟之瓣膜、內皮、梗塞區或其他組分或結構)相關之疾患及/或病症。該等心臟疾病或心臟相關之疾病尤其包括(但不限於)心肌梗塞、心臟衰竭、心肌病、先天性心臟缺陷、心臟瓣膜疾病或功能障礙、心內膜炎、風濕熱、二尖瓣瓣膜脫垂、感染性心內膜炎、肥厚性心肌病、擴張性心肌病、心肌炎、心肥大及/或二尖瓣閉鎖不全。

【0904】在一些實施例中，心肌細胞前體包括能夠產生包括成熟(末期)心肌細胞之子代之細胞。心肌細胞前體

細胞通常可使用一或多種選自GATA-4、Nkx2.5及MEF-2轉錄因子家族之標記物來鑑別。在一些情況下，心肌細胞係指表現來自以下清單之一或多種標記物(有時至少2種、3種、4種或5種標記物)之不成熟心肌細胞或成熟心肌細胞：心臟肌鈣蛋白I (cTnl)、心臟肌鈣蛋白T (cTnT)、肌節肌凝蛋白重鏈(MHC)、GATA-4、Nkx2.5、N-鈣黏蛋白、β2-腎上腺素受體、ANF、MEF-2轉錄因子家族、肌酸激酶MB (CK-MB)、肌紅蛋白及心房利鈉因子(ANF)。在一些實施例中，心臟細胞展示自發週期性收縮活性。在一些情形下，當在具有適當Ca2+濃度及電解質平衡之適宜組織培養環境中培養心臟細胞時，可觀察到細胞以週期性方式沿細胞之一個軸收縮，且然後自收縮釋放，而不必向培養基中添加任何其他組分。在一些實施例中，心臟細胞係低免疫原性心臟細胞。

【0905】在一些實施例中，藉由活體外分化自低免疫原性多能(HIP)細胞之群體產生低免疫原性心臟細胞群體之方法包括：(a)在包含GSK抑制劑之培養基中培養低免疫原性誘導性多能幹細胞之群體；(b)在包含WNT拮抗劑之培養基中培養HIP細胞之群體以產生前心臟細胞之群體；及(c)在包含胰島素之培養基中培養前心臟細胞之群體以產生低免疫心臟細胞之群體。在一些實施例中，GSK抑制劑係CHIR-99021、其衍生物或其變異體。在一些情況下，GSK抑制劑之濃度介於約2 mM至約10 mM範圍內。在一些實施例中，WNT拮抗劑係IWR1、其衍生物或其變異體。

在一些情況下，WNT拮抗劑之濃度介於約2 mM至約10 mM範圍內。

【0906】在一些實施例中，自非心臟細胞分離低免疫原性心臟細胞之群體。在一些實施例中，在投與之前擴增經分離之低免疫原性心臟細胞之群體。在某些實施例中，在投與之前擴增且冷凍保存經分離之低免疫原性心臟細胞之群體。

【0907】其他可用於將誘導性多能幹細胞或多能幹細胞分化成心臟細胞之方法闡述於例如US2017/0152485；US2017/0058263；US2017/0002325；US2016/0362661；US2016/0068814；US9,062,289；US7,897,389；及US7,452,718中。自誘導性多能幹細胞或多能幹細胞產生心臟細胞之其他方法闡述於例如Xu等人，Stem Cells and Development, 2006, 15(5): 631-9；Burridge等人，Cell Stem Cell, 2012, 10: 16-28；及Chen等人，Stem Cell Res, 2015, 15(2):365-375中。

【0908】在多個實施例中，低免疫原性心臟細胞可在包含以下之培養基中培養：BMP路徑抑制劑、WNT信號傳導活化劑、WNT信號傳導抑制劑、WNT促效劑、WNT拮抗劑、Src抑制劑、EGFR抑制劑、PCK活化劑、細胞介素、生長因子、親心劑、化合物及諸如此類。

【0909】WNT信號傳導活化劑包括(但不限於)CHIR99021。PCK活化劑包括(但不限於) PMA。WNT信號傳導抑制劑包括(但不限於)選自以下之化合物：

KY02111、SO3031 (KY01-I)、SO2031 (KY02-I)及SO3042 (KY03-I)及XAV939。Src抑制劑包括(但不限於)A419259。EGFR抑制劑包括(但不限於)AG1478。

【0910】用於自iPSC產生心臟細胞之劑之非限制性實例包括活化素A、BMP4、Wnt3a、VEGF、可溶性捲曲蛋白、環孢素A、血管緊張素II、苯福林、抗壞血酸、二甲基亞砜、5-氮雜-2'-去氧胞苷及諸如此類。

【0911】本文所提供之細胞可在表面(例如合成表面)上培養以支持及/或促進低免疫原性多能細胞分化成心臟細胞。在一些實施例中，表面包含聚合物材料，包括(但不限於)所選一或多種丙烯酸酯單體之均聚物或共聚物。丙烯酸酯單體及甲基丙烯酸酯單體之非限制性實例包括四(乙二醇)二丙烯酸酯、甘油二甲基丙烯酸酯、1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、二(乙二醇)二甲基丙烯酸酯、四(乙二醇)二甲基丙烯酸酯、1,6-己二醇丙氧酸酯二丙烯酸酯、新戊二醇二丙烯酸酯、三羥甲基丙烷苯甲酸酯二丙烯酸酯、三羥甲基丙烷乙氧基化物(1 EO/QH)甲基酯、三環[5.2.1.02,6]癸烷二甲醇二丙烯酸酯、新戊二醇乙氧基化物二丙烯酸酯及三羥甲基丙烷三丙烯酸酯。丙烯酸酯係如此項技術中已知合成或自商業供應商(例如Polysciences, Inc.、Sigma Aldrich, Inc.及Sartomer, Inc)獲得。

【0912】聚合物材料可分散於支持材料之表面上。適於培養細胞之有用支持材料包括陶瓷物質、玻璃、塑膠、

聚合物或共聚物、其任何組合或一種材料於另一材料上之塗層。在一些情況下，玻璃包括鈉鈣玻璃、派熱司玻璃(pyrex glass)、維柯玻璃(vycor glass)、石英玻璃、硅或該等之衍生物或諸如此類。

【0913】在一些情況下，塑膠或聚合物(包括樹突聚合物)包括聚(氯乙烯)、聚(乙烯醇)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(乙酸乙烯酯-馬來酸酐)、聚(二甲基矽氧烷)單甲基丙烯酸酯、環烯烴聚合物、氟碳聚合物、聚苯乙烯、苯丙烯、聚乙亞胺或該等之衍生物或諸如此類。在一些情況下，共聚物包括聚(乙酸乙烯酯-共-馬來酸酐)、聚(苯乙烯-共-馬來酸酐)、聚(乙烯-共-丙烯酸)或該等之衍生物或諸如此類。

【0914】可在動物心臟凍傷模型中評價如本文所述製備之心臟細胞之效能，該心臟凍傷導致55%之左心室壁組織在無治療下變成瘢痕組織(Li等人，Ann. Thorac. Surg. 62:654, 1996；Sakai等人，Ann. Thorac. Surg. 8:2074, 1999；Sakai等人，Thorac. Cardiovasc. Surg. 118:715, 1999)。成功治療可減少瘢痕之面積，限制瘢痕擴展，且改良心臟功能，如藉由收縮壓、舒張壓及發展壓所確定。心臟損傷亦可使用左前降支動脈之遠端部分中之栓塞線圈來建模(Watanabe等人，Cell Transplant. 7:239, 1998)，且治療之效能可藉由組織學及心臟功能來評估。

【0915】在一些實施例中，投與包括植入個體之心臟組織中、靜脈內注射、動脈內注射、冠狀動脈內注射、肌

內注射、腹膜內注射、心肌內注射、經心內膜注射、經心外膜注射或輸注。

【0916】在一些實施例中，亦向投與經改造心臟細胞之患者投與心臟藥物。適用於組合療法之心臟藥物之說明性實例包括(但不限於)生長因子、多核苷酸編碼生長因子、抗血管生成劑、鈣通道阻斷劑、抗高血壓劑、抗有絲分裂劑、變力劑、抗動脈粥樣硬化劑、抗凝劑、β-阻斷劑、抗心律失常劑、抗發炎劑、血管擴張劑、血栓溶解劑、心臟糖苷、抗生素、抗病毒劑、抗真菌劑、抑制原生動物之劑、硝酸鹽、血管緊張素轉化酶(ACE)抑制劑、血管緊張素II受體拮抗劑、腦利鈉肽(BNP)；抗贅瘤劑、類固醇及諸如此類。

【0917】可以多種方式監測根據本文所提供方法之療法之效應。例如，可利用心電圖(ECG)或霍特(holier)監測器來確定治療之效能。ECG係心臟節律及電脈沖之量度，且係確定療法是否已改良或維持、預防或減緩個體心臟中電傳導之降格的極有效且非侵入性之方式。使用霍特監測器、即可長時間佩戴以監測心臟異常、心律不整病症及諸如此類之可攜式ECG亦係評價療法有效性之可靠方法。ECG或核研究可用於測定心室功能之改良。

2. 自低免疫原性多能細胞分化之神經細胞

【0918】本文提供自HIP細胞分化之不同神經細胞類型，其可用於隨後移植或植入接受個體中。如熟習此項技

術者將瞭解，分化方法取決於使用已知技術之期望細胞類型。例示性神經細胞類型包括(但不限於)大腦內皮細胞、神經元(*例如*多巴胺能神經元)、神經膠質細胞及諸如此類。

【0919】在一些實施例中，將本文所述之神經細胞投與接受個體來治療選自由以下組成之群之神經病症：阿茲海默氏病、亨廷頓氏病、帕金森氏病、佩梅病、其他神經變性疾病或疾患、注意力缺陷過動症(ADHD)、缺血、多發性硬化、創傷性腦損傷、癲癇、僵住症、腦炎、腦膜炎、偏頭痛、中風、短暫性缺血發作、蛛膜下出血、硬腦膜下出血、血腫、硬膜外出血、脊髓損傷、頸椎病、腕隧道症候群、腦或脊髓腫瘤、外周神經病變、格林-巴利症候群、神經痛、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)、tau蛋白病變、匹克病、進行性核上性麻痺、皮質基底核變性、嗜銀顆粒病、伯爾氏麻痺、大腦性麻痺、運動神經元疾病、神經纖維瘤病、腦炎、腦膜炎、妥瑞氏症候群、精神分裂症、精神病、抑鬱症或其他神經精神病症(如Gorman等人，*J Cell Mol Med.* 2008 Dec;12(6A):2263-2280；Kovacs等人，*Handbook of Clin Neurol.* 2018;145:355-368中所述)。

【0920】在一些實施例中，誘導性多能幹細胞之分化係藉由使細胞暴露於或接觸已知產生特定細胞譜系之特定因子、以使其分化靶向特定期望譜系及/或所關注細胞類型來實施。在一些實施例中，終末分化細胞展示特殊表型

特徵或特性。在某些實施例中，本文所述之幹細胞分化成神經外胚層群體、神經元群體、神經內分泌群體、多巴胺能群體、副交感神經群體、血清素能(5-HT)群體、麩胺酸鹽能群體、GABA能群體、腎上腺素能群體、去甲腎上腺素能群體、交感神經元群體、副交感神經元群體、交感外周神經元群體或神經膠質細胞群體。在一些情況下，神經膠質細胞群體包括小神經膠質(*例如*變形蟲樣、分枝、活化吞噬及活化非吞噬)細胞群體或大神經膠質(中樞神經系統細胞：星形細胞、寡突膠質細胞、室管膜細胞及放射狀神經膠質細胞；及外周神經系統細胞：許旺細胞(Schwann cell)及衛星細胞)細胞群體或任一前述細胞之前體及祖細胞。

【0921】用於產生不同類型之神經細胞之方案闡述於PCT申請案第WO2010144696號、美國專利第9,057,053號；美國專利第9,376,664號；及美國專利第10,233,422號中。用於分化低免疫原性多能細胞之方法之其他描述可參見例如Deuse等人，Nature Biotechnology, 2019, 37, 252-258及Han等人，Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(21), 10441-10446。用於測定神經細胞移植在神經病症或疾患之動物模型中之效應之方法闡述於以下參考文獻中：對於脊髓損傷 - Curtis等人，Cell Stem Cell, 2018, 22, 941-950；對於帕金森氏病 - Kikuchi等人，Nature, 2017, 548:592-596；對於ALS - Izrael等人，Stem Cell Research, 2018, 9(1):152及Izrael等人，IntechOpen, DOI:

10.5772/intechopen.72862；對於癲癇 - Upadhya等人，PNAS, 2019, 116(1):287-296。

3. 自低免疫原性多能細胞分化之大腦內皮細胞

【0922】在一些實施例中，將神經細胞投與個體來治療血管型失智症、阿茲海默氏病、帕金森氏病、亨廷頓氏病、多發性硬化、其他神經變性疾病或疾患、注意力缺陷過動症(ADHD)、妥瑞氏症候群(TS)、精神分裂症、精神病、抑鬱症、其他神經精神病症、HIV-1相關之神經認知病症、創傷性腦損傷(如Grammas等人，*Exp Rev Mol Med.* 2011年3月;13:e19；Wang等人，*Front Aging Neurosci.* 2018年11月16日;00376中所述)。在一些實施例中，將本文所述之神經細胞投與個體來治療或改善中風。在一些實施例中，將神經元及神經膠質細胞投與患有肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)之個體。在一些實施例中，投與大腦內皮細胞以緩和大腦出血之症狀或效應。在一些實施例中，將多巴胺能神經元投與患有帕金森氏病之患者。在一些實施例中，將去甲腎上腺素能神經元、GABA能中間神經元投與已經歷癲癇發作之患者。在一些實施例中，將運動神經元、中間神經元、許旺細胞、寡突膠質細胞及微膠質細胞投與已經歷脊髓損傷之患者。

【0923】在一些實施例中，大腦內皮細胞(EC)、其前體及祖細胞係自表面上之多能幹細胞(*例如*誘導性多能幹細胞)藉由將細胞培養於包含促進大腦EC或神經細胞產生

之一或多種因子之培養基中分化而來。在一些情況下，培養基包括以下中之一或多者：CHIR-99021、VEGF、鹼性FGF (bFGF)及Y-27632。在一些實施例中，培養基包括經設計以促進神經細胞之存活及功能性之補充物。

【0924】在一些實施例中，大腦內皮細胞(EC)、其前體及祖細胞係自表面上之多能幹細胞藉由將細胞培養於非條件化或條件化培養基中分化而來。在一些情況下，培養基包含促進或有助於分化之因子或小分子。在一些實施例中，培養基包含一或多種選自由以下組成之群之因子或小分子：VEGR、FGF、SDF-1、CHIR-99021、Y-27632、SB 431542及其任一組合。在一些實施例中，用於分化之表面包含一或多種細胞外基質蛋白。表面可包被有一或多種細胞外基質蛋白。細胞可在懸浮液中分化且然後置於凝膠基質形式(例如matrigel、明膠或纖維蛋白/凝血酶形式)中，以有助於細胞存活。在一些情形下，分化係如此項技術中已知、通常藉由評估細胞特異性標記物之存在來分析。

【0925】在一些實施例中，大腦內皮細胞表現或分泌選自由以下組成之群之因子：CD31、VE鈣黏蛋白及其組合。在某些實施例中，大腦內皮細胞表現或分泌一或多種選自由以下組成之群之因子：CD31、CD34、CD45、CD117 (c-kit)、CD146、CXCR4、VEGF、SDF-1、PDGF、GLUT-1、PECAM-1、eNOS、密連蛋白-5、緊連蛋白、ZO-1、p-糖蛋白、馮威裡氏因子、VE-鈣黏蛋白、低密度脂蛋白受體LDLR、低密度脂蛋白受體相關蛋白1 LRP1、

胰島素受體INSR、瘦素受體LEPR、基底細胞黏附分子BCAM、轉鐵蛋白受體TFRC、晚期糖化最終產物特異性受體AGER、用於視黃醇攝取之受體STRA6、大中性胺基酸轉運子小次單元1 SLC7A5、興奮性胺基酸轉運子3 SLC1A1、鈉偶合中性胺基酸轉運子5 SLC38A5、溶質載劑家族16成員1 SLC16A1、ATP依賴性易位酶ABCB1、ATP-ABCC2結合盒轉運子ABCG2、多藥物抗性相關蛋白1 ABCC1、小管多特異性有機陰離子轉運子1 ABCC2、多藥物抗性相關蛋白4 ABCC4及多藥物抗性相關蛋白5 ABCC5。

【0926】在一些實施例中，大腦EC之特徵在於一或多種選自由以下組成之群之特性：緊密連接之高表現、高電阻、低開窗、小血管周圍空間、胰島素及轉鐵蛋白受體之高流行性及高粒線體數。

【0927】在一些實施例中，使用陽性選擇策略來選擇或純化大腦EC。在一些情況下，針對內皮細胞標記物(例如但不限於CD31)來分選大腦EC。換言之，分離CD31陽性大腦EC。在一些實施例中，使用陰性選擇策略來選擇或純化大腦EC。在一些實施例中，藉由選擇表現多能性標記物(包括但不限於TRA-1-60及SSEA-1)之細胞來移除未分化或多能幹細胞。

4. 自低免疫原性多能細胞分化之多巴胺能神經元

【0928】在一些實施例中，本文所述之HIP細胞分化

成多巴胺能神經元，包括神經元幹細胞、神經元祖細胞、不成熟多巴胺能神經元及成熟多巴胺能神經元。

【0929】在一些情形下，術語「多巴胺能神經元」包括表現多巴胺合成之限速酶酪胺酸羥化酶(TH)之神經元細胞。在一些實施例中，多巴胺能神經元分泌神經傳遞質多巴胺，且具有極少或無多巴胺羥化酶表現。多巴胺能(DA)神經元可表現以下標記物中之一或多者：神經元特異性烯醇酶(NSE)、1-芳族胺基酸脫羧酶、囊泡單胺轉運子2、多巴胺轉運子、Nurr-1及多巴胺-2受體(D2受體)。在某些情形下，術語「神經幹細胞」包括已沿神經細胞路徑部分分化且表現一或多種神經標記物(包括例如巢蛋白)之多能細胞群體。神經幹細胞可分化成神經元或神經膠質細胞(*例如*星形細胞及寡突膠質細胞)。術語「神經祖細胞」包括表現FOXA2及低水準之b-微管蛋白、但不表現酪胺酸羥化酶之經培養細胞。在培養適當因子(例如本文所述之彼等因子)後，該等神經祖細胞具有分化成多種神經元亞型；具體而言多種多巴胺能神經元亞型之能力。

【0930】在一些實施例中，將衍生自HIP細胞之DA神經元投與患者(例如人類患者)來治療神經變性疾病或疾患。在一些情形下，神經變性疾病或疾患選自由帕金森氏病、亨廷頓氏病及多發性硬化組成之群。在其他實施例中，DA神經元用於治療或改善神經精神病症(例如注意力缺陷過動症(ADHD)、妥瑞氏症候群(TS)、精神分裂症、精神病及抑鬱症)之一或多個症狀。在其他實施例中，DA

神經元用於治療DA神經元受損之患者。

【0931】在一些實施例中，將分化之DA神經元靜脈內或藉由注射移植至患者中之特定位置。在一些實施例中，將DA細胞移植至腦之黑質(具體而言在緊密區域中或附近)、腹側蓋膜區(VTA)、尾狀核、殼核、伏格核、視丘下核或其任一組合中以替代變性導致帕金森氏病之DA神經元。DA細胞可作為細胞懸浮液注射至靶區域中。替代地，DA細胞可在含於該遞送裝置中時包埋於支持基質或支架中。在一些實施例中，支架係生物可降解的。在其他實施例中，支架並非生物可降解的。支架可包含天然或合成(人工)材料。

【0932】在一些實施例中，DA神經元、其前體及祖細胞係自多能幹細胞藉由將幹細胞培養於包含一或多種因子或添加劑之培養基中分化而來。可用於促進DA神經元之分化、生長、擴增、維持及/或成熟之因子及添加劑包括(但不限於) Wnt1、FGF2、FGF8、FGF8a、音猬因子(sonic hedgehog，SHH)、腦源性神經營養因子(BDNF)、轉型生長因子a (TGF-a)、TGF-b、介白素1β、神經膠質細胞株源性神經營養因子(GDNF)、GSK-3抑制劑(*例如*CHIR-99021)、TGF-b抑制劑(*例如*SB-431542)、B-27補充物、多索嗎啡(dorsomorphin)、嘌嗎啡胺(purmorphamine)、頭蛋白(noggin)、視黃酸、cAMP、抗壞血酸、神經營養因子、敲除血清替代、N-乙醯半胱胺酸、c-kit配位體、其經修飾形式、其模擬物、其類似物及其變異體。在一些實施例

中，DA神經元在活化或抑制WNT路徑、NOTCH路徑、SHH路徑、BMP路徑、FGF路徑及諸如此類之一或多種因子存在下進行分化。分化方案及其詳細描述提供於例如US9,968,637、US7,674,620、Kim等人，Nature, 2002, 418,50-56；Bjorklund等人，PNAS, 2002, 99(4), 2344-2349；Grow等人，Stem Cells Transl Med. 2016, 5(9): 1133-44及Cho等人，PNAS, 2008, 105:3392-3397中，該等揭示內容之全文(包括實例、方法、圖及結果之詳細描述)皆以引用方式併入本文中。

【0933】在一些實施例中，自非神經元細胞分離低免疫原性多巴胺能神經元之群體。在一些實施例中，在投與之前擴增經分離之低免疫原性多巴胺能神經元之群體。在某些實施例中，在投與之前擴增且冷凍保存經分離之低免疫原性多巴胺能神經元之群體。

【0934】為表徵及監測DA分化並評價DA表型，可評估任一數量之分子及遺傳標記物之表現。舉例而言，可藉由熟習此項技術者已知之多種方法來確定遺傳標記物之存在。可藉由諸如(但不限於)以下之量化方法來確定分子標記物之表現：基於qPCR之分析、免疫分析、免疫細胞化學分析、免疫印跡分析及諸如此類。DA神經元之例示性標記物包括(但不限於) TH、b-微管蛋白、配對盒蛋白(Pax6)、胰島素基因增強子蛋白(Isl1)、巢蛋白、二胺基聯苯胺(DAB)、G蛋白活化內向整流鉀通道2 (GIRK2)、微管相關蛋白2 (MAP-2)、NURR1、多巴胺轉運子(DAT)、叉頭

盒蛋白A2 (FOXA2)、FOX3、雙皮質素及LIM同源匣轉錄因子1-β(LMX1B)及諸如此類。在一些實施例中，DA神經元表現一或多種選自以下之標記物：corin、FOXA2、TuJ1、NURR1及其任一組合。

【0935】在一些實施例中，根據細胞電生理學活性來評價DA神經元。細胞之電生理學可藉由使用熟習此項技術者已知之分析來評估。例如，全細胞及多孔膜片鉗、偵測細胞電生理學活性之分析、量測細胞動作電位之量級及持續時間之分析及偵測DA細胞之多巴胺產生之功能分析。

【0936】在一些實施例中，DA神經元分化之特徵在於自發節律動作電位及在注射去極化電流時具有尖峰頻率適應性之高頻動作電位。在其他實施例中，DA分化之特徵在於產生多巴胺。所產生多巴胺之水準係藉由量測動作電位在其已達到其最大幅度一半時之寬度(尖峰半最大寬度)來計算。

【0937】在一些實施例中，將分化之DA神經元靜脈內或藉由注射移植至患者中之特定位置。在一些實施例中，將分化之DA細胞移植至腦之黑質(具體而言在緊密區域中或附近)、腹側蓋膜區(VTA)、尾狀核、殼核、伏格核、視丘下核或其任一組合中以替代變性導致帕金森氏病之DA神經元。分化之DA細胞可作為細胞懸浮液注射至靶區域中。替代地，分化之DA細胞可在含於該遞送裝置中時包埋於支持基質或支架中。在一些實施例中，支架係生

物可降解的。在其他實施例中，支架並非生物可降解的。支架可包含天然或合成(人工)材料。

【0938】DA神經元之遞送可藉由使用適宜媒劑(例如但不限於脂質體、微粒或微膠囊)來達成。在其他實施例中，分化之DA神經元係在包含等滲賦形劑之醫藥組合物中投與。醫藥組合物係在對人類投與足夠無菌之條件下製備。在一些實施例中，自HIP細胞分化之DA神經元係以醫藥組合物之形式供應。細胞組合物之治療調配物之一般原則參見Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, G. Morstyn及W. Sheridan編輯，Cambridge University Press, 1996，及Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. Ball, J. Lister及P. Law, Churchill Livingstone, 2000，該等揭示內容以引用方式併入本文中。

【0939】衍生自幹細胞之神經元及製造其之方法之有用描述可參見例如Kirkeby等人，Cell Rep, 2012, 1:703-714；Kriks等人，Nature, 2011, 480:547-551；Wang等人，Stem Cell Reports, 2018, 11(1):171-182；Lorenz Studer,「Chapter 8 - Strategies for Bringing Stem Cell-Derived Dopamine Neurons to the clinic-The NYSTEM Trial」，Progress in Brain Research, 2017，第230卷，第191-212頁；Liu等人，Nat Protoc, 2013, 8:1670-1679；Upadhya等人，Curr Protoc Stem Cell Biol, 38, 2D.7.1-2D.7.47；美國公開申請案第20160115448號及US8,252,586；US8,273,570；

US9,487,752及US10,093,897，該等內容之全文皆以引用方式併入本文中。

【0940】除DA神經元外，其他神經元細胞、其前體及祖細胞可自本文所概述之HIP細胞藉由將細胞培養於包含一或多種因子或添加劑之培養基中分化而來。因子及添加劑之非限制性實例包括GDNF、BDNF、GM-CSF、B27、鹼性FGF、鹼性EGF、NGF、CNTF、SMAD抑制劑、Wnt拮抗劑、SHH信號傳導活化劑及其任一組合。在一些實施例中，SMAD抑制劑選自由以下組成之群：SB431542、LDN-193189、頭蛋白PD169316、SB203580、LY364947、A77-01、A-83-01、BMP4、GW788388、GW6604、SB-505124、樂德木單抗(lerdelimumab)、美替木單抗(metelimumab)、GC-I008、AP-12009、AP-110I4、LY550410、LY580276、LY364947、LY2109761、SB-505124、E-616452 (RepSox ALK抑制劑)、SD-208、SMI6、NPC-30345、K 26894、SB-203580、SD-093、活化素-M108A、P144、可溶性TBR2-Fc、DMH-1、二鹽酸多索嗎啡及其衍生物。在一些實施例中，Wnt拮抗劑選自由以下組成之群：XAV939、DKK1、DKK-2、DKK-3、DKK-4、SFRP-1、SFRP-2、SFRP-3、SFRP-4、SFRP-5、WIF-1、Soggy、IWP-2、IWR1、ICG-001、KY0211、Wnt-059、LGK974、IWP-L6及其衍生物。在一些實施例中，SHH信號傳導活化劑選自由以下組成之群：滑蛋白促效劑(SAG)、SAG類似物、SHH、C25-SHH、C24-SHH、嘌嗎啡

胺、Hg-Ag及/或其衍生物。

【0941】在一些實施例中，神經元表現一或多種選自由以下組成之群之標記物：麩胺酸鹽離子型受體NMDA型次單元1 GRIN1、麩胺酸鹽脫羧酶1 GAD1、γ-胺基丁酸GABA、酪胺酸羥化酶TH、LIM同源匣轉錄因子1-α LMX1A、叉頭盒蛋白O1 FOXO1、叉頭盒蛋白A2 FOXA2、叉頭盒蛋白O4 FOXO4、FOXG1、2',3'-環狀-核苷酸3'-磷酸二酯酶CNP、髓鞘鹼性蛋白MBP、微管蛋白β鏈3 TUB3、微管蛋白β鏈3 NEUN、溶質載劑家族1成員6 SLC1A6、SST、PV、鈣結合蛋白、RAX、LHX6、LHX8、DLX1、DLX2、DLX5、DLX6、SOX6、MAFB、NPAS1、ASCL1、SIX6、OLIG2、NKX2.1、NKX2.2、NKX6.2、VGLUT1、MAP2、CTIP2、SATB2、TBR1、DLX2、ASCL1、ChAT、NGFI-B、c-fos、CRF、RAX、POMC、下視丘泌素、NADPH、NGF、Ach、VAChT、PAX6、EMX2p75、CORIN、TUJ1、NURR1及/或其任一組合。

5. 自低免疫原性多能細胞分化之神經膠質細胞

【0942】在一些實施例中，所述神經細胞包括諸如(但不限於)以下之神經膠質細胞：微膠質細胞、星形細胞、寡突膠質細胞、室管膜細胞及許旺細胞，神經膠質前體及其神經膠質祖細胞係藉由將多能幹細胞分化成治療有效之神經膠質細胞及諸如此類來產生。低免疫原性多能幹細胞之分化產生低免疫原性神經細胞，例如低免疫原性神

經膠質細胞。

【0943】在一些實施例中，神經膠質細胞、其前體及祖細胞係藉由將多能幹細胞培養於包含一或多種選自由以下組成之群之劑的培養基中來生成：視黃酸、IL-34、M-CSF、FLT3配位體、GM-CSF、CCL2、TGFβ抑制劑、BMP信號傳導抑制劑、SHH信號傳導活化劑、FGF、血小板源性生長因子PDGF、PDGFR-α、HGF、IGF1、頭蛋白、SHH、多索嗎啡、頭蛋白及其任一組合。在某些情況下，BMP信號傳導抑制劑係LDN193189、SB431542或其組合。在一些實施例中，神經膠質細胞表現NKX2.2、PAX6、SOX10、腦源性神經營養因子BDNF、神經營養因子-3 NT-3、NT-4、EGF、睫狀神經營養因子CNTF、神經生長因子NGF、FGF8、EGFR、OLIG1、OLIG2、髓鞘鹼性蛋白MBP、GAP-43、LNGFR、巢蛋白、GFAP、CD11b、CD11c、CX3CR1、P2RY12、IBA-1、TMEM119、CD45及其任一組合。例示性分化培養基可包括可促進或使得能夠生成如熟習此項技術者所意識到之神經膠質細胞類型之任何特定因子及/或小分子。

【0944】為確定根據活體外分化方案生成之細胞是否展示神經膠質細胞特徵及特性，可將細胞移植至動物模型中。在一些實施例中，將神經膠質細胞注射至免疫受損小鼠(例如免疫受損之發抖小鼠)中。將神經膠質細胞投與小鼠之腦且在預選量之時間後，評估植入細胞。在一些情況下，藉由使用免疫染色及成像方法使腦中之植入細胞可視

化。在一些實施例中，確定神經膠質細胞表現已知神經膠質細胞生物標記物。

【0945】可用於自幹細胞生成神經膠質細胞、其前體及祖細胞之方法參見例如US7,579,188；US7,595,194；US8,263,402；US8,206,699；US8,252,586；US9,193,951；US9,862,925；US8,227,247；US9,709,553；US2018/0187148；US2017/0198255；US2017/0183627；US2017/0182097；US2017/253856；US2018/0236004；WO2017/172976；及WO2018/093681。用於分化多能幹細胞之方法闡述於例如Kikuchi等人，Nature, 2017, 548, 592-596；Kriks等人，Nature, 2011, 547-551；Doi等人，Stem Cell Reports, 2014, 2, 337-50；Perrier等人，Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101, 12543-12548；Chambers等人，Nat Biotechnol, 2009, 27, 275-280；及Kirkeby等人，Cell Reports, 2012, 1, 703-714中。

【0946】可在例如急性損傷脊髓之大鼠模型中評價經移植用於脊髓損傷之神經細胞之效能，如McDonald等人，Nat. Med., 1999, 5:1410及Kim等人，Nature, 2002, 418:50所述。例如，成功移植物可顯示移植物源性細胞在2-5週後存在於病灶中，分化成星形細胞、寡突膠質細胞及/或神經元，並沿脊髓自患病端遷移，及步態、協調性及負重之改良。具體動物模型係基於神經細胞類型及欲治療之神經疾病或疾患來選擇。

【0947】在一些實施例中，將自低免疫原性細胞分化

之神經膠質細胞投與有需要之個體，其中個體患有疾病或疾患，包括(但不限於)嗜銀顆粒病(AGD)、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)、皮質基底核變性(CBD)、與染色體17相關之帕金森氏症(FTDP-17)、多系統萎縮症(MSA)、帕金森氏病/瀰漫性路易體病(PD/DLBD)或阿茲海默氏病(參見Miller等人，*Neuron Glia Biol.* 2004年2月; 1(1): 13-21)。

【0948】神經細胞可以允許其植入預期組織位點且復原或再生功能缺陷區域之方式來投與。例如，可根據所治療之疾病將神經細胞直接移植至中樞神經系統之實質或鞘內位點中。在一些實施例中，本文所述之任一神經細胞(包括大腦內皮細胞、神經元、多巴胺能神經元、室管膜細胞、星形細胞、小神經膠質細胞、寡突膠質細胞及許旺細胞)係藉助靜脈內、脊柱內、腦室內、鞘內、動脈內、肌內、腹膜內、皮下、肌內、腹內、眼內、眼球後及其組合注射至患者中。在一些實施例中，細胞係以濃注注射或連續輸注之形式注射或沈積。在某些實施例中，神經細胞係藉由注射至腦中、與腦並置及其組合來投與。注射可例如經由在個體顱骨中製造之鑽孔來進行。適於將神經細胞投與腦之位點包括(但不限於)腦之腦室、側腦室、大池、殼核、基底核、海馬皮質、紋狀體、尾狀核區域及其組合。

【0949】用於本揭示案中之神經細胞(包括多巴胺能神經元)之其他描述參見WO2020/018615，該揭示內容之

全文皆以引用方式併入本文中。

6. 自低免疫原性多能細胞分化之內皮細胞

【0950】本文提供低免疫原性多能細胞，其分化成多種內皮細胞類型用於隨後移植或植入個體(*例如*接受者)中。如熟習此項技術者將瞭解，分化方法取決於使用已知技術之期望細胞類型。

【0951】在一些實施例中，將自個體低免疫原性多能細胞分化之內皮細胞投與患者，例如有需要之人類患者。可將內皮細胞投與患有諸如(但不限於)以下之疾病或疾患之患者：動脈粥樣硬化、動脈粥樣化形成、動脈血栓形成、靜脈血栓形成、血小板性微血管病、血管滲漏、瀰漫性血管內凝血、糖尿病、胰島素抗性(如Rajendra等人，*Int J Biol Sci.* 2013年11月9日;9(10):1057-1069中所述)、心血管疾病、血管疾病、外周血管疾病、缺血性疾病、心肌梗塞、充血性心臟衰竭、外周血管阻塞性疾病、中風、再灌注損傷、肢體缺血、神經病變(*例如*外周神經病變或糖尿病性神經病變)、器官衰竭(*例如*肝衰竭、腎衰竭及諸如此類)、糖尿病、類風濕性關節炎、骨質疏鬆症、血管損傷、組織損傷、高血壓、因冠狀動脈疾病所致之心絞痛及心肌梗塞、腎血管性高血壓、因腎動脈狹窄所致之腎衰竭、下肢跛行及諸如此類。在某些實施例中，患者已患有或正患有短暫性缺血發作或中風，其在一些情形下可歸因於腦血管疾病。在一些實施例中，投與經改造內皮細胞來

治療例如如動脈粥樣硬化、心肌梗塞及肢體缺血中出現之組織缺血並修復受損血管。在一些情況下，細胞用於移植物之生物改造。

【0952】例如，內皮細胞可用於缺血性組織修復、血管及心臟瓣膜形成、人工血管改造、受損血管修復及誘導經改造組織中之血管形成(*例如*在移植之前)的細胞療法中。另外，內皮細胞可進一步經修飾以將劑遞送至靶及治療腫瘤。

【0953】在某些實施例中，本文提供修復或替代需要血管細胞或血管形成之組織之方法。該方法涉及向需要該治療之人類患者投與含有經分離內皮細胞之組合物來促進該組織中之血管形成。需要血管細胞或血管形成之組織可尤其為心臟組織、肝組織、胰臟組織、腎組織、肌肉組織、神經組織、骨組織，其可為受損的且特徵在於過量細胞死亡之組織、具有受損風險之組織或人工改造之組織。

【0954】在一些實施例中，可與心臟疾病或病症相關之血管疾病可藉由投與內皮細胞(例如但不限於如本文所述衍生而來之確定性血管內皮細胞及心內膜內皮細胞)來治療。該等血管疾病包括(但不限於)冠狀動脈疾病、腦血管疾病、主動脈狹窄、主動脈瘤、外周動脈疾病、動脈粥樣硬化、靜脈曲張、血管病、缺乏冠狀動脈灌注之心臟梗塞區域、傷口不愈合、糖尿病性或非糖尿病性潰瘍或其中需要誘導血管形成之任何其他疾病或病症。

【0955】在許多實施例中，內皮細胞用於改良用於血

管重建手術之假體植入物(*例如*由諸如Dacron及Gortex之合成材料製得之血管)。舉例而言，假體動脈移植物通常用於替代灌注重要器官或肢體之患病動脈。在其他實施例中，使用經改造內皮細胞來覆蓋假體心臟瓣膜之表面以藉由使瓣膜表面較少形成血栓來降低形成栓塞之風險。

【0956】所概述之內皮細胞可使用將組織及/或經分離細胞移植至血管中之熟知手術技術移植至患者中。在一些實施例中，藉由注射(*例如*心肌內注射、冠狀動脈內注射、經心內膜注射、經心外膜注射、經皮注射)、輸注、移植及植入將細胞引入患者之心臟組織中。

【0957】內皮細胞之投與(遞送)包括(但不限於)皮下或非經腸，包括靜脈內、動脈內(*例如*冠狀動脈內)、肌內、腹膜內、心肌內、經心內膜、經心外膜、鼻內投與以及鞘內及輸注技術。

【0958】如熟習此項技術者將瞭解，HIP衍生物係使用此項技術中已知之技術來移植，此端視該等細胞之細胞類型及最終用途而定。在一些實施例中，將細胞靜脈內或藉由注射移植至患者中之特定位置。當移植至特定位置時，可將細胞懸浮於凝膠基質中以防止其在生根時分散。

【0959】例示性內皮細胞類型包括(但不限於)毛細管內皮細胞、血管內皮細胞、主動脈內皮細胞、動脈內皮細胞、靜脈內皮細胞、腎內皮細胞、腦內皮細胞、肝內皮細胞及諸如此類。

【0960】本文所概述之內皮細胞可表現一或多種內皮

細胞標記物。該等標記物之非限制性實例包括VE-鈣黏蛋白(CD 144)、ACE(血管緊張素轉化酶)(CD 143)、BNH9/BNF13、CD31、CD34、CD54(ICAM-1)、CD62E(E-選擇素)、CD105(內皮素)、CD146、內多聚糖(ESM-1)、Endoglyx-1、內皮黏蛋白、伊紅趨素-3、EPAS1(內皮PAS結構域蛋白1)、VIII因子相關抗原、FLI-1、Flk-1(KDR、VEGFR-2)、FLT-1(VEGFR-1)、GATA2、GBP-1(鳥苷酸結合蛋白-1)、GRO-α、HEX、ICAM-2(細胞間黏附分子2)、LM02、LYVE-1、MRB(魔法迴旋)、核仁素、PAL-E(病理解剖萊頓-內皮(pathologische anatomie Leiden-endothelium))、RTK、sVCAM-1、TALI、TEM1(腫瘤內皮標記物1)、TEM5(腫瘤內皮標記物5)、TEM7(腫瘤內皮標記物7)、凝血酶調節素(TM、CD141)、VCAM-1(血管細胞黏附分子-1)(CD106)、VEGF、vWF(馮威裡氏因子)、ZO-1、內皮細胞選擇性黏附分子(ESAM)、CD102、CD93、CD184、CD304及DLL4。

【0961】在一些實施例中，內皮細胞經遺傳修飾以表現編碼所關注蛋白質之外源多核苷酸，該所關注蛋白質係例如(但不限於)可用於治療病症/疾患或改善病症/疾患之症狀的酶、激素、受體、配位體或藥物。用於遺傳修飾內皮細胞之標準方法闡述於例如US5,674,722中。

【0962】該等內皮細胞可用於提供多肽或蛋白質之組成型合成及遞送，該等多肽或蛋白質可用於預防或治療疾病。以此方式，多肽直接分泌至個體身體之血流或其他區

域(*例如*中樞神經系統)中。在一些實施例中，內皮細胞可經修飾以分泌胰島素、凝血因子(*例如*VIII因子或馮威裡氏因子)、α-1抗胰蛋白酶、腺苷去胺酶、組織纖維蛋白溶酶原活化劑、介白素(*例如*IL-1、IL-2、IL-3)及諸如此類。

【0963】在一些實施例中，內皮細胞可以改良其在植入移植物背景下之效能之方式修飾。非限制性說明性實例包括分泌或表現血栓溶解劑以防止管腔內凝塊形成、分泌平滑肌增殖之抑制劑以防止因平滑肌肥大所致之管腔狹窄、及表現及/或分泌內皮細胞促分裂原或自分泌因子以刺激內皮細胞增殖並改良移植物管腔之內皮細胞襯裡之程度或持續時間。

【0964】在一些實施例中，經改造內皮細胞用於將治療水準之分泌產物遞送至特定器官或肢體。舉例而言，可將襯有活體外改造(轉導)之內皮細胞之血管植入物移植至特定器官或肢體中。經轉導內皮細胞之分泌產物將以高濃度遞送至灌注組織，由此對靶向解剖位置達成期望效應。

【0965】在其他實施例中，內皮細胞經遺傳修飾以含有在血管形成腫瘤中由內皮細胞表現時破壞或抑制血管生成之基因。在一些情形下，內皮細胞亦可經遺傳修飾以表現本文所述可選擇自殺基因中之任一者，此允許在完成腫瘤治療後對所移植內皮細胞進行陰性選擇。

【0966】在一些實施例中，將本文所述之內皮細胞投與接受個體來治療選自由以下組成之群之血管病症：血管損傷、心血管疾病、血管疾病、外周血管疾病、缺血性疾

病、心肌梗塞、充血性心臟衰竭、外周血管阻塞性疾病、高血壓、缺血性組織損傷、再灌注損傷、肢體缺血、中風、神經病變(*例如*外周神經病變或糖尿病性神經病變)、器官衰竭(*例如*肝衰竭、腎衰竭及諸如此類)、糖尿病、類風濕性關節炎、骨質疏鬆症、腦血管疾病、高血壓、因冠狀動脈疾病所致之心絞痛及心肌梗塞、腎血管性高血壓、因腎動脈狹窄所致之腎衰竭、下肢跛行及/或其他血管疾患或疾病。

【0967】在一些實施例中，低免疫原性多能細胞分化成內皮群落形成細胞(ECFC)以形成新血管來解決外周動脈疾病。分化內皮細胞之技術為業內已知。參見例如Prasain等人，doi: 10.1038/nbt.3048，其全文且具體而言自人類多能幹細胞生成內皮細胞之方法及試劑亦及移植技術皆以引用方式併入本文中。分化可如此項技術中已知、通常藉由評估內皮細胞相關或特異性標記物之存在或藉由功能量測來分析。

【0968】在一些實施例中，藉由活體外分化自低免疫原性多能細胞之群體產生低免疫原性內皮細胞群體之方法包括：(a)在包含GSK抑制劑之第一培養基中培養HIP細胞之群體；(b)在包含VEGF及bFGF之第二培養基中培養HIP細胞之群體以產生前內皮細胞之群體；及(c)在包含ROCK抑制劑及ALK抑制劑之第三培養基中培養前內皮細胞之群體以產生低免疫原性內皮細胞之群體。

【0969】在一些實施例中，GSK抑制劑係CHIR-

99021、其衍生物或其變異體。在一些情況下，GSK抑制劑之濃度介於約1 mM至約10 mM範圍內。在一些實施例中，ROCK抑制劑係Y-27632、其衍生物或其變異體。在一些情況下，ROCK抑制劑之濃度介於約1 pM至約20 pM範圍內。在一些實施例中，ALK抑制劑係SB-431542、其衍生物或其變異體。在一些情況下，ALK抑制劑之濃度介於約0.5 pM至約10 pM範圍內。

【0970】在一些實施例中，第一培養基包含2 pM至約10 pM之CHIR-99021。在一些實施例中，第二培養基包含50 ng/ml VEGF及10 ng/ml bFGF。在其他實施例中，第二培養基進一步包含Y-27632及SB-431542。在多個實施例中，第三培養基包含10 pM Y-27632及1 pM SB-431542。在某些實施例中，第三培養基進一步包含VEGF及bFGF。在特定情況下，第一培養基及/或第二培養基不含胰島素。

【0971】本文所提供之細胞可在表面(例如合成表面)上培養以支持及/或促進低免疫原性多能細胞分化成心臟細胞。在一些實施例中，表面包含聚合物材料，包括(但不限於)所選一或多種丙烯酸酯單體之均聚物或共聚物。丙烯酸酯單體及甲基丙烯酸酯單體之非限制性實例包括四(乙二醇)二丙烯酸酯、甘油二甲基丙烯酸酯、1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、二(乙二醇)二甲基丙烯酸酯、四(乙二醇)二甲基丙烯酸酯、1,6-己二醇丙氧酸酯二丙烯酸酯、新戊二醇二丙烯酸酯、三羥甲基丙烷苯甲酸酯二丙烯酸酯、三羥甲基丙烷乙氧基化物(1

EO/QH)甲基酯、三環[5.2.1.02,6]癸烷二甲醇二丙烯酸酯、新戊二醇乙氧基化物二丙烯酸酯及三羥甲基丙烷三丙烯酸酯。丙烯酸酯係如此項技術中已知合成或自商業供應商(例如Polysciences, Inc.、Sigma Aldrich, Inc.及Sartomer, Inc)獲得。

【0972】在一些實施例中，內皮細胞可接種至聚合物基質上。在一些情形下，聚合物基質係生物可降解的。適宜生物可降解基質為此項技術中所熟知且包括膠原-GAG、膠原、纖維蛋白、PLA、PGA及PLA/PGA共聚物。其他生物可降解材料包括聚(酸酐)、聚(羥酸)、聚(原酸酯)、聚(富馬酸丙酯)、聚(己內酯)、聚醯胺、聚胺基酸、聚縮醛、生物可降解聚氰基丙烯酸酯、生物可降解聚胺基甲酸酯及多糖。

【0973】亦可使用非生物可降解聚合物。其他非生物可降解但生物相容性聚合物包括聚吡咯、聚苯胺、聚噻吩、聚苯乙烯、聚酯、非生物可降解聚胺基甲酸酯、聚脲、聚(乙烯乙酸乙烯酯)、苯丙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯、聚碳酸酯及聚(氧化乙烯)。聚合物基質可以任一形狀形成，例如以粒子、海綿、管、球、線、捲曲線、毛細管網路、膜、纖維、網或片。聚合物基質可經修飾以包括天然或合成細胞外基質材料及因子。

【0974】聚合物材料可分散於支持材料之表面上。適於培養細胞之有用支持材料包括陶瓷物質、玻璃、塑膠、聚合物或共聚物、其任何組合或一種材料於另一材料上之

塗層。在一些情況下，玻璃包括鈉鈣玻璃、派熱司玻璃、維柯玻璃、石英玻璃、硅或該等之衍生物或諸如此類。

【0975】在一些情況下，塑膠或聚合物(包括樹突聚合物)包括聚(氯乙烯)、聚(乙烯醇)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(乙酸乙烯酯-馬來酸酐)、聚(二甲基矽氧烷)單甲基丙烯酸酯、環烯烴聚合物、氟碳聚合物、聚苯乙烯、苯丙烯、聚乙亞胺或該等之衍生物或諸如此類。在一些情況下，共聚物包括聚(乙酸乙烯酯-共-馬來酸酐)、聚(苯乙烯-共-馬來酸酐)、聚(乙烯-共-丙烯酸)或該等之衍生物或諸如此類。

【0976】在一些實施例中，自非內皮細胞分離低免疫原性內皮細胞之群體。在一些實施例中，在投與之前擴增經分離低免疫原性內皮細胞之群體。在某些實施例中，在投與之前擴增且冷凍保存經分離低免疫原性內皮細胞之群體。

【0977】用於本文所提供方法中之內皮細胞之其他描述參見WO2020/018615，該揭示案之全文皆以引用方式併入本文中。

7. 自低免疫原性多能細胞分化之甲狀腺細胞

【0978】在一些實施例中，低免疫原性多能細胞分化成可分泌甲狀腺激素以解決自體免疫性甲狀腺炎之甲狀腺祖細胞及甲狀腺濾泡性類器官。分化甲狀腺細胞之技術為此項技術中已知。參見例如Kurmann等人，Cell Stem Cell,

2015年11月5日;17(5):527-42，其全文且具體而言自人類多能幹細胞生成甲狀腺細胞之方法及試劑亦及移植技術皆以引用方式併入本文中。分化可如此項技術中已知、通常藉由評估甲狀腺細胞相關或特異性標記物之存在或藉由在功能上量測來分析。

【0979】在一些實施例中，將自個體低免疫原性多能細胞分化之甲狀腺細胞投與患者，例如患有諸如(但不限於)以下之疾病或疾患之人類患者：甲狀腺腫、副甲狀腺高能症、副甲狀腺低能症(先天性或自體免疫性)、甲狀腺炎、橋本氏甲狀腺炎、產後甲狀腺炎、亞急性甲狀腺炎、醫源性甲狀腺低能症、格雷氏病及甲狀腺眼病(參見Lassen等人，*Ann Endocrinol (Paris).* 2019年9月;80(4):240-249；Bilezikian等人，*Lancet.* 2018年1月13日;391(10116):168-178；Weetman, *J Endocrinol Invest.* 2021年5月;44(5):883-890；Weiler, *Clin Exp Optom.* 2017年1月;100(1):20-25)。

8. 自低免疫原性多能細胞分化之肝細胞

【0980】在一些實施例中，低免疫原性誘導性多能幹(HIP)細胞分化成肝細胞以解決肝臟之肝細胞功能損失或肝硬化。業內存在可用於將HIP細胞分化成肝細胞之多種技術；參見例如Pettinato等人，doi: 10.1038/spre32888；Snykers等人，Methods Mol Biol, 2011 698:305-314；Si-Tayeb等人，Hepatology, 2010, 51:297-305；及Asgari等人，Stem Cell Rev, 2013, 9(4):493- 504，所有該等文獻之

全文且具體而言用於分化之方法及試劑皆以引用方式併入本文中。分化可如此項技術中已知、通常藉由評估肝細胞相關及/或特異性標記物(包括但不限於白蛋白、甲胎蛋白及纖維蛋白原)之存在來分析。分化亦可在功能上量測，例如氨之代謝、LDL儲存及攝取、ICG攝取及釋放以及肝糖儲存。

【0981】在一些實施例中，將自個體低免疫原性多能細胞分化之肝細胞投與患者，例如患有諸如(但不限於)以下之疾病或疾患之人類患者：傳染性肝炎(A型、B型及C型；Bianco等人，*Dig Liver Dis.* 2004年12月;36(12):834-842)、自體免疫肝炎(Sirbe等人，*Int J Mol Sci.* 2021年12月;22(24):13578)、原發性膽汁性膽管炎、原發性硬化性膽管炎(二者闡述於Park等人，*Biomedicines.* 2022年6月;10(6):1288中)、非酒精性脂肪肝病(Francque等人，*JHEP Rep.* 2021年10月;3(5):100322)、肝硬化 (Yoshiji等人，*J Gastroenterol.* 2021;56(7):593-619)、血色素沈著症(Brissot等人，*Nat Rev Dis Primers.* 2018年4月5日;4:18016)、高草酸鹽尿症(Hoppe及Martin-Higueras, *Drugs.* 2022;82(10):1077-1094)、α-1抗胰蛋白酶缺乏症(Chapman等人，*Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018;13:419-432)、肝衰竭(Zaccherini等人，*JHEP Rep.* 2021年2月:3(1):100176)、威爾森氏病(Yuan等人，*Curr Neuropharmacol.* 2021年4月;19(4):465-485)、肝性腦病(Goh等人，*Cochrane Database Syst Rev.* 2018年5

月;2018(5):CD012410)、黃疸(Chee等人，*Hong Kong Med J.* 2018年6月;24(3):285-292)、急性肝性卟啉症(Wang等人，*Hepatol. Commun.* 2018年12月20日;3(2):193-206)、阿拉吉歐症候群(Kohut等人，*Semin Liver Dis.* 2021年11月;41(4):525-537)、膽道閉鎖 (Lakshminarayann及Davenport, *J Autoimmun.* 2016年9月;73:1-9)、佈-加二氏症候群(Iliescu等人，*Med Ultrason.* 2019年8月31日;21(3):344-348)、高膽紅素血症、克-納二氏症候群、吉-梅二氏症候群、杜-強二氏症候群、羅托症候群(皆闡述於Strassburg, *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010年10月;24(5):555-571中)、半乳糖血症(Coelho等人，*J Inherit Metab Dis.* 2017年5月;40(3):325-342)、1型肝糖儲積症(Kishnani等人，*Genet Med.* 2014年11月;16(11):e1)、肝腎症候群(Ojeda-Yuren等人，*Ann Hepatol.* 2021年5月-6月;22:100236)、妊娠期肝內膽汁淤積症(Smith及Rood, *Clin Obstet Gynecol.* 2020年3月;63(1):134-151)、進行性家族性肝內膽汁淤積症(Baker等人，*Clin Res Hepaol Gastroenterol.* 2019年2月;43(1):20-36)、雷氏症候群(Maheady, *J Pediatr Health Care.* 1989年9月-10月;3(5):246-250)或溶酶體酸性脂肪酶缺乏症(Pastores及Hughes, *Drug Des Devel Ther.* 2020年2月11日;14:591-601)。

9. 自低免疫原性多能細胞分化之胰島細胞

【0982】在一些實施例中，胰島細胞(亦稱為β細胞)衍生自本文所述之HIP細胞。在一些情況下，將分化成多種胰島細胞類型之低免疫原性多能細胞移植或植入個體(*例如*接受者)中。如熟習此項技術者將瞭解，分化方法取決於使用已知技術之期望細胞類型。例示性胰島細胞類型包括(但不限於)胰島祖細胞、不成熟胰島細胞、成熟胰島細胞及諸如此類。在一些實施例中，將本文所述之胰臟細胞投與個體來治療糖尿病。

【0983】在一些實施例中，將自個體低免疫原性多能細胞分化之胰島細胞投與患者，例如患有諸如(但不限於)以下之疾病或疾患之人類患者：酒精相關之胰臟炎、膽石性胰臟炎、糖尿病(1型及2型)、糖尿病前期、妊娠性糖尿病、胰臟外分泌性糖尿病、胰臟外分泌不足、急性胰臟炎、慢性胰臟炎、遺傳性胰臟炎、高胰島素血症、胰囊腫、左-艾二氏症候群、舒-戴二氏症候群、遺傳性血色素沈著症、地中海性貧血、胰臟鐵沈積、囊性纖維化、胰臟分裂及胰臟切除(參見Ciochina等人，*Biomolecules* 2022年5月;12(5):618)。

【0984】在一些實施例中，胰島細胞衍生自本文所述之低免疫原性多能細胞。可用於將多能幹細胞分化成胰島細胞之方法闡述於例如US9,683,215；US9,157,062；及US8,927,280中。在一些實施例中，胰島細胞包含α、β、δ、PP(產生胰臟多肽)及/或ε-細胞(產生飢餓素)胰島細胞。在一些實施例中，胰島細胞包含iPSC源性β細胞。

【0985】在一些實施例中，藉由如本文所揭示之方法產生之胰島細胞分泌胰島素。在一些實施例中，胰島細胞展現內源胰島細胞之至少兩種特徵，例如(但不限於)因應葡萄糖分泌胰島素及表現β細胞標記物。

【0986】例示性β細胞標記物或β細胞祖細胞標記物包括(但不限於) c-肽、Pdx1、葡萄糖轉運子2 (Glut2)、HNF6、VEGF、葡萄糖激酶(GCK)、激素原轉化酶(PC 1/3)、Cdcp1、NeuroD、Ngn3、Nkx2.2、Nkx6.1、Nkx6.2、Pax4、Pax6、Ptf1a、Isl1、Sox9、Sox17及FoxA2。

【0987】在一些實施例中，經分離胰島細胞因應葡萄糖之增加而產生胰島素。在多個實施例中，經分離胰島細胞因應葡萄糖之增加而分泌胰島素。在一些實施例中，細胞具有不同之形態，例如卵石細胞形態及/或約17 pm至約25 pm之直徑。

【0988】在一些實施例中，低免疫原性多能細胞分化成用於移植之β樣細胞或胰島類器官以解決I型糖尿病(T1DM)。細胞系統係解決T1DM有前途之方式，參見例如Ellis等人，Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017年10月;14(10):612-628，其以引用方式併入本文中。另外，Pagliuca等人(Cell, 2014, 159(2):428-39)報導β-細胞自hiPSC之成功分化，該等內容之全文且具體而言此處所概述用於自人類多能幹細胞大規模產生功能性人類β細胞之方法及試劑皆以引用方式併入本文中)。另外，Vegas等人

顯示自人類多能幹細胞產生人類β細胞，然後囊封以避免宿主之免疫排斥；Vegas等人，Nat Med, 2016, 22(3):306-11，其全文且具體而言此處所概述用於自人類多能幹細胞大規模產生功能性人類β細胞之方法及試劑皆以引用方式併入本文中。

【0989】在一些實施例中，藉由活體外分化自低免疫原性多能細胞之群體產生低免疫原性胰島細胞群體之方法包括：(a)在包含一或多種選自由以下組成之群之因子的第一培養基中培養HIP細胞之群體：胰島素樣生長因子、轉型生長因子、FGF、EGF、HGF、SHH、VEGF、轉型生長因子-b超家族、BMP2、BMP7、GSK抑制劑、ALK抑制劑、BMP 1型受體抑制劑及視黃酸，以產生不成熟胰島細胞之群體；及(b)在不同於第一培養基之第二培養基中培養不成熟胰島細胞之群體，以產生低免疫胰島細胞之群體。在一些實施例中，GSK抑制劑係CHIR-99021、其衍生物或其變異體。在一些情況下，GSK抑制劑之濃度介於約2 mM至約10 mM範圍內。在一些實施例中，ALK抑制劑係SB-431542、其衍生物或其變異體。在一些情況下，ALK抑制劑之濃度介於約1 pM至約10 pM範圍內。在一些實施例中，第一培養基及/或第二培養基不含動物血清。

【0990】在一些實施例中，自非胰島細胞分離低免疫原性胰島細胞之群體。在一些實施例中，在投與之前擴增經分離之低免疫原性胰島細胞之群體。在某些實施例中，在投與之前擴增且冷凍保存經分離之低免疫原性胰島細胞

之群體。

【0991】分化係如此項技術中已知、通常藉由評估β細胞相關或特異性標記物(包括但不限於胰島素)之存在來分析。分化亦可在功能上量測，例如量測葡萄糖代謝，通常參見Muraro等人，Cell Syst. 2016年10月26日; 3(4): 385-394.e3，其全文且具體而言此處所概述之生物標記物皆以引用方式併入本文中。一旦生成β細胞，便可立即將其移植(以細胞懸浮液形式或在如本文所論述之凝膠基質內)至門靜脈/肝、網膜、胃腸黏膜、骨髓、肌肉或皮下囊中。

【0992】用於本揭示案之胰島細胞(包括多巴胺能神經元)之其他描述參見WO2020/018615，該揭示內容之全文皆以引用方式併入本文中。

10. 自低免疫原性多能細胞分化之視網膜色素上皮(RPE)細胞

【0993】本文提供視網膜色素上皮(RPE)細胞，其衍生自上文所述之HIP細胞。例如，人類RPE細胞可藉由分化人類HIP細胞來產生。在一些實施例中，將分化成多種RPE細胞類型之低免疫原性多能細胞移植或植入個體(*例如*接受者)中。如熟習此項技術者將瞭解，分化方法取決於使用已知技術之期望細胞類型。

【0994】術語「RPE」細胞係指具有類似或實質上類似於天然RPE細胞之遺傳表現概況之色素視網膜上皮細胞。當在平面基板上生長至鋪滿時，衍生自多能幹細胞之

該等RPE細胞可具有天然RPE細胞之多邊形、平面片狀形態。

【0995】RPE細胞可植入患有黃斑變性之患者或具有受損RPE細胞之患者中。在一些實施例中，患者患有年齡相關之黃斑變性(AMD)、早期AMD、中期AMD、晚期AMD、非新生血管性年齡相關之黃斑變性、乾式黃斑變性(乾式年齡相關之黃斑變性)、濕式黃斑變性(濕式年齡相關之黃斑變性)、成人發作型卵黃囊狀黃斑失養症(AVMD)、百斯特卵黃囊狀黃斑失養症、斯達加特樣黃斑失養症(STGD3)、索斯比眼底失養症(SFD)、ABCA4相關之疾病、IB型厄捨病、常染色體隱性卵黃樣變、常染色體顯性玻璃體視網膜脈絡膜病變、幼年型黃斑變性(JMD)(*例如*斯塔加特病(Stargardt disease)、貝斯特氏病(Best disease)及幼年型視網膜劈裂症)、萊伯氏先天性黑矇症或色素性視網膜炎(皆闡述於Yang等人，*Front Pharmacol.* 2021年7月28日;12:727870；Sparrow等人，*Curr Mol Med.* 2010年12月;10(9):802-823中)。在其他實施例中，患者患有視網膜脫落或視網膜撕裂。

【0996】例示性RPE細胞類型包括(但不限於)視網膜色素上皮(RPE)細胞、RPE祖細胞、不成熟RPE細胞、成熟RPE細胞、功能性RPE細胞及諸如此類。

【0997】可用於將多能幹細胞分化成RPE細胞之方法闡述於例如US9,458,428及US9,850,463中，該等揭示內容之全文(包括說明書)皆以引用方式併入本文中。自人類誘

導性多能幹細胞產生RPE細胞之其他方法可參見例如Lamba等人，PNAS, 2006, 103(34): 12769-12774；Mellough等人，Stem Cells, 2012, 30(4):673-686；Idelson等人，Cell Stem Cell, 2009, 5(4): 396-408；Rowland等人，Journal of Cellular Physiology, 2012, 227(2):457-466；Buchholz等人，Stem Cells Trans Med, 2013, 2(5): 384-393；及da Cruz等人，Nat Biotech, 2018, 36:328-337。

【0998】人類多能幹細胞已使用Kamao等人，Stem Cell Reports 2014:2:205-18中所概述之技術分化成RPE細胞，該文獻之全文且具體而言此處所概述用於分化技術及試劑之方法及試劑皆以引用方式併入本文中；亦參見Mandai等人，N Engl J Med, 2017, 376:1038-1046，關於生成RPE細胞片且移植至患者中之技術之內容的全文皆併入本文中。分化可如此項技術中已知、通常藉由評估RPE相關及/或特異性標記物之存在或藉由在功能上量測來分析。參見例如Kamao等人，Stem Cell Reports, 2014, 2(2):205-18，該等內容之全文且具體而言結果部分第一段中所概述之標記物皆以引用方式併入本文中。

【0999】在一些實施例中，藉由活體外分化自低免疫原性多能細胞之群體產生低免疫原性視網膜色素上皮(RPE)細胞群體之方法包括：(a)在包含選自由以下組成之群之因子中之任一者的第一培養基中培養低免疫原性多能細胞之群體：活化素A、bFGF、BMP4/7、DKK1、IGF1、頭蛋白、BMP抑制劑、ALK抑制劑、ROCK抑制劑及

VEGFR抑制劑，以產生前RPE細胞之群體；及(b)在不同於第一培養基之第二培養基中培養前RPE細胞之群體，以產生低免疫原性RPE細胞之群體。在一些實施例中，ALK抑制劑係SB-431542、其衍生物或其變異體。在一些情況下，ALK抑制劑之濃度介於約2 mM至約10 pM範圍內。在一些實施例中，ROCK抑制劑係Y-27632、其衍生物或其變異體。在一些情況下，ROCK抑制劑之濃度介於約1 pM至約10 pM範圍內。在一些實施例中，第一培養基及/或第二培養基不含動物血清。

【1000】分化可如此項技術中已知、通常藉由評估RPE相關及/或特異性標記物之存在或藉由在功能上量測來分析。參見例如Kamao等人，Stem Cell Reports, 2014, 2(2):205-18，該等內容之全文且具體而言結果部分皆以引用方式併入本文中。

【1001】用於本揭示案之RPE細胞之其他描述參見WO2020/018615，該揭示內容之全文皆以引用方式併入本文中。

【1002】對於治療應用，根據所揭示方法製備之細胞通常可以包含等滲賦形劑之醫藥組合物之形式供應，且在對人類投與足夠無菌之條件下製備。關於細胞組合物之藥物調配物之一般原則參見「Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy」，Morstyn及Sheridan編輯，Cambridge University Press, 1996；及「Hematopoietic Stem Cell

Therapy」, E. D. Ball, J. Lister及P. Law, Churchill Livingstone, 2000。細胞可封裝於適於分配或臨床使用之裝置或容器中。

11. 自低免疫原性多能細胞分化之T淋巴球

【1003】本文所提供之T淋巴球(T細胞，包括原代T細胞)衍生自本文所述之HIP細胞(*例如*低免疫原性iPSC)。自多能幹細胞(*例如*iPSC)產生T細胞(包括CAR-T細胞)之方法闡述於例如Iriguchi等人，Nature Communications 12, 430 (2021)；Themeli等人，Cell Stem Cell, 16(4):357-366 (2015)；Themeli等人，Nature Biotechnology 31:928-933 (2013)中。

【1004】T淋巴球源性低免疫原性細胞包括(但不限於)逃避免疫識別之原代T細胞。在一些實施例中，低免疫原性細胞係自T細胞(例如原代T細胞)產生(*例如*生成、培養或衍生而來)。在一些情況下，原代T細胞係自個體(subject)或個體(individual)獲得(*例如*收穫、提取、去除或獲取)。在一些實施例中，原代T細胞係自T細胞之集合產生，使得T細胞來自一或多個個體(*例如*一或多個人類，包括一或多個健康人類)。在一些實施例中，原代T細胞之集合來自1-100個、1-50個、1-20個、1-10個、1個或多個、2個或更多個、3個或更多個、4個或更多個、5個或更多個、10個或更多個、20個或更多個、30個或更多個、40個或更多個、50個或更多個、或100個或更多個個體。在一

些實施例中，供體個體不同於患者(*例如*投與治療細胞之接受者)。在一些實施例中，T細胞之集合不包括來自患者之細胞。在一些實施例中，自其獲得T細胞集合之一或多個供體個體不同於患者。

【1005】在一些實施例中，將自個體低免疫原性多能細胞分化之T淋巴球投與患者，例如患有諸如(但不限於)以下之疾病或疾患之人類患者：重度合併免疫缺乏(SCID)、歐門氏症候群、軟骨-毛髮發育不全、網狀組織發育不良(皆闡述於Shearer等人，J Allergy Clin Immunol. 2014年4月;133(4):1092-8中)、偉-爾二氏症候群(Massaad等人，*Ann N Y Acad Sci*. 2013年5月;1285:26-4)、毛細血管擴張性共濟失調(Rothblum-Oviatt等人，Orphnet J Rare Dis. 2016年11月25日;11(1):159)、迪喬治症候群(22q11.2缺失症候群，參見McDonald-McGinn等人，Nat Rev Dis Primers. 2015年11月19日;1:15071)、免疫性骨發育不良(Saraiva等人，J Med Genet. 1999年10月;36(10):786-789)、先天性角化不良(Stoopler及Shanti, Mayo Clin Proc. 2019年9月;94(9):1668-1669)或慢性黏膜皮膚念珠菌病(Kirkpatrick, J Am Acad Dermatol. 1994年9月;31(3 Pt 2):S14-17)。在其他實施例中，本文所提供之T細胞可用於治療適宜癌症，包括(但不限於)B細胞急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤、肝癌、胰臟癌、乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、急性骨髓性淋巴性白血病、多發性骨髓瘤、胃癌、胃腺

癌、胰臟腺癌、神經膠母細胞瘤、神經母細胞瘤、肺鱗狀細胞癌、肝細胞癌及膀胱癌(參見Mohanti等人，Oncol Rep 42: 2183-2195, 2019)。

【1006】在一些實施例中，將自個體低免疫原性多能細胞分化之T淋巴球投與患者，例如患有諸如(但不限於)以下之疾病或疾患之人類患者：重度合併免疫缺乏(SCID)、歐門氏症候群、軟骨-毛髮發育不全、網狀組織發育不良(皆闡述於Shearer等人，J Allergy Clin Immunol. 2014年4月;133(4):1092-8中)、偉-爾二氏症候群(Massaad等人，*Ann N Y Acad Sci.* 2013年5月;1285:26-4)、毛細血管擴張性共濟失調(Rothblum-Oviatt等人，Orphnet J Rare Dis. 2016年11月25日;11(1):159)、迪喬治症候群(22q11.2缺失症候群，參見McDonald-McGinn等人，Nat Rev Dis Primers. 2015年11月19日;1:15071)、免疫性骨發育不良(Saraiva等人，J Med Genet. 1999年10月;36(10):786-789)、先天性角化不良(Stoopler及Shanti, Mayo Clin Proc. 2019年9月;94(9):1668-1669)或慢性黏膜皮膚念珠菌病(Kirkpatrick, J Am Acad Dermatol. 1994年9月;31(3 Pt 2):S14-17)。在其他實施例中，本文所提供之T細胞可用於治療適宜癌症，包括(但不限於)B細胞急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤、肝癌、胰臟癌、乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、急性骨髓性淋巴性白血病、多發性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰臟腺癌、神經膠母細胞瘤、神經母細胞瘤、肺鱗狀

細胞癌、肝細胞癌及膀胱癌(參見Mohanti等人，Oncol Rep 42: 2183-2195, 2019)。

【1007】在一些實施例中，癌症係血液惡性病。血液惡性病之非限制性實例包括濾泡性淋巴瘤(FL)、骨髓性贅瘤、成熟T/NK贅瘤、組織細胞贅瘤、多發性骨髓瘤(MM)、骨髓發育不良症候群(MDS)、淋巴漿細胞性淋巴瘤(LPL)、瓦登斯特隆巨球蛋白血症、伯基特氏淋巴瘤(BL)、原發性縱膈大B細胞淋巴瘤(PMBL)、霍奇金氏淋巴瘤、外套細胞淋巴瘤(MCL)、毛細胞白血病(HCL)、骨髓增生性/骨髓發育不良症候群(MDS)、急性淋巴性白血病(ALL)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、B細胞急性淋巴性白血病(B-ALL)、T細胞急性淋巴性白血病(T-ALL)、T細胞淋巴瘤及B細胞淋巴瘤(參見Taylor等人，Blood 2017年7月27日; 130(4): 410-423)。

【1008】在一些實施例中，疾病係自體免疫疾病，包括例如狼瘡、全身性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎、牛皮癬、牛皮癬關節炎、多發性硬化、克隆氏病、潰瘍性結腸炎、艾迪生病、格雷氏病、休格倫氏症候群、橋本氏甲狀腺炎、1型糖尿病、原發性膽汁性肝硬化、自體免疫肝炎及乳糜瀉(闡述於*Wang*等人，*J Intern Med.* 2015;278(4):369-395中)。

【1009】在一些實施例中，低免疫原性細胞不會活化患者(*例如*投與後之接受者)之先天及/或適應性免疫反應。

提供藉由向有需要之個體(*例如*接受者)或患者投與低免疫原性細胞群體來治療病症的方法。在一些實施例中，本文所述之低免疫原性細胞包含經改造(*例如*經修飾)以表現嵌合抗原受體(包括但不限於本文所述之嵌合抗原受體)之T細胞。在一些情況下，T細胞係來自一或多個個體之原代T細胞之群體或亞群。在一些實施例中，本文所述之T細胞(例如經改造或經修飾之T細胞)包含減少的內源T細胞受體表現。

【1010】在一些實施例中，HIP源性T細胞包括嵌合抗原受體(CAR)。任一適宜CAR可納入HIP源性T細胞中，包括本文所述之CAR。在一些實施例中，HIP源性T細胞包括編碼CAR之多核苷酸，其中多核苷酸插入基因體基因座中。在一些實施例中，多核苷酸插入安全港或靶基因座中。在一些實施例中，多核苷酸插入B2M、CIITA、TRAC、TRB、PD-1或CTLA-4基因中。可使用任一適宜方法將CAR插入低免疫原性細胞之基因體基因座中，包括本文所述之基因編輯方法(*例如*CRISPR/Cas系統)。

【1011】本文所提供之HIP源性T細胞可用於治療適宜癌症，包括(但不限於) B細胞急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤、肝癌、胰臟癌、乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、急性骨髓性淋巴性白血病、多發性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰臟腺癌、神經膠母細胞瘤、神經母細胞瘤、肺鱗狀細胞癌、肝細胞癌及膀胱癌。

12. 衍生自低免疫原性多能細胞之NK細胞

【1012】本文所提供之自然殺手(NK)細胞衍生自本文所述之HIP細胞(*例如*低免疫原性iPSC)。

【1013】NK細胞(亦定義為『大顆粒淋巴球』)代表自普通淋巴祖細胞(其亦產生B淋巴球及T淋巴球)分化之細胞譜系。與T細胞不同，NK細胞在質膜上通常不包含CD3。重要的是，NK細胞不表現TCR且通常亦缺乏其他抗原特異性細胞表面受體(以及TCR及CD3，其亦不表現免疫球蛋白B細胞受體，而是通常表現CD16及CD56)。NK細胞細胞毒性活性不需要敏化，但藉由用多種細胞介素(包括IL-2)活化而增強。通常認為NK細胞缺乏抗原-受體介導之信號傳導所需之適當或完整信號傳導路徑，且因此認為不能夠進行抗原受體依賴性信號傳導、活化及擴增。NK細胞具有細胞毒性，且平衡活化及抑制性受體信號傳導以調節其細胞毒性活性。例如，表現CD16之NK細胞可結合至與受感染細胞結合之抗體之Fc結構域，從而引起NK細胞活化。相比之下，針對表現高水準MHC I類蛋白質/分子之細胞之活性降低。在與靶細胞接觸時，NK細胞釋放蛋白質(例如穿孔蛋白)及酶(例如蛋白酶(顆粒酶))。穿孔蛋白可在靶細胞之細胞膜中形成孔，從而誘導細胞凋亡或細胞溶解。

【1014】業內存在可用於自多能幹細胞(*例如*iPSC)生成NK細胞(包括CAR-NK細胞)之多種技術；參見例如Zhu等人，*Methods Mol Biol.* 2019; 2048:107-119；Knorr等

人，*Stem Cells Transl Med.* 2013 2(4):274-83. doi: 10.5966/sctm.2012-0084；Zeng等人，*Stem Cell Reports.* 2017年12月12日;9(6):1796-1812；Ni等人，*Methods Mol Biol.* 2013;1029:33-41；Bernareggi等人，*Exp Hematol.* 2019 71:13-23；Shankar等人，*Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):234，所有該等文獻之全文且具體而言用於分化之方法及試劑皆以引用方式併入本文中。分化可如此項技術中已知、通常藉由評估NK細胞相關及/或特異性標記物(包括但不限於CD56、KIRs、CD16、NKp44、NKp46、NKG2D、TRAIL、CD122、CD27、CD244、NK1.1、NKG2A/C、NCR1、Ly49、CD49b、CD11b、KLRG1、CD43、CD62L及/或CD226)之存在來分析。

【1015】在一些實施例中，將自個體低免疫原性多能細胞分化之NK細胞投與患者，例如患有例如(但不限於)以下之疾病或疾患之人類患者：全身性紅斑狼瘡(SLE)、1型糖尿病、自體免疫肝病、休格倫氏症候群、類風濕性關節炎、全身性硬化(硬皮症)、器官特異性自體免疫疾病(自體免疫肝炎、原發性硬化性膽管炎)、酒精相關之肝病、多發性硬化(Liu等人，*Front Immunol.* 2021; 12: 624687中所述之全部)、NK細胞缺乏(NKD)(功能性(FNKD)或經典(CNKD))、免疫缺乏-多內分泌病-腸病-X連鎖(IPEX)樣症候群、布魯姆症候群、范康尼氏貧血、先天性角化不良、闕東二氏症候群、家族性嗜血細胞性淋巴組織細胞增多症(FHL)、2型格里切利症候群、赫普二氏症候群、帕-雷二

氏症候群、偉-爾二氏症候群、常染色體隱性高IgE症候群、梅-黑二氏異常、或I型或III型白血球黏附缺乏症(Orange, J. S, *J Allergy Clin Immunol.* 2013年9月; 132(3): 515-526中所述之全部)。在其他實施例中，本文所提供之NK細胞可用於治療適宜癌症，包括(但不限於) B細胞急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤、肝癌、胰臟癌、乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、急性骨髓性淋巴性白血病、多發性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰臟腺癌、神經膠母細胞瘤、神經母細胞瘤、肺鱗狀細胞癌、肝細胞癌及膀胱癌(參見Mohanti等人，*Oncol Rep* 42: 2183-2195, 2019)。

【1016】在一些實施例中，NK細胞不會活化患者(*例如*投與後之接受者)之先天及/或適應性免疫反應。提供藉由向有需要之個體(*例如*接受者)或患者投與NK細胞群體來治療病症的方法。在一些實施例中，本文所述之NK細胞包含經改造(*例如*經修飾)以表現嵌合抗原受體(包括但不限於本文所述之嵌合抗原受體)之NK細胞。任一適宜CAR可納入NK細胞中，包括本文所述之CAR。在一些實施例中，NK細胞包括編碼CAR之多核苷酸，其中多核苷酸插入基因體基因座中。在一些實施例中，多核苷酸插入安全港或靶基因座中。在一些實施例中，多核苷酸插入B2M、CIITA、TRAC、TRB、PD1或CTLA4基因中。可使用任一適宜方法將CAR插入NK細胞之基因體基因座中，包括本文所述之基因編輯方法(*例如*CRISPR/Cas系統)。

BB. 遺傳修飾之方法

【1017】在一些實施例中，本文之載體係能夠轉移或轉運另一核酸分子(包括轉移或轉運至細胞中或細胞基因體中)之核酸分子。經轉移核酸通常連接至(例如插入)載體核酸分子。載體可包括引導細胞中之自主複製之序列，或可包括足以允許整合至宿主細胞DNA中之序列。有用的載體包括例如質體(例如DNA質體或RNA質體)、轉座子、黏粒、細菌人工染色體及病毒載體。有用的病毒載體包括例如複製缺陷性反轉錄病毒及慢病毒。非病毒載體可能需要遞送媒劑來幫助核酸分子進入細胞中。

【1018】病毒載體可包含核酸分子，該核酸分子包括病毒源性核酸元件，該等病毒源性核酸元件通常幫助核酸分子轉移或整合至細胞基因體中或轉移或整合至調介核酸轉移之病毒粒子。病毒粒子通常將包括各種病毒組分且有時亦包括除核酸外之宿主細胞組分。病毒載體可包含例如能夠將核酸轉移至細胞中或轉移至經轉移核酸(例如呈裸DNA)之病毒或病毒粒子。病毒載體及轉移質體可包含主要衍生自病毒之結構及/或功能遺傳元件。反轉錄病毒載體可包含含有主要衍生自反轉錄病毒之結構及功能遺傳元件或其部分之病毒載體或質體。

【1019】在本文所述之一些載體中，與相應野生型病毒相比，有助於複製或為複製所必需之一或多個蛋白質編碼區之至少一部分可不存在。此使得病毒載體為複製缺陷

性的。在一些實施例中，載體能夠轉導靶非分裂宿主細胞及/或將其基因體整合至宿主基因體中。

【1020】在一些實施例中，反轉錄病毒核酸包含以下中之一或多者(例如全部)：5'啟動子(例如，以控制完整封裝之RNA之表現)、5' LTR (例如，包括R (多腺苷酸化尾信號)及/或包括引子活化信號之U5)、引子結合位點、psi封裝信號、用於核輸出之RRE元件、控制轉基因表現之直接在轉基因上游之啟動子、轉基因(或其他外源劑元件)、聚嘌呤束及3' LTR (例如，包括突變的U3、R及U5)。在一些實施例中，反轉錄病毒核酸進一步包含cPPT、WPRE及/或絕緣子元件中之一或多者。

【1021】反轉錄病毒通常藉由將其基因體RNA反轉錄成線性雙股DNA拷貝且隨後將其基因體DNA共價整合至宿主基因體中來複製。野生型反轉錄病毒基因體之結構通常包含5'長末端重複(LTR)及3' LTR，位於其之間或其內的係使得基因體能夠封裝之封裝信號、引子結合位點、使得能夠整合至宿主細胞基因體中之整合位點、及編碼促進病毒粒子組裝之封裝組分之gag、pol及env基因。更複雜之反轉錄病毒具有其他特性，例如HIV中之rev及RRE序列，其使得整合原病毒之RNA轉錄物自核有效輸出至受感染靶細胞之細胞質。在原病毒中，病毒基因在兩端側接有稱為長末端重複(LTR)之區域。LTR參與原病毒整合及轉錄。LTR亦用作增強子-啟動子序列且可控制病毒基因之表現。反轉錄病毒RNA藉助位於病毒基因體5'端之psi序列進行殼

體化。

【1022】LTR自身通常係相似(例如一致)之序列，其可分成三種元件，稱為U3、R及U5。U3衍生自RNA之3'末端獨特之序列。R衍生自在RNA之兩個末端重複之序列，且U5衍生自RNA之5'末端獨特之序列。在不同之反轉錄病毒中，三種元件之大小可顯著不同。

【1023】對於病毒基因體，轉錄起始位點通常處於一個LTR中U3與R之間的邊界，且聚(A)添加(終止)位點處於另一LTR中R與U5之間的邊界。U3含有原病毒之大部分轉錄控制元件，其包括對細胞及在一些情形下病毒轉錄活化蛋白有反應之啟動子及多條增強子序列。一些反轉錄病毒包含編碼參與基因表現調控之蛋白質之以下基因中之任一者或多者：tot、rev、tax及rex。

【1024】關於結構基因gag、pol及env自身，gag編碼病毒之內部結構蛋白。Gag蛋白以蛋白水解方式處理成成熟蛋白質MA (基質)、CA (衣殼)及NC (核衣殼)。pol基因編碼反轉錄酶(RT)，其含有調介基因體複製之DNA聚合酶、相關RNase H及整合酶(IN)。env基因編碼病毒粒子之表面(SU)糖蛋白及跨膜(TM)蛋白，其形成與細胞受體蛋白特異性相互作用之複合物。此相互作用會促進感染，例如藉由融合病毒膜與細胞膜。

【1025】在複製缺陷性反轉錄病毒載體基因體中，gag、pol及env可能不存在或無功能。RNA兩端之R區通常係重複序列。U5及U3分別代表RNA基因體5'端及3'端之獨

特序列。反轉錄病毒亦可含有編碼除gag、pol及env外之蛋白質之其他基因。其他基因之實例包括(在HIV中) vif、vpr、vpx、vpu、tat、rev及nef中之一或多者。EIAV具有(尤其)其他基因S2。

【1026】適用於特定實施例中之說明性反轉錄病毒包括(但不限於)：莫洛尼鼠類白血病病毒(M-MuLV)、莫洛尼鼠類肉瘤病毒(MoMSV)、哈維鼠類肉瘤病毒(Harvey murine sarcoma virus，HaMuSV)、鼠類乳瘤病毒(MuMTV)、長臂猿白血病病毒(GaLV)、貓白血病病毒(FLV)、泡沫病毒、弗里德鼠類白血病病毒(Friend murine leukemia virus)、鼠類幹細胞病毒(MSCV)及勞斯肉瘤病毒(RSV))及慢病毒。

【1027】在一些實施例中，反轉錄病毒係γ反轉錄病毒。在一些實施例中，反轉錄病毒係ε反轉錄病毒。在一些實施例中，反轉錄病毒係α反轉錄病毒。在一些實施例中，反轉錄病毒係β反轉錄病毒。在一些實施例中，反轉錄病毒係δ反轉錄病毒。在一些實施例中，反轉錄病毒係泡沫反轉錄病毒。在一些實施例中，反轉錄病毒係內源反轉錄病毒。在一些實施例中，反轉錄病毒係慢病毒。

【1028】在一些實施例中，反轉錄病毒或慢病毒載體進一步包含一或多個絕緣子元件，例如本文所述之絕緣子元件。在多個實施例中，載體包含可操作連接至編碼外源劑之多核苷酸之啟動子。載體可具有一或多個LTR，其中任一LTR包含一或多個修飾，例如一或多個核苷酸取代、

添加或缺失。載體可進一步包含一或多種輔助元件以增加轉導效率(例如cPPT/FLAP)、病毒封裝(例如Psi (Y)封裝信號、RRE)及/或增加外源基因表現之其他元件(例如聚 (A)序列)，且可視情況地包含WPRE或HPRE。在一些實施例中，慢病毒核酸包含以下中之一或多者，例如全部，例如自5'至3'：啟動子(例如CMV)、R序列(例如包含TAR)、U5序列(例如用於整合)、PBS序列(例如用於反轉錄)、DIS序列(例如用於基因體二聚化)、psi封裝信號、部分gag序列、RRE序列(例如用於核輸出)、cPPT序列(例如用於核輸入)、驅動外源劑表現之啟動子、編碼外源劑之基因、WPRE序列(例如用於有效轉基因表現)、PPT序列(例如用於反轉錄)、R序列(例如用於多腺苷酸化及終止)及U5信號(例如用於整合)。

【1029】說明性慢病毒包括(但不限於)：HIV (人類免疫缺乏病毒；包括1型HIV及2型HIV)；維斯納-梅迪病毒(visna-maedi virus，VMV)；山羊關節炎-腦炎病毒(CAEV)；馬傳染性貧血病毒(EIAV)；貓免疫缺乏病毒(FIV)；牛免疫缺乏病毒(BIV)；及猿猴免疫缺乏病毒(SIV)。在一些實施例中，使用基於HIV之載體骨架(即HIV順式作用序列元件)。慢病毒載體可包含含有主要衍生自慢病毒之結構及功能遺傳元件或其部分(包括LTR)之病毒載體或質體。

【1030】在實施例中，慢病毒載體(例如慢病毒表現載體)可包含慢病毒轉移質體(例如呈裸DNA)或感染性慢病

毒粒子。關於諸如選殖位點、啟動子、調控元件、異源核酸等之元件應理解，該等元件之序列可以RNA形式存在於慢病毒粒子中且可以DNA形式存在於DNA質體中。

【1031】在實施例中，慢病毒載體係具有足以允許在封裝組分存在下將RNA基因體封裝成能夠感染靶細胞之病毒粒子之反轉錄病毒遺傳資訊之載體。靶細胞之感染可包括反轉錄並整合至靶細胞基因體中。RLV通常攜載欲藉由載體遞送至靶細胞之非病毒編碼序列。在實施例中，RLV無法獨立複製以在靶細胞內產生感染性反轉錄病毒粒子。通常，RLV缺乏功能性gag-pol及/或env基因及/或參與複製之其他基因。載體可構形為分裂內含子載體，例如如PCT專利申請案WO 99/15683中所述，該專利申請案之全文皆以引用方式併入本文中。

【1032】在一些實施例中，慢病毒載體包含最小病毒基因體，例如，病毒載體已經操縱以移除非必需元件且保留必需元件，以提供將所關注核苷酸序列感染、轉導及遞送至靶宿主細胞所需之功能性，例如如WO 98/17815中所述，該專利之全文皆以引用方式併入本文中。

【1033】最小慢病毒基因體可包含例如(5')R-U5-一或多條第一核苷酸序列-U3-R(3')。然而，用於在源細胞內產生慢病毒基因體之質體載體亦可包括可操作連接至慢病毒基因體之轉錄調控控制序列以引導基因體在源細胞中之轉錄。該等調控序列可包含與所轉錄反轉錄病毒序列相關之天然序列，例如5' U3區，或其可包含異源啟動子，例如

另一病毒啟動子，例如CMV啟動子。一些慢病毒基因體包含促進有效病毒產生之其他序列。舉例而言，在HIV之情形下，可包括rev及RRE序列。

【1034】在一些實施例中，將稀切核酸內切酶引入含有呈編碼稀切核酸內切酶之核酸形式之靶多核苷酸序列的細胞中。將核酸引入細胞中之過程可藉由任一適宜技術來達成。適宜技術包括磷酸鈣或脂質介導之轉染、電穿孔及使用病毒載體轉導或感染。在一些實施例中，核酸包含DNA。在一些實施例中，核酸包含如本文所述之經修飾DNA。在一些實施例中，核酸包含mRNA。在一些實施例中，核酸包含如本文所述之經修飾mRNA（*例如*合成經修飾mRNA)。

【1035】本揭示案涵蓋以熟習此項技術者可獲得之任一方式利用本揭示案之基因編輯系統(*例如*CRISPR/Cas)改變靶多核苷酸序列。可使用能夠改變細胞中之靶多核苷酸序列之任一CRISPR/Cas系統。該等CRISPR-Cas系統可採用多種Cas蛋白(Haft等人，PLoS Comput Biol. 2005; 1(6)e60)。允許CRISPR/Cas系統改變細胞中之靶多核苷酸序列之該等Cas蛋白之分子機構包括RNA結合蛋白、核酸內切酶及核酸外切酶、解旋酶及聚合酶。在一些實施例中，CRISPR/Cas系統係I型CRISPR系統。在一些實施例中，CRISPR/Cas系統係II型CRISPR系統。在一些實施例中，CRISPR/Cas系統係V型CRISPR系統。

【1036】本揭示案之CRISPR/Cas系統可用於改變細胞

中之任一靶多核苷酸序列。熟習此項技術者將容易地認識到，欲在任一特定細胞中改變之期望靶多核苷酸序列可對應於任一基因體序列，該基因體序列之表現與病症相關或以其他方式幫助病原體進入細胞中。舉例而言，在細胞中改變之期望靶多核苷酸序列可為對應於基因體序列之多核苷酸序列，該基因體序列含有疾病相關之單一多核苷酸多型性。在該實例中，本揭示案之CRISPR/Cas系統可用於藉由用野生型對偶基因替代疾病相關之SNP來校正細胞中之該疾病相關之SNP。作為另一實例，負責病原體進入或增殖至細胞中之靶基因之多核苷酸序列可為適於缺失或插入之靶以破壞靶基因之功能，從而防止病原體進入細胞或在細胞內增殖。

【1037】在一些實施例中，靶多核苷酸序列係基因體序列。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係人類基因體序列。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係哺乳動物基因體序列。在一些實施例中，靶多核苷酸序列係脊椎動物基因體序列。

【1038】在一些實施例中，本揭示案之CRISPR/Cas系統包括Cas蛋白及能夠將Cas蛋白引導至靶多核苷酸序列之靶基元並與其雜交之至少一至兩種核糖核酸。如本文所用之「蛋白質」及「多肽」可互換使用且係指藉由肽鍵連結之一系列胺基酸殘基(*即*胺基酸之聚合物)且包括經修飾胺基酸(*例如*磷酸化、糖化、糖基化等)及胺基酸類似物。例示性多肽或蛋白質包括基因產物、天然蛋白質、同源物、

同種同源物、片段及上述之其他等效物、變異體及類似物。

【1039】在一些實施例中，Cas蛋白包含一或多個胺基酸取代或修飾。在一些實施例中，一或多個胺基酸取代包含保守胺基酸取代。在一些情況下，取代及/或修飾可防止或減少蛋白水解性降解及/或延長細胞中多肽之半衰期。在一些實施例中，Cas蛋白可包含肽鍵替代(*例如*脲、硫脲、胺基甲酸酯、磺醯脲等)。在一些實施例中，Cas蛋白可包含天然胺基酸。在一些實施例中，Cas蛋白可包含替代性胺基酸(*例如*D-胺基酸、β-胺基酸、高半胱胺酸、磷酸絲胺酸等)。在一些實施例中，Cas蛋白可包含修飾以包括部分(*例如*聚乙二醇化、糖基化、脂化、乙醯化、封端等)。

【1040】在一些實施例中，Cas蛋白包含核心Cas蛋白、其同功型或具有任一Cas蛋白或其同功型之相似功能或活性之任一Cas樣蛋白。在一些實施例中，Cas蛋白包含核心Cas蛋白。例示性Cas核心蛋白包括(但不限於) Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8及Cas9。在一些實施例中，Cas蛋白包含V型Cas蛋白。在一些實施例中，Cas蛋白包含大腸桿菌(E. coli)亞型Cas蛋白(亦稱為CASS2)。例示性大腸桿菌亞型Cas蛋白包括(但不限於) Cse1、Cse2、Cse3、Cse4及Cas5e。在一些實施例中，Cas蛋白包含Ypest亞型Cas蛋白(亦稱為CASS3)。例示性Ypest亞型Cas蛋白包括(但不限於) Csy1、Csy2、Csy3及Csy4。

在一些實施例中，Cas蛋白包含Nmeni亞型Cas蛋白(亦稱為CASS4)。例示性Nmeni亞型Cas蛋白包括(但不限於) Csn1及Csn2。在一些實施例中，Cas蛋白包含Dvulg亞型Cas蛋白(亦稱為CASS1)。例示性Dvulg亞型Cas蛋白包括Csd1、Csd2及Cas5d。在一些實施例中，Cas蛋白包含Tneap亞型Cas蛋白(亦稱為CASS7)。例示性Tneap亞型Cas蛋白包括(但不限於) Cst1、Cst2、Cas5t。在一些實施例中，Cas蛋白包含Hmari亞型Cas蛋白。例示性Hmari亞型Cas蛋白包括(但不限於) Csh1、Csh2及Cas5h。在一些實施例中，Cas蛋白包含Apern亞型Cas蛋白(亦稱為CASS5)。例示性Apern亞型Cas蛋白包括(但不限於) Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5及Cas5a。在一些實施例中，Cas蛋白包含Mtube亞型Cas蛋白(亦稱為CASS6)。例示性Mtube亞型Cas蛋白包括(但不限於) Csm1、Csm2、Csm3、Csm4及Csm5。在一些實施例中，Cas蛋白包含RAMP模組Cas蛋白。例示性RAMP模組Cas蛋白包括(但不限於) Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5及Cmr6。參見例如Klompe等人，Nature 571, 219-225 (2019)；Strecker等人，Science 365, 48-53 (2019)。Cas蛋白之實例包括(但不限於)：Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3及/或GSU0054。在一些實施例中，Cas蛋白包含Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3及/或GSU0054。在一些實施例中，Cas蛋白之實例包括(但不限於)：Cas9、Csn2及/或

Cas4。在一些實施例中，Cas蛋白包含Cas9、Csn2及/或Cas4。在一些實施例中，Cas蛋白之實例包括(但不限於)：Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、Csx11及/或Csx10。在一些實施例中，Cas蛋白包含Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、Csx11及/或Csx10。在一些實施例中，Cas蛋白之實例包括(但不限於)：Csf1。在一些實施例中，Cas蛋白包含Csf1。在一些實施例中，Cas蛋白之實例包括(但不限於)：Cas12a、Cas12b、Cas12c、C2c4、C2c8、C2c5、C2c10及C2c9；以及CasX (Cas12e)及CasY (Cas12d)。亦參見例如Koonin等人，*Curr Opin Microbiol.* 2017; 37:67-78:「Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems」。在一些實施例中，Cas蛋白包含Cas12a、Cas12b、Cas12c、Cas12d、Cas12e、Cas12d及/或Cas12e。在一些實施例中，Cas蛋白之實例包括(但不限於)：Cas13、Cas13a、C2c2、Cas13b、Cas13c及/或Cas13d。在一些實施例中，Cas蛋白包含Cas13、Cas13a、C2c2、Cas13b、Cas13c及/或Cas13d。

【1041】在一些實施例中，Cas蛋白包含本文所述之任一Cas蛋白或其功能部分。如本文所用之「功能部分」係指保留與至少一種核糖核酸(*例如*引導RNA (gRNA))複合且裂解靶多核苷酸序列之能力之肽部分。在一些實施例中，功能部分包含選自由以下組成之群之可操作連接之Cas9蛋白功能結構域之組合：DNA結合結構域、至少一個RNA結合結構域、解旋酶結構域及核酸內切酶結構域。在

一些實施例中，功能部分包含選自由以下組成之群之可操作連接之Cas12a (亦稱為Cpf1)蛋白功能結構域之組合：DNA結合結構域、至少一個RNA結合結構域、解旋酶結構域及核酸內切酶結構域。在一些實施例中，功能結構域形成複合物。在一些實施例中，Cas9蛋白之功能部分包含RuvC樣結構域之功能部分。在一些實施例中，Cas9蛋白之功能部分包含HNH核酸酶結構域之功能部分。在一些實施例中，Cas12a蛋白之功能部分包含RuvC樣結構域之功能部分。

【1042】在一些實施例中，外源Cas蛋白可以多肽形式引入細胞中。在某些實施例中，Cas蛋白可結合至或融合至細胞穿透多肽或細胞穿透肽。如本文所用之「細胞穿透多肽」及「細胞穿透肽」分別指促進分子攝取至細胞中之多肽或肽。細胞穿透多肽可含有可偵測標記。

【1043】在許多實施例中，Cas蛋白可結合至或融合至帶電蛋白質(*例如*，攜載正電荷、負電荷或總體中性電荷)。該鏈接可為共價。在一些實施例中，Cas蛋白可融合至超荷電GFP以顯著增加Cas蛋白穿透細胞之能力(Cronican等人，ACS Chem Biol. 2010; 5(8):747-52)。在某些實施例中，Cas蛋白可融合至蛋白轉導結構域(PTD)以促進其進入細胞中。例示性PTD包括Tat、寡精胺酸及穿膜肽。在一些實施例中，Cas9蛋白包含融合至細胞穿透肽之Cas9多肽。在一些實施例中，Cas9蛋白包含融合至PTD之Cas9多肽。在一些實施例中，Cas9蛋白包含融合至tat結構

域之Cas9多肽。在一些實施例中，Cas9蛋白包含融合至寡精胺酸結構域之Cas9多肽。在一些實施例中，Cas9蛋白包含融合至穿膜肽結構域之Cas9多肽。在一些實施例中，Cas9蛋白包含融合至超荷電GFP之Cas9多肽。在一些實施例中，Cas12a蛋白包含融合至細胞穿透肽之Cas12a多肽。在一些實施例中，Cas12a蛋白包含融合至PTD之Cas12a多肽。在一些實施例中，Cas12a蛋白包含融合至tat結構域之Cas12a多肽。在一些實施例中，Cas12a蛋白包含融合至寡精胺酸結構域之Cas12a多肽。在一些實施例中，Cas12a蛋白包含融合至穿膜肽結構域之Cas12a多肽。在一些實施例中，Cas12a蛋白包含融合至超荷電GFP之Cas12a多肽。

【1044】在一些實施例中，Cas蛋白可以編碼Cas蛋白之核酸形式引入含有靶多核苷酸序列之細胞中。將核酸引入細胞中之過程可藉由任一適宜技術來達成。適宜技術包括磷酸鈣或脂質介導之轉染、電穿孔及使用病毒載體轉導或感染。在一些實施例中，核酸包含DNA。在一些實施例中，核酸包含如本文所述之經修飾DNA。在一些實施例中，核酸包含mRNA。在一些實施例中，核酸包含如本文所述之經修飾mRNA (*例如*合成經修飾mRNA)。

【1045】在一些實施例中，Cas蛋白與一至兩種核糖核酸複合。在一些實施例中，Cas蛋白與兩種核糖核酸複合。在一些實施例中，Cas蛋白與一種核糖核酸複合。在一些實施例中，Cas蛋白由如本文所述之經修飾核酸(*例如*合成經修飾mRNA)編碼。

【1046】本揭示案之方法涵蓋使用能夠將Cas蛋白引導至靶多核苷酸序列之靶基元且與其雜交之任一核糖核酸。在一些實施例中，至少一種核糖核酸包含tracrRNA。在一些實施例中，至少一種核糖核酸包含CRISPR RNA (crRNA)。在一些實施例中，單一核糖核酸包含將Cas蛋白引導至細胞中靶多核苷酸序列之靶基元且與其雜交之引導RNA。在一些實施例中，至少一種核糖核酸包含將Cas蛋白引導至細胞中靶多核苷酸序列之靶基元且與其雜交之引導RNA。在一些實施例中，一至兩種核糖核酸中之兩者包含將Cas蛋白引導至細胞中靶多核苷酸序列之靶基元且與其雜交之引導RNA。本揭示案之核糖核酸可經選擇以與多種不同之靶基元雜交，此端視所採用之具體CRISPR/Cas系統及靶多核苷酸之序列而定，如熟習此項技術者應瞭解。一至兩種核糖核酸亦可經選擇以最小化與除靶多核苷酸序列外之核酸序列之雜交。在一些實施例中，一至兩種核糖核酸與與細胞中之所有其他基因體核苷酸序列相比含有至少兩個錯配之靶基元雜交。在一些實施例中，一至兩種核糖核酸與與細胞中之所有其他基因體核苷酸序列相比含有至少一個錯配之靶基元雜交。在一些實施例中，一至兩種核糖核酸經設計以與緊鄰由Cas蛋白識別之去氧核糖核酸基元之靶基元雜交。在一些實施例中，一至兩種核糖核酸中之每一者經設計以與緊鄰由Cas蛋白識別之去氧核糖核酸基元之靶基元雜交，該等去氧核糖核酸基元側接位於靶基元之間的突變體對偶基因。

【1047】在一些實施例中，一至兩種核糖核酸中之每一者包含將Cas蛋白引導至細胞中靶多核苷酸序列之靶基元且與其雜交之引導RNA。

【1048】在一些實施例中，一或兩種核糖核酸(*例如*引導RNA)與靶多核苷酸序列同一股上之序列互補及/或雜交。在一些實施例中，一或兩種核糖核酸(*例如*引導RNA)與靶多核苷酸序列相對股上之序列互補及/或雜交。在一些實施例中，一或兩種核糖核酸(*例如*引導RNA)不與靶多核苷酸序列相對股上之序列互補及/或不與其雜交。在一些實施例中，一或兩種核糖核酸(*例如*引導RNA)與靶多核苷酸序列之重疊靶基元互補及/或雜交。在一些實施例中，一或兩種核糖核酸(*例如*引導RNA)與靶多核苷酸序列之偏移靶基元互補及/或雜交。

【1049】在一些實施例中，編碼Cas蛋白之核酸及編碼至少一至兩種核糖核酸之核酸經由病毒轉導(*例如*慢病毒轉導)引入細胞中。在一些實施例中，Cas蛋白與1-2種核糖核酸複合。在一些實施例中，Cas蛋白與兩種核糖核酸複合。在一些實施例中，Cas蛋白與一種核糖核酸複合。在一些實施例中，Cas蛋白由如本文所述之經修飾核酸(*例如*合成經修飾mRNA)編碼。

【1050】可用於本文所述之基於CRISPR/Cas之基因靶向之例示性gRNA序列提供於表15中。序列可參見於2016年5月9日提出申請之WO2016183041，該揭示內容(包括表、附錄及序列表)之全文皆以引用方式併入本文中。

表 15. 可用於靶向基因之例示性 gRNA 序列

基因名稱	SEQ ID NO:	WO2016183041
HLA-A	SEQ ID NO: 2-1418	表 8，附錄 1
HLA-B	SEQ ID NO: 1419-3277	表 9，附錄 2
HLA-C	SEQ ID NO:3278-5183	表 10，附錄 3
RFX-ANK	SEQ ID NO: 95636-102318	表 11，附錄 4
NFY-A	SEQ ID NO: 102319-121796	表 13，附錄 6
RFX5	SEQ ID NO: 85645-90115	表 16，附錄 9
RFX-AP	SEQ ID NO: 90116-95635	表 17，附錄 10
NFY-B	SEQ ID NO: 121797-135112	表 20，附錄 13
NFY-C	SEQ ID NO: 135113-176601	表 22，附錄 15
IRF1	SEQ ID NO: 176602-182813	表 23，附錄 16
TAP1	SEQ ID NO: 182814-188371	表 24，附錄 17
CIITA	SEQ ID NO:5184-36352	表 12，附錄 5
B2M	SEQ ID NO:81240-85644	表 15，附錄 8
NLRC5	SEQ ID NO:36353-81239	表 14，附錄 7
CD47	SEQ ID NO:200784-231885	表 29，附錄 22
HLA-E	SEQ ID NO:189859-193183	表 19，附錄 12
HLA-F	SEQ ID NO:688808-699754	表 45，附錄 38
HLA-G	SEQ ID NO:188372-189858	表 18，附錄 11
PD-L1	SEQ ID NO:193184-200783	表 21，附錄 14
基因名稱	SEQ ID NO:	US20160348073
TRAC	SEQ ID NO: 532-609 及 9102-9797	
TRB(亦為 TCRB 及 TRBC)	SEQ ID NO:610-765 及 9798-10532	

【1051】可用於本文所述之基於CRISPR/Cas之基因靶向之其他例示性gRNA序列提供於2021年5月19日提出申請之美國臨時專利申請案第63/190,685號及於2021年7月14日提出申請之美國臨時專利申請案第63/221,887號中，該等美國臨時專利申請案之揭示內容(包括表、附錄及序列表)之全文皆以引用方式併入本文中。

【1052】在一些實施例中，該技術之細胞係使用轉錄活化劑樣效應核酸酶(TALEN)方法製造。

【1053】「TALE核酸酶」(TALEN)預期係由通常衍生自轉錄活化劑樣效應物(TALE)之核酸結合結構域及裂解核酸靶序列之一個核酸酶催化結構域組成的融合蛋白。催化結構域較佳地係核酸酶結構域且更佳地係具有核酸內切酶活性之結構域，如例如I-TevI、ColE7、NucA及Fok-I。在多個實施例中，TALE結構域可融合至大範圍核酸酶，如例如I-CreI及I-OnuI或其功能變異體。在更佳實施例中，該核酸酶係單體TALE核酸酶。單體TALE核酸酶係不需要二聚化進行特異性識別及裂解之TALE核酸酶，例如WO2012138927中所述之經改造TAL重複與I-TevI催化結構域之融合物。轉錄活化劑樣效應物(TALE)係來自細菌物種黃單胞菌屬(Xanthomonas)之蛋白質，包含複數條重複序列，每一重複包含特異性針對核酸靶向序列之每一核苷酸鹼基之位置12及13之二殘基(RVD)。具有相似的模組鹼基對鹼基核酸結合性質(MBBBD)之結合結構域亦可衍生自最近由申請者在不同細菌物種中發現之新模組蛋白。新模組蛋白具有展示比TAL重複更多之序列可變性之優點。較佳地，與不同核苷酸之識別相關之RVD係用於識別C之HD、用於識別T之NG、用於識別A之NI、用於識別G或A之NN、用於識別A、C、G或T之NS、用於識別T之HG、用於識別T之IG、用於識別G之NK、用於識別C之HA、用於識別C之ND、用於識別C之HI、用於識別G之HN、用於識別

G之NA、用於識別G或A之SN及用於識別T之YG、用於識別A之TL、用於識別A或G之VT及用於識別A之SW。在另一實施例中，關鍵胺基酸12及13可突變成其他胺基酸殘基以調節其對核苷酸A、T、C及G之特異性且具體而言增強此特異性。TALEN套組在市面上有售。

【1054】在一些實施例中，細胞係使用鋅指核酸酶(ZFN)操縱。「鋅指結合蛋白」係因經由鋅離子之配位穩定蛋白質結構、較佳地以序列特異性方式結合DNA、RNA及/或蛋白質之蛋白質或多肽。術語鋅指結合蛋白通常縮寫為鋅指蛋白或ZFP。個別DNA結合結構域通常稱為「指」。ZFP具有至少一個指，通常兩個指、三個指或六個指。每一指結合二至四個DNA鹼基對，通常三個或四個DNA鹼基對。ZFP結合至核酸序列，稱為靶位點或靶區段。每一指通常包含約30個胺基酸之鋅螯合DNA結合子結構域。研究已展示，單一此類鋅指係由α螺旋組成，該α螺旋含有與鋅配位之兩個不變組胺酸殘基以及兩個單一β轉折半胱胺酸殘基(參見例如Berg及Shi, Science 271:1081-1085 (1996))。

【1055】在一些實施例中，本揭示案之細胞係使用歸巢核酸內切酶製造。該等歸巢核酸內切酶為此項技術中所熟知(Stoddard 2005)。歸巢核酸內切酶識別DNA靶序列且生成單股或雙股斷裂。歸巢核酸內切酶具有高特異性，識別長度介於12至45鹼基對(bp)範圍內、通常長度介於14至40 bp範圍內之DNA靶位點。該技術之歸巢核酸內切酶可

例如對應於LAGLIDADG核酸內切酶、HNH核酸內切酶或GIY-YIG核酸內切酶。本揭示案之較佳歸巢核酸內切酶可為I-CreI變異體。

【1056】在一些實施例中，該技術之細胞係使用大範圍核酸酶製造。根據定義，大範圍核酸酶係識別大序列之序列特異性核酸內切酶(Chevalier, B. S.及B. L. Stoddard, Nucleic Acids Res., 2001, 29, 3757-3774)。其可裂解活細胞中之獨特位點，由此使裂解位點附近之基因靶向增強1000倍或更大(Puchta等人，Nucleic Acids Res., 1993, 21, 5034-5040；Rouet等人，Mol. Cell. Biol., 1994, 14, 8096-8106；Choulika等人，Mol. Cell. Biol., 1995, 15, 1968-1973；Puchta等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 5055-5060；Sargent等人，Mol. Cell. Biol., 1997, 17, 267-77；Donoho等人，Mol. Cell. Biol, 1998, 18, 4070-4078；Elliott等人，Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 93-101；Cohen-Tannoudji等人，Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 1444-1448)。

【1057】在一些實施例中，該技術之細胞係使用RNA沈默或RNA干擾(RNAi)製造以敲低(*例如*減少、消除或抑制)多肽(例如耐受原性因子)之表現。有用的RNAi方法包括利用合成RNAi分子、短干擾RNA (siRNA)、PIWI相互作用NRA (piRNA)、短髮夾RNA (shRNA)、微小RNA (miRNA)之彼等方法及熟習此項技術者所意識到之其他瞬時敲低方法。用於RNAi之試劑(包括序列特異性shRNA、siRNA、miRNA及諸如此類)在市面上有售。例如，CIITA

可在多能幹細胞中藉由將CIITA siRNA引入細胞中或將CIITA shRNA表現病毒轉導至細胞中來敲低。在一些實施例中，RNA干擾用於減少或抑制選自由以下組成之群之至少一者之表現：CIITA、B2M、NLRC5、TCR-α及TCR-β。

【1058】在一些實施例中，本文所提供之細胞經遺傳修飾以減少一或多種免疫因子(包括靶多肽)之表現，以產生免疫特權或低免疫原性細胞。在某些實施例中，本文所揭示之細胞(*例如*幹細胞、誘導性多能幹細胞、分化細胞、造血幹細胞、原代T細胞及CAR-T細胞)包含減少一或多個靶多核苷酸之表現之一或多種遺傳修飾。該等靶多核苷酸及多肽之非限制性實例包括CIITA、B2M、NLRC5、CTLA-4、PD-1、HLA-A、HLA-BM、HLA-C、RFX-ANK、NFY-A、RFX5、RFX-AP、NFY-B、NFY-C、IRF1及TAP1。

【1059】在一些實施例中，遺傳修飾係使用CRISPR/Cas系統來進行。藉由調節(*例如*減少或缺失)一個或複數個靶多核苷酸之表現，該等細胞在植入接受個體中時展現減少的免疫活化。在一些實施例中，細胞視為低免疫原性，例如在投與後之接受個體或患者中。

A. 基因編輯系統

【1060】在一些實施例中，用於遺傳修飾細胞以敲除、敲低或以其他方式修飾一或多種基因之方法包括使用定點核酸酶，包括例如鋅指核酸酶(ZFN)、轉錄活化劑樣

效應核酸酶(TALEN)、大範圍核酸酶、轉座酶及成簇規則散佈之短迴文重複(CRISPR)/Cas系統以及此項技術中已知之切口酶系統、鹼基編輯系統、先導編輯系統及基因書寫系統。

1. ZFN

【1061】ZFN係包含位點特異性DNA結合結構域陣列之融合蛋白，該等位點特異性DNA結合結構域改編自連接至細菌FokI限制酶之核酸內切酶結構域之含有鋅指之轉錄因子。ZFN可具有一或多個(*例如*1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個或更多個) DNA結合結構域或鋅指結構域。參見例如Carroll等人，*Genetics Society of America* (2011) 188:773-782；Kim等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996) 93:1156-1160。免疫鋅指結構域係藉由一或多個鋅離子穩定之小蛋白質結構基元且通常識別3至4 bp DNA序列。因此，串聯結構域可潛在地結合至在細胞基因體內獨特之延長之核苷酸序列。

【1062】已知特異性之各種鋅指可組合產生識別約6 bp、9 bp、12 bp、15 bp或18 bp序列之多指多肽。多種選擇及模組組裝技術可用於生成識別特定序列之鋅指(及其組合)，包括噬菌體展示、酵母單雜交系統、細菌單雜交及雙雜交系統及哺乳動物細胞。鋅指可經改造以結合預定核酸序列。改造鋅指以結合至預定核酸序列之標準為此項技術中已知。參見例如Sera等人，*Biochemistry* (2002)

41:7074-7081；Liu等人，*Bioinformatics* (2008) 24:1850-1857。

【1063】含有FokI核酸酶結構域或其他二聚體核酸酶結構域之ZFN作為二聚體發揮功能。因此，一對ZFN為靶向非迴文DNA位點所必需。兩個個別ZFN必須結合DNA之相對股且其核酸酶適當間隔開。參見Bitinaite等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95:10570-10575。為裂解基因體中之特定位點，一對ZFN經設計以識別側接位點之兩條序列，一條在正向股上且另一條在反向股上。結合位點任一側之ZFN後，核酸酶結構域二聚化且裂解位點處之DNA，從而生成具有5′懸突之DSB。然後可在含有側接有同源臂之期望突變之修復模板的幫助下利用HDR引入特定突變。修復模板通常係引入細胞中之外源雙股DNA載體。參見Miller等人，*Nat. Biotechnol.* (2011) 29:143-148；Hockemeyer等人，*Nat. Biotechnol.* (2011) 29:731-734。

2. TALEN

【1064】TALEN係可用於編輯靶基因之人工核酸酶之另一實例。TALEN衍生自DNA結合結構域，稱為TALE重複，其通常包含結合並識別延長DNA序列之具有10至30個重複之串聯陣列。每一重複之長度為33至35個胺基酸，鄰近兩個胺基酸(稱為重複可變二殘基或RVD)賦予針對四個DNA鹼基對中之一者之特異性。因此，在靶DNA序列中之重複與鹼基對之間存在一一對應性。

【1065】TALEN係以人工方式藉由將一或多個TALE DNA結合結構域(*例如*1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個或更多個)融合至核酸酶結構域(例如FokI核酸內切酶結構域)來產生。參見Zhang, *Nature Biotech.* (2011) 29:149-153。已對FokI製造若干突變以將其用於TALEN中；該等突變例如改良裂解特異性或活性。參見Cermak等人，*Nucl. Acids Res.* (2011) 39:e82；Miller等人，*Nature Biotech.* (2011) 29:143-148；Hockemeyer等人，*Nature Biotech.* (2011) 29:731-734；Wood等人，*Science* (2011) 333:307；Doyon等人，*Nature Methods* (2010) 8:74-79；Szczepek等人，*Nature Biotech* (2007) 25:786-793；Guo等人，*J. Mol. Biol.* (2010) 200:96。FokI結構域作為二聚體發揮功能，需要具有獨特DNA結合結構域之兩種構築體，用於靶基因體中具有適當取向及間距之位點。TALE DNA結合結構域與FokI核酸酶結構域之間的胺基酸殘基數及兩個個別TALEN結合位點之間的鹼基數似乎係達成高活性水準之重要參數。Miller等人，*Nature Biotech.* (2011) 29:143-148。

【1066】藉由組合經改造之TALE重複與核酸酶結構域，可產生特異性針對任一期望DNA序列之位點特異性核酸酶。與ZFN相似，可將TALEN引入細胞中以在基因體中之期望靶位點處生成DSB，且因此可用於在相似之HDR介導之路徑中敲除基因或敲入突變。參見Boch, *Nature Biotech.* (2011) 29:135-136；Boch等人，*Science* (2009)

326:1509-1512；Moscou等人，*Science* (2009) 326:3501。

3. 大範圍核酸酶

【1067】大範圍核酸酶係核酸內切酶家族中特徵在於其識別並切割大DNA序列(14至40個鹼基對)之能力之酶。大範圍核酸酶基於其影響核酸酶活性及/或DNA識別之結構基元分成多個家族。最廣泛且最著名之大範圍核酸酶係LAGLIDADG家族中之蛋白質，其名稱來源於保守胺基酸序列。參見Chevalier等人，*Nucleic Acids Res.* (2001) 29(18): 3757-3774。另一方面，GIY-YIG家族成員具有GIY-YIG模組，其長70-100個殘基且包括四個或五個保守序列基元及四個不變殘基，其中之兩者為活性所必需。參見Van Roey等人，*Nature Struct. Biol.* (2002) 9:806-811。His-Cys家族大範圍核酸酶之特徵在於涵蓋幾百個胺基酸殘基之區域內之一系列高度保守之組胺酸及半胱胺酸。參見Chevalier等人，*Nucleic Acids Res.*(2001) 29(18):3757-3774。NHN家族之成員定義為含有由天冬醯胺殘基包圍之兩對保守組胺酸之基元。參見Chevalier等人，*Nucleic Acids Res.*(2001) 29(18):3757-3774。

【1068】由於鑑別出用於特定靶DNA序列之天然大範圍核酸酶之機會因高特異性需要而較低，故已使用多種方法(包括誘變及高通量篩選方法)來產生識別獨特序列之大範圍核酸酶變異體。用於改造具有改變的DNA結合特異性(例如以結合至預定核酸序列)之大範圍核酸酶之策略為此

項技術中已知。參見例如Chevalier等人，*Mol. Cell.* (2002) 10:895-905；Epinat等人，*Nucleic Acids Res* (2003) 31:2952-2962；Silva等人，*J Mol. Biol.* (2006) 361:744-754；Seligman等人，*Nucleic Acids Res* (2002) 30:3870-3879；Sussman等人，*J Mol Biol* (2004) 342:31-41；Doyon等人，*J Am Chem Soc* (2006) 128:2477-2484；Chen等人，*Protein Eng Des Sel* (2009) 22:249-256；Arnould等人，*J Mol Biol.* (2006) 355:443-458；Smith等人，*Nucleic Acids Res.* (2006) 363(2):283-294。

【1069】與ZFN及TALEN一樣，大範圍核酸酶可在基因體DNA中產生DSB，該等DSB若修復不當(例如經由NHEJ)則可產生框移突變，從而導致細胞中靶基因之表現減少。替代地，可將外源DNA與大範圍核酸酶一起引入細胞中。端視外源DNA序列及染色體序列，此過程可用於修飾靶基因。參見Silva等人，*Current Gene Therapy* (2011) 11:11-27。

4. 轉座酶

【1070】轉座酶係結合至轉座子末端且藉由切割及黏貼機制或複製轉座機制催化其移動至基因體另一部分之酶。藉由將轉座酶連接至其他系統(例如CRISPER/Cas系統)，可開發出新的基因編輯工具來實現基因體DNA之位點特異性插入或操縱。存在兩種已知之使用轉座子之DNA整合方法，其使用催化無活性之Cas效應蛋白及Tn7樣轉座

子。轉座酶依賴性DNA整合不會在基因體中引起DSB，此可保證更安全且更特異之DNA整合。

5. CRISPR/Cas系統

【1071】CRISPR系統最初係在原核生物體(*例如*細菌及古菌)中發現，作為參與防禦入侵之噬菌體及質體之系統，其提供獲得性免疫形式。現其已經改編且在研究及臨床應用中用作流行的基因編輯工具。

【1072】CRISPR/Cas系統通常包含至少兩種組分：一或多種引導RNA (gRNA)及Cas蛋白。Cas蛋白係將DSB引入靶位點中之核酸酶。CRISPR-Cas系統分成兩大類：1類系統使用多種Cas蛋白之複合物來降解核酸；2類系統使用單一大Cas蛋白用於相同之目的。1類分成I型、III型及IV型；2類分成II型、V型及VI型。適用於基因編輯應用之不同Cas蛋白包括(但不限於) Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a (Cpf1)、Cas12b (C2c1)、Cas12c (C2c3)、Cas12d (CasY)、Cas12e (CasX)、Cas12f (C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k (C2c5)、Cas13、Cas13a (C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3及Mad7。最廣泛使用之Cas9在本文中闡述為說明性。該等Cas蛋白可源自不同的來源物種。舉例而言，Cas9可衍生自*釀膿鏈球菌(S. pyogenes)*或 *金黃色葡萄*

球菌(S. aureus)。

【1073】在原始微生物基因體中，II型CRISPR系統將入侵DNA之序列納入在宿主基因體內編碼為陣列之CRISPR重複序列之間。來自CRISPR重複陣列之轉錄物處理成CRISPR RNA (crRNA)，其各自具有自入侵DNA轉錄之可變序列，稱為「前間隔體」序列，以及CRISPR重複之一部分。每一crRNA與第二種反式活化CRISPR RNA (tracrRNA)雜交，且該兩種RNA與Cas9核酸酶形成複合物。crRNA之前間隔體編碼部分引導Cas9複合物裂解互補靶DNA序列，條件係其鄰近稱為「前間隔體鄰近基元」(PAM)之短序列。

【1074】自從其發現，CRISPR系統已適用於在自細菌跨越真核細胞(包括人類細胞)之寬範圍之細胞及生物體中誘導序列特異性DSB及靶向基因體編輯。在其用於基因編輯應用時，經人工設計之合成gRNA已替代原始crRNA:tracrRNA複合物。舉例而言，gRNA可為由crRNA、四環及tracrRNA構成之單一引導RNA (sgRNA)。crRNA通常包含經使用者設計以識別所關注靶DNA之互補區(亦稱為間隔體，長度通常為約20個核苷酸)。tracrRNA序列包含用於Cas核酸酶結合之支架區。crRNA序列及tracrRNA序列藉由四環連接且各自具有用於彼此雜交之短重複序列，由此生成嵌合sgRNA。吾人可藉由簡單地改變存在於gRNA中之間隔體或互補區序列來改變Cas核酸酶之基因體靶。互補區經由標準RNA-DNA互補鹼基對規則將

Cas核酸酶引導至靶DNA位點。

【1075】為使Cas核酸酶發揮功能，PAM必須緊鄰基因體DNA中靶序列之下游。認為Cas蛋白對PAM之識別會使鄰近基因體序列去穩定，此允許gRNA對序列進行詢問且在存在匹配序列時進行gRNA-DNA配對。PAM之特定序列端視Cas基因之種類而變化。舉例而言，衍生自*釀膿鏈球菌*之最常用Cas9核酸酶識別5'-NGG-3'之PAM序列，或以較低之效率識別5'-NAG-3'，其中「N」可為任一核苷酸。具有替代PAM之其他Cas核酸酶變異體亦已表徵且成功地用於基因體編輯，該等Cas核酸酶變異體匯總於下**表19**中。

表19. 例示性Cas核酸酶變異體及其PAM序列

RISPR核酸酶	源生物體	PAM序列(5'→3')
SpCas9	*釀膿鏈球菌(Streptococcus pyogenes)*	NGG或NAG
SaCas9	*金黃色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)*	GRRT或NGRRN
NmeCas9	*腦膜炎雙球菌(Neisseria meningitidis)*	NNNNGATT
CjCas9	*空腸彎曲桿菌(Campylobacter jejuni)*	NNNNRYAC
StCas9	*嗜熱鏈球菌(Streptococcus thermophilus)*	NNAGAAW
TdCas9	*齒垢密螺旋體(Treponema denticola)*	NAAAAC
LbCas12a (Cpf1)	*毛螺旋菌科(Lachnospiraceae)細菌*	TTTV
AsCas12a (Cpf1)	*胺基酸球菌屬(Acidaminococcus sp.)*	TTTV
AacCas12b	*嗜酸脂環桿菌(Alicyclobacillus acidiphilus)*	TTN
BhCas12b v4	*外村尚芽孢桿菌(Bacillus hisashii)*	ATTN、TTTN或GTTN

R=A或G；Y=C或T；W=A或T；V=A或C或G；N=任一鹼基

【1076】在一些實施例中，Cas核酸酶可包含一或多個突變以改變其活性、特異性、識別及/或其他特徵。舉例而言，Cas核酸酶可具有改變其保真度以減輕脫靶效應之一或多個突變(*例如*SpCas9之eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9及evoSpCas9高保真度變異體)。對於另一實例，Cas核酸酶可具有改變其PAM特異性之一或多個突變。

6. 切口酶

【1077】Cas核酸酶、具體而言Cas9核酸酶之核酸酶結構域可經獨立突變以生成酶，稱為DNA「切口酶」。切口酶能夠引入具有與規則的CRISPR/Cas核酸酶系統(包括例如CRISPR/Cas9)相同之特異性之單股切口。切口酶可用於生成可用於基因編輯系統中之雙股斷裂(Mali等人，*Nat Biotech*, 31(9):833-838 (2013)；Mali等人，*Nature Methods*, 10:957-963 (2013)；Mali等人，*Science*, 339(6121):823-826 (2013))。在一些情況下，當使用兩種Cas切口酶時，在每一裂解端而非鈍端產生長懸突，此允許對精確基因整合及插入之額外控制(Mali等人，*Nat Biotech*, 31(9):833-838 (2013)；Mali等人，*Nature Methods*, 10:957-963 (2013)；Mali等人，*Science*, 339(6121):823-826 (2013))。由於兩種切割Cas酶必須有效地切割其靶DNA，配對切口酶可具有與基於Cas之雙股裂解系統相比較低之脫靶效應(Ran等人，*Cell*, 155(2):479-

480(2013)；Mali等人，*Nat Biotech*, 31(9):833-838 (2013)；Mali等人，*Nature Methods*, 10:957-963 (2013)；Mali等人，*Science*, 339(6121):823-826 (2013))。

【1078】先導編輯係通用且精確之基因體編輯方法，其使用融合至經改造反轉錄酶之催化受損之Cas9核酸內切酶將新遺傳資訊直接寫入指定DNA位點中，用指定靶位點且編碼期望編輯之先導編輯引導RNA (pegRNA)程式化。參見例如Anzalone等人，Nature, 576:149-157 (2019)；WO2021072328；WO2022067130，所有該等文獻之全文皆以引用方式併入本文中。亦可使用Cas9及反轉錄酶將整合酶位點插入基因體中，以在稱為可程式化添加之過程中經由位點特異性靶向元件(PASTE)編輯插入所關注核酸。參見例如Ioannidi等人，bioRxiv 2021.11.01.466786；doi.org/10.1101/2021.11.01.466786。

CC. 重組表現耐受原性因子及/或嵌合抗原受體之方法

【1079】對於所有該等技術，使用熟知之重組技術，以生成如本文所概述之重組核酸。在某些實施例中，編碼耐受原性因子或嵌合抗原受體之重組核酸可在表現構築體中可操作連接至一或多條調控核苷酸序列。調控核苷酸序列通常將適用於欲治療之宿主細胞及接受個體。對於多種宿主細胞，多種類型之適當表現載體及適宜調控序列為此項技術中已知。通常，一或多條調控核苷酸序列可包括(但不限於)啟動子序列、前導序列或信號序列、核糖體結

合位點、轉錄起始及終止序列、轉譯起始及終止序列及增強子或活化劑序列。亦涵蓋如此項技術中已知之組成型或可誘導啟動子。啟動子可為天然啟動子、組合一種以上之啟動子之元件之雜合啟動子或合成啟動子。表現構築體可存在於細胞中之游離基因體(例如質體)上，或表現構築體可插入染色體中，例如基因座中。在一些實施例中，表現載體包括可選擇標記物基因以允許選擇經轉型之宿主細胞。一些實施例包括包含編碼變異體多肽之核苷酸序列之表現載體，該核苷酸序列可操作連接至至少一條調控序列。本文所用之調控序列包括啟動子、增強子及其他表現控制元件。在一些實施例中，表現載體經設計用於選擇欲轉型之宿主細胞、期望表現之特定變異體多肽、載體之拷貝數、控制該拷貝數之能力及/或表現由載體編碼之任何其他蛋白質，例如抗生素標記物。

【1080】適宜哺乳動物啟動子之實例包括例如來自以下基因之啟動子：延伸因子1 α (EF1α)啟動子、CAG啟動子、倉鼠泛素/S27a啟動子(WO 97/15664)、猿猴空泡病毒40 (SV40)早期啟動子、腺病毒主要晚期啟動子、小鼠金屬硫蛋白-I啟動子、勞斯肉瘤病毒(RSV)長末端重複區域、小鼠乳瘤病毒啟動子(MMTV)、莫洛尼鼠類白血病病毒長末端重複區域及人類巨細胞病毒(CMV)早期啟動子。其他異源哺乳動物啟動子之實例係肌動蛋白/免疫球蛋白或熱休克啟動子。在其他實施例中，哺乳動物宿主細胞中所用之啟動子可自諸如以下之病毒之基因體獲得：多瘤病毒、

雞痘病毒(於1989年7月5日公開之UK 2,211,504)、牛乳頭瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨細胞病毒、反轉錄病毒、B型肝炎病毒及猿猴病毒40 (SV40)。在其他實施例中，使用異源哺乳動物啟動子。實例包括肌動蛋白啟動子、免疫球蛋白啟動子及熱休克啟動子。SV40之早期及晚期啟動子方便地以亦含有SV40病毒複製起點之SV40限制片段獲得(Fiers等人，Nature 273: 113-120 (1978))。人類巨細胞病毒之立即早期啟動子方便地以HindIII限制酶片段獲得(Greenaway等人，Gene 18: 355-360 (1982))。前述參考文獻之全文皆以引用方式併入。

【1081】在一些實施例中，表現載體係雙順反子或多順反子表現載體。雙順反子或多順反子表現載體可包括(1)融合至每一開放閱讀框之多個啟動子；(2)將剪接信號插入基因之間；(3)表現由單一啟動子驅動之基因之融合物；及(4)將蛋白水解裂解位點插入基因之間(自裂解肽)或將內部核糖體進入位點 (IRES)插入基因之間。

【1082】將本文所述之多核苷酸引入細胞中之過程可藉由任一適宜技術來達成。適宜技術包括磷酸鈣或脂質介導之轉染、電穿孔、促融劑及使用病毒載體轉導或感染。在一些實施例中，多核苷酸經由病毒轉導 (*例如*AAV轉導、慢病毒轉導)引入細胞中或以其他方式遞送於病毒載體上(*例如*促融劑介導之遞送)。在一些實施例中，經由選自由以下組成之群之促融劑介導之遞送或轉座酶系統將多核苷酸引入細胞中：條件或可誘導轉座酶、條件或可誘導

PiggyBac轉座子、條件或可誘導睡美人(SB11)轉座子、條件或可誘導Mos1轉座子及條件或可誘導Tol2轉座子。

【1083】在一些實施例中，本文所提供之細胞經遺傳修飾以包括插入低免疫原性細胞之一或多個基因體基因座中之一或多個外源多核苷酸。在一些實施例中，外源多核苷酸編碼所關注蛋白質，例如嵌合抗原受體。可使用任一適宜方法將外源多核苷酸插入低免疫原性細胞之基因體基因座中，包括本文所述之基因編輯方法(*例如*CRISPR/Cas系統)。在一些實施例中，使用病毒轉導(例如使用載體)將外源多核苷酸插入細胞之至少一個對偶基因中。在一些實施例中，載體係攜載外源多核苷酸之假型化自失活慢病毒載體。在一些實施例中，載體係經水疱性口炎病毒VSV-G包膜假型化且攜載外源多核苷酸之自失活慢病毒載體。在一些實施例中，使用病毒轉導將外源多核苷酸插入細胞之至少一個對偶基因中。在一些實施例中，使用基於慢病毒之病毒載體將外源多核苷酸插入細胞之至少一個對偶基因中。

【1084】與通常涉及活化細胞(例如活化T細胞，*例如*$CD8^+$ T細胞)之將本文所述之多核苷酸引入細胞中之某些方法不同，可利用適宜技術將多核苷酸引入非活化T細胞中。適宜技術包括(但不限於)使用可結合或可不結合至珠粒之結合至CD3、CD8及/或CD28之一或多種抗體或其片段或部分(*例如*scFv及VHH)活化T細胞，例如$CD8^+$ T細胞。令人驚奇的是，促融劑介導之將多核苷酸引入T細胞

中係在先前尚未與一或多種活化抗體或其片段或部分(*例如*CD3、CD8及/或CD28)接觸之非活化T細胞(*例如*$CD8^+$ T細胞)中實施。在一些實施例中，促融劑介導之將多核苷酸引入T細胞中係在活體內實施(*例如*在將T細胞投與個體後)。在其他實施例中，促融劑介導之將多核苷酸引入T細胞中係在活體外實施(*例如*在將T細胞投與個體之前)。

【1085】本文提供非活化T細胞，其包含相對於野生型T細胞HLA-A、HLA-B、HLA-C、CIITA、TCR-α及/或TCR-β之可調控減少的表現，其中非活化T細胞進一步包含編碼一或多種可調控耐受原性因子之第一外源多核苷酸。

【1086】在一些實施例中，非活化T細胞尚未用抗CD3抗體、抗CD28抗體、T細胞活化細胞介素或可溶性T細胞共刺激分子處理。在一些實施例中，非活化T細胞並不表現活化標記物。在一些實施例中，非活化T細胞表現CD3及CD28，且其中CD3及/或CD28無活性。

【1087】在一些實施例中，抗CD3抗體係OKT3。在一些實施例中，抗CD28抗體係CD28.2。在一些實施例中，T細胞活化細胞介素選自由IL-2、IL-7、IL-15及IL-21組成之T細胞活化細胞介素之群。在一些實施例中，可溶性T細胞共刺激分子選自由抗CD28抗體、抗CD80抗體、抗CD86抗體、抗CD137L抗體及抗ICOS-L抗體組成之可溶性T細胞共刺激分子之群。

【1088】在一些實施例中，非活化T細胞係原代T細

胞。在其他實施例中，非活化T細胞係自本揭示案之低免疫原性細胞分化而來。在一些實施例中，T細胞係$CD8^+$ T細胞。

【1089】在一些實施例中，非活化T細胞進一步包含編碼可調控嵌合抗原受體(CAR)之第二外源多核苷酸。在一些實施例中，CAR選自由CD19特異性CAR及CD22特異性CAR組成之群。

【1090】在一些實施例中，第一及/或第二外源多核苷酸係由病毒載體(包括慢病毒載體)攜載。在一些實施例中，第一及/或第二外源多核苷酸係由包含CD8結合劑之慢病毒載體攜載。在一些實施例中，使用選自由以下組成之群之促融劑介導之遞送或轉座酶系統將第一及/或第二外源多核苷酸引入細胞中：條件或可誘導轉座酶、條件或可誘導PiggyBac轉座子、條件或可誘導睡美人(SB11)轉座子、條件或可誘導Mos1轉座子及條件或可誘導Tol2轉座子。

【1091】在一些實施例中，非活化T細胞進一步包含編碼CD47之第二外源多核苷酸。在一些實施例中，第一及/或第二外源多核苷酸插入T細胞之至少一個對偶基因之特定基因座中。在一些實施例中，特定基因座選自由以下組成之群：安全港基因座或靶基因座、*B2M*基因座、*CIITA*基因座、*TRAC*基因座及*TRB*基因座。在一些實施例中，編碼CD47之第二外源多核苷酸插入選自由以下組成之群之特定基因座中：安全港或靶基因座、靶基因座、

B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座及TRB基因座。在一些實施例中，編碼CAR之第一外源多核苷酸插入選自由以下組成之群之特定基因座中：安全港基因座、靶基因座、*B2M*基因座、*CIITA*基因座、*TRAC*基因座及*TRB*基因座。在一些實施例中，編碼CD47之第一外源多核苷酸插入選自由以下組成之群之特定基因座中：安全港基因座、靶基因座、*B2M*基因座、*CIITA*基因座、*TRAC*基因座及*TRB*基因座。在一些實施例中，編碼CAR之第二外源多核苷酸及編碼CD47之第一外源多核苷酸插入不同基因座中。在一些實施例中，編碼CAR之第二外源多核苷酸及編碼一或多種耐受原性因子之第一外源多核苷酸插入同一基因座中。在一些實施例中，編碼CAR之第二外源多核苷酸及編碼一或多種耐受原性因子之第一外源多核苷酸插入*B2M*基因座中。在一些實施例中，編碼CAR之第二外源多核苷酸及編碼一或多種耐受原性因子之第一外源多核苷酸插入*CIITA*基因座中。在一些實施例中，編碼CAR之第二外源多核苷酸及編碼一或多種耐受原性因子之第一外源多核苷酸插入*TRAC*基因座中。在一些實施例中，編碼CAR之第二外源多核苷酸及編碼一或多種耐受原性因子之第一外源多核苷酸插入*TRB*基因座中。在一些實施例中，編碼CAR之第二外源多核苷酸及編碼一或多種耐受原性因子之第一外源多核苷酸插入安全港或靶基因座中。在一些實施例中，安全港或靶基因座選自由以下組成之群：CCR5基因座、CXCR4基因座、PPP1R12C基因座、白蛋白基因

座、SHS231基因座、CLYBL基因座、Rosa基因座、F3(CD142)基因座、MICA基因座、MICB基因座、LRP1(CD91)基因座、HMGB1基因座、ABO基因座、RHD基因座、FUT1基因座及KDM5D基因座。

【1092】在一些實施例中，非活化T細胞並不表現HLA-A、HLA-B及/或HLA-C抗原。在一些實施例中，非活化T細胞並不表現B2M。在一些實施例中，非活化T細胞並不表現HLA-DP、HLA-DQ及/或HLA-DR抗原。在一些實施例中，非活化T細胞並不表現CIITA。在一些實施例中，非活化T細胞並不表現TCR-α。在一些實施例中，非活化T細胞並不表現TCR-β。在一些實施例中，非活化T細胞並不表現TCR-α及TCR-β。

【1093】在一些實施例中，非活化T細胞係$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*TRAC*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及/或編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，使用病毒轉導將第一及/或第二外源多核苷酸插入細胞之至少一個對偶基因中。在一些實施例中，使用基於慢病毒之病毒載體將第一及/或第二外源多核苷酸插入細胞之至少一個對偶基因中。在一些實施例中，非活化T細胞係$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*TRAC*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，非活化T細胞係$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、

CIITA$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*TRB*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及/或編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，非活化T細胞係*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*TRB*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，非活化T細胞係*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*B2M*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及/或編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，非活化T細胞係*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*B2M*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，非活化T細胞係*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*CIITA*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及/或編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，非活化T細胞係*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRAC*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*CIITA*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及編碼CAR之第二可調控基因。

【1094】在一些實施例中，非活化T細胞係*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRB*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*TRAC*基因座中之編碼一或多種耐受原

性因子之第一可調控基因及/或編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，非活化T細胞係*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRB*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*TRAC*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，非活化T細胞係*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRB*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*TRB*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及/或編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，非活化T細胞係*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRB*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*TRB*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，非活化T細胞係*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRB*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*B2M*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及/或編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，非活化T細胞係*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRB*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*B2M*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，非活化T細胞係*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRB*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*CIITA*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及/或編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，非活化T細胞係*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRB*$^{插入缺失/插入缺失}$細

胞，其包含插入*CIITA*基因座中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及編碼CAR之第二可調控基因。

【1095】本文提供經改造T細胞，其包含相對於野生型T細胞HLA-A、HLA-B、HLA-C、CIITA、TCR-α及/或TCR-β之可調控減少的表現，其中經改造T細胞進一步包含由包含CD8結合劑之慢病毒載體攜載之編碼一或多種可調控耐受原性因子之第一外源多核苷酸。

【1096】在一些實施例中，經改造T細胞係原代T細胞。在其他實施例中，經改造T細胞係自本揭示案之低免疫原性細胞分化而來。在一些實施例中，T細胞係$CD8^+$ T細胞。在一些實施例中，T細胞係$CD4^+$ T細胞。

【1097】在一些實施例中，經改造T細胞並不表現活化標記物。在一些實施例中，經改造T細胞表現CD3及CD28，且其中CD3及/或CD28無活性。

【1098】在一些實施例中，經改造T細胞尚未用抗CD3抗體、抗CD28抗體、T細胞活化細胞介素或可溶性T細胞共刺激分子處理。在一些實施例中，抗CD3抗體係OKT3，其中抗CD28抗體係CD28.2，其中T細胞活化細胞介素選自由IL-2、IL-7、IL-15及IL-21組成之T細胞活化細胞介素之群，且其中可溶性T細胞共刺激分子選自由抗CD28抗體、抗CD80抗體、抗CD86抗體、抗CD137L抗體及抗ICOS-L抗體組成之可溶性T細胞共刺激分子之群。在一些實施例中，經改造T細胞尚未用一或多種選自由以下組成之群之T細胞活化細胞介素治療：IL-2、IL-7、IL-15

及IL-21。在一些情況下，細胞介素係IL-2。在一些實施例中，一或多種細胞介素係IL-2及選自由IL-7、IL-15及IL-21組成之群之另一種。

【1099】在一些實施例中，非活化T細胞進一步包含編碼可調控嵌合抗原受體(CAR)之第二外源多核苷酸。在一些實施例中，CAR選自由CD19特異性CAR及CD22特異性CAR組成之群。

【1100】在一些實施例中，經改造T細胞進一步包含編碼可調控嵌合抗原受體(CAR)之第二外源多核苷酸。在一些實施例中，第一及/或第二外源多核苷酸插入T細胞之至少一個對偶基因之特定基因座中。在一些實施例中，特定基因座選自由以下組成之群：安全港基因座、靶基因座、*B2M*基因座、*CIITA*基因座、*TRAC*基因座及*TRB*基因座。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因插入選自由以下組成之群之特定基因座中：安全港基因座、靶基因座、*B2M*基因座、*CIITA*基因座、*TRAC*基因座及*TRB*基因座。在一些實施例中，編碼CAR之第二可調控基因插入選自由以下組成之群之特定基因座中：安全港基因座、靶基因座、*B2M*基因座、*CIITA*基因座、*TRAC*基因座及*TRB*基因座。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及編碼CAR之第二可調控基因插入不同基因座中。在一些實施例中，編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及編碼CAR之第二可調控基因插入同一基因座中。在一些實施例中，編碼一

或多種耐受原性因子之第一可調控基因及編碼CAR之第二可調控基因插入*B2M*基因座、*CIITA*基因座、*TRAC*基因座、*TRB*基因座或安全港或靶基因座中。在一些實施例中，安全港或靶基因座選自由以下組成之群：CCR5基因座、CXCR4基因座、PPP1R12C基因座、白蛋白基因座、SHS231基因座、CLYBL基因座、Rosa基因座、F3 (CD142)基因座、MICA基因座、MICB基因座、LRP1 (CD91)基因座、HMGB1基因座、ABO基因座、RHD基因座、FUT1基因座及KDM5D基因座。

【1101】在一些實施例中，CAR選自由CD19特異性CAR及CD22特異性CAR組成之群。在一些實施例中，CAR係CD19特異性CAR。在一些實施例中，CAR係CD22特異性CAR。在一些實施例中，CAR包含結合至選自由以下組成之群之任一者之抗原結合結構域：CD19、CD22、CD38、CD123、CD138及BCMA。

【1102】在一些實施例中，經改造T細胞並不表現HLA-A、HLA-B及/或HLA-C抗原，其中經改造T細胞並不表現B2M，其中經改造T細胞並不表現HLA-DP、HLA-DQ及/或HLA-DR抗原，其中經改造T細胞並不表現CIITA，及/或其中經改造T細胞並不表現TCR-α及TCR-β。

【1103】在一些實施例中，經改造T細胞係$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、$TRAC^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*TRAC*基因座、插入*TRB*基因座、插入*B2M*基因座或插入*CIITA*基因座中之編碼一或多種耐受原

性因子之第一可調控基因及/或編碼CAR之第二可調控基因。在一些實施例中，經改造T細胞係*B2M*$^{插入缺失/插入缺失}$、*CIITA*$^{插入缺失/插入缺失}$、*TRB*$^{插入缺失/插入缺失}$細胞，其包含插入*TRAC*基因座、插入*TRB*基因座、插入*B2M*基因座或插入*CIITA*基因座*中之編碼一或多種耐受原性因子之第一可調控基因及/或編碼CAR之第二可調控基因*。

【1104】在一些實施例中，本揭示案之非活化T細胞及/或經改造T細胞處於個體中。在其他實施例中，本揭示案之非活化T細胞及/或經改造T細胞在活體外。

【1105】在一些實施例中，本揭示案之非活化T細胞及/或經改造T細胞表現CD8結合劑。在一些實施例中，CD8結合劑係抗CD8抗體。在一些實施例中，抗CD8抗體選自由以下組成之群：小鼠抗CD8抗體、兔抗CD8抗體、人類抗CD8抗體、人類化抗CD8抗體、駱駝科(*例如*美洲駝、羊駝、駱駝)抗CD8抗體及其片段。在一些實施例中，其片段係scFv或VHH。在一些實施例中，CD8結合劑結合至CD8 α鏈及/或CD8 β鏈。

【1106】在一些實施例中，CD8結合劑融合至納入病毒包膜中之跨膜結構域。在一些實施例中，慢病毒載體經病毒融合蛋白假型化。在一些實施例中，病毒融合蛋白包含一或多種修飾以減少與其天然受體之結合。

【1107】在一些實施例中，病毒融合蛋白融合至CD8結合劑。在一些實施例中，病毒融合蛋白包含融合至CD8結合劑之立百病毒F糖蛋白及立百病毒G糖蛋白。在一些

實施例中，慢病毒載體不包含T細胞活化分子或T細胞共刺激分子。在一些實施例中，慢病毒載體編碼第一外源多核苷酸及/或第二外源多核苷酸。

【1108】在一些實施例中，在轉移至第一個體中後，非活化T細胞或經改造T細胞展現一或多種選自由以下組成之群之反應：(a)T細胞反應，(b)NK細胞反應，及(c)巨噬細胞反應，該等反應與轉移至第二個體中後之野生型細胞相比降低。在一些實施例中，第一個體及第二個體係不同個體。在一些實施例中，巨噬細胞反應係吞噬。

【1109】在一些實施例中，在轉移至個體中後，非活化T細胞或經改造T細胞展現選自由以下組成之群之一或多者：與轉移至個體中後之野生型細胞相比，(a)個體中減少的TH1活化，(b)個體中減少的NK細胞殺傷，及(c)個體中減少的完整PBMC殺傷。

【1110】在一些實施例中，在轉移至個體中後，非活化T細胞或經改造T細胞引發選自由以下組成之群之一或多者：與轉移至個體中後之野生型細胞相比，(a)個體中減少的供體特異性抗體，(b)個體中減少的IgM或IgG抗體，及(c)個體中減小的補體依賴性細胞毒性(CDC)。

【1111】在一些實施例中，在個體內用包含CD8結合劑之慢病毒載體轉導非活化T細胞或經改造T細胞。在一些實施例中，慢病毒載體攜載編碼CAR及/或CD47之基因。

【1112】在一些實施例中，在轉移至第一個體中後，本文所述之細胞展現一或多種選自由以下組成之群之反

應：(a)T細胞反應，(b)NK細胞反應，及(c)巨噬細胞反應，該等反應與轉移至第二個體中後之野生型細胞相比降低。在一些實施例中，第一個體及第二個體係不同個體。在一些實施例中，巨噬細胞反應係吞噬。

【1113】在一些實施例中，在轉移至個體中後，本文所述之細胞展現選自由以下組成之群之一或多者：與轉移至個體中後之野生型細胞相比，(a)個體中減少的TH1活化，(b)個體中減少的NK細胞殺傷，及(c)個體中減少的完整PBMC殺傷。

【1114】在一些實施例中，在轉移至個體中後，本文所述之細胞引發選自由以下組成之群之一或多者：與轉移至個體中後之野生型細胞相比，(a)個體中減少的供體特異性抗體，(b)個體中減少的IgM或IgG抗體，及(c)個體中減小的補體依賴性細胞毒性(CDC)。

【1115】在一些實施例中，在個體內用包含CD8結合劑之慢病毒載體轉導本文所述之細胞。在一些實施例中，慢病毒載體攜載編碼CAR及/或CD47之基因。

【1116】在一些實施例中，使用選自由以下組成之群之基因療法載體或轉座酶系統將編碼CAR及/或CD47之基因引入細胞中：條件或可誘導轉座酶、條件或可誘導PiggyBac轉座子、條件或可誘導睡美人(SB11)轉座子、條件或可誘導Mos1轉座子及條件或可誘導Tol2轉座子。在一些實施例中，基因療法載體係反轉錄病毒或融合體。

【1117】本文提供醫藥組合物，其包含本揭示案之非

活化T細胞及/或經改造T細胞之群體及醫藥學上可接受之添加劑、載劑、稀釋劑或賦形劑。

【1118】本文提供方法，其包括向個體投與包含本揭示案之非活化T細胞及/或經改造T細胞之群體或一或多種本揭示案之醫藥組合物的組合物。

【1119】在一些實施例中，在投與組合物之前、之後及/或同時未向個體投與T細胞活化治療。在一些實施例中，T細胞活化治療包括淋巴清除。

【1120】本文提供治療患有癌症之個體之方法，其包括向個體投與包含本揭示案之非活化T細胞及/或經改造T細胞之群體或一或多種本揭示案之醫藥組合物的組合物，其中在投與組合物之前、之後及/或同時未向個體投與T細胞活化治療。在一些實施例中，T細胞活化治療包括淋巴清除。

【1121】本文提供在個體內擴增能夠識別且殺傷有需要之個體之腫瘤細胞之T細胞的方法，其包括向個體投與包含本揭示案之非活化T細胞及/或經改造T細胞之群體或一或多種本揭示案之醫藥組合物的組合物，其中在投與組合物之前、之後及/或同時未向個體投與T細胞活化治療。在一些實施例中，T細胞活化治療包括淋巴清除。

【1122】本文提供用於治療個體之疾患、疾病或病症之劑量方案，其包括投與醫藥組合物，該醫藥組合物包含本揭示案之非活化T細胞及/或經改造T細胞之群體、或一或多種本揭示案之醫藥組合物、及醫藥學上可接受之添加

劑、載劑、稀釋劑或賦形劑，其中醫藥組合物係以約1-3個治療有效劑量投與。本文提供用於治療個體之疾患、疾病或病症之劑量方案，其包括投與醫藥組合物，該醫藥組合物包含本揭示案之細胞群體、或一或多種本揭示案之醫藥組合物、及醫藥學上可接受之添加劑、載劑、稀釋劑或賦形劑，其中醫藥組合物係以約1-3個臨床有效劑量投與。

【1123】一旦發生變化，可使用已知技術(例如西方墨點、ELISA分析、FACS分析、其他免疫分析、反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)及諸如此類)來分析本文所述任一分子之表現之存在。

DD. 誘導性多能幹細胞之生成

【1124】該技術提供產生低免疫原性多能細胞之方法。在一些實施例中，該方法包括生成多能幹細胞。小鼠及人類多能幹細胞(通常稱為iPSC；miPSC對於鼠類細胞或hiPSC對於人類細胞)之生成通常為此項技術中已知。如熟習此項技術者將瞭解，存在生成iPCS之多種不同之方法。使用病毒引入四種轉錄因子Oct3/4、Sox2、c-Myc及Klf4自小鼠胚胎或成年纖維母細胞進行原始誘導；參見Takahashi及Yamanaka，Cell 126:663-676 (2006)，其全文且具體而言其中所概述之技術皆以引用方式併入本文中。此後，已開發出多種方法；參見Seki等人，World J. Stem Cells 7(1): 116-125 (2015)之綜述，以及Lakshmipathy及

Vermuri編輯，Methods in Molecular Biology: Pluripotent Stem Cells, Methods and Protocols, Springer 2013，該兩篇文獻之全文且具體而言生成hiPSC之方法(參見例如後一文獻之第3章)皆以引用方式明確併入本文中。

【1125】通常，iPSC係藉由在宿主細胞中瞬時表現一或多種再程式化因子來生成，通常使用游離型載體引入。在該等條件下，少量細胞經誘導變成iPSC (一般而言，此步驟之效率較低，此乃因未使用選擇標記物)。一旦細胞經「再程式化」且變得多能，其便立即丟失游離型載體且使用內源基因產生因子。

【1126】亦如熟習此項技術者應瞭解，可用或所用再程式化因子之數量可發生變化。通常，當使用極少之再程式化因子時，細胞轉型至多能狀態之效率以及「多能性」下降，例如極少再程式化因子可導致細胞並非完全多能的，而是僅可能夠分化成極少細胞類型。

【1127】在一些實施例中，使用單一再程式化因子OCT4。在其他實施例中，使用兩種再程式化因子OCT4及KLF4。在其他實施例中，使用三種再程式化因子OCT4、KLF4及SOX2。在其他實施例中，使用四種再程式化因子OCT4、KLF4、SOX2及c-Myc。在其他實施例中，可使用5種、6種或7種選自以下之再程式化因子：SOKMNLT；SOX2、OCT4 (POU5F1)、KLF4、MYC、NANOG、LIN28及SV40L T抗原。一般而言，該等再程式化因子基因提供於例如為此項技術中已知且在市面上有售之游離型載體

上。

【1128】一般而言，如此項技術中已知，iPSC係藉由瞬時表現如本文所述之再程式化因子自非多能細胞(例如但不限於血球、纖維母細胞等)製造。

EE. 低免疫原性表型及多能性保持之分析

【1129】一旦生成低免疫原性細胞，便立即可如WO2016183041及WO2018132783中所述分析其低免疫原性及/或多能性保持。

【1130】在一些實施例中，低免疫原性係使用如WO2018132783之圖13及圖15中所例示之多種技術來分析。該等技術包括移植至同種異體宿主中並監測避開宿主免疫系統之低免疫原性多能細胞生長(*例如*畸胎瘤)。在一些情況下，低免疫原性多能細胞衍生物經轉導以表現螢光素酶且然後可使用生物發光成像來追蹤。類似地，測試宿主動物對該等細胞之T細胞及/或B細胞反應以確認細胞不會在宿主動物中引起免疫反應。可藉由Elispot、ELISA、FACS、PCR或質譜流式細胞術(CYTOF)來評價T細胞反應。使用FACS或Luminex來評價B細胞反應或抗體反應。另外或替代地，可分析細胞避免先天免疫反應(例如NK細胞殺傷)之能力，如WO2018132783之圖14及圖15中通常顯示。

【1131】在一些實施例中，使用T細胞免疫分析(例如熟習此項技術者所意識到之T細胞增殖分析、T細胞活化分

析及T細胞殺傷分析)來評估細胞之免疫原性。在一些情形下，T細胞增殖分析包括用干擾素-γ預處理細胞及將細胞與經標記之T細胞共培養並在預選量之時間後分析T細胞群體(或增殖T細胞群體)之存在。在一些情形下，T細胞活化分析包括將T細胞與本文所概述之細胞共培養及測定T細胞中T細胞活化標記物之表現水準。

【1132】可實施活體內分析來評價本文所概述細胞之免疫原性。在一些實施例中，使用同種異體人類化免疫缺陷小鼠模型來測定低免疫原性細胞之存活及免疫原性。在一些情況下，將低免疫原性多能幹細胞移植至同種異體人類化NSG-SGM3小鼠中且分析細胞排斥、細胞存活及畸胎瘤形成。在一些情況下，所移植低免疫原性多能幹細胞或其分化細胞在小鼠模型中展示長期存活。

【1133】用於測定細胞之免疫原性(包括低免疫原性)之其他技術闡述於例如Deuse等人，Nature Biotechnology, 2019, 37, 252-258及Han等人，Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(21), 10441-10446中，該等揭示內容(包括圖、圖例及方法描述)之全文皆以引用方式併入本文中。

【1134】類似地，以多種方式測試多能性保持。在一些實施例中，藉由表現如本文通常闡述且WO2018132783之圖29中顯示之某些多能性特異性因子來分析多能性。另外或替代地，多能細胞分化成一或多種細胞類型作為多能性之指示。

【1135】如熟習此項技術者將瞭解，可使用此項技術

中已知且如下文所述之技術來量測多能細胞中MHC I功能(當細胞衍生自人類細胞時為HLA I)之成功減弱；例如，使用結合HLA複合物之經標記抗體之FACS技術；例如，使用結合至人類主要組織相容性HLA I類抗原分子之α鏈之市售HLA-A、HLA-B及HLA-C抗體。

【1136】另外，可測試細胞以確認HLA I複合物不在細胞表面上表現。此可藉由FACS分析使用如上文所論述針對一或多種HLA細胞表面組分之抗體來分析。

【1137】可使用此項技術中已知之技術(例如使用針對蛋白質之抗體之西方印跡、FACS技術、RT-PCR技術等)來量測多能細胞或其衍生物中MHC II功能(當細胞衍生自人類細胞時為HLA II)之成功減弱。

【1138】另外，可測試細胞以確認HLA II複合物不在細胞表面上表現。如此項技術中已知(參見例如WO2018132783之圖21)再次進行此分析，且通常使用西方墨點或FACS分析基於結合至人類HLA II類HLA-DR、DP及大多數DQ抗原之商業抗體來進行。

【1139】除一或多種HLA I及II (或MHC I及II)分子減少外，該技術之低免疫原性細胞對巨噬細胞吞噬作用及NK細胞殺傷具有降低的敏感性。所得低免疫原性細胞因TCR複合物及一或多種耐受原性因子轉基因表現之減少或缺乏而「避開」免疫巨噬細胞及先天路徑。

FF. 外源多核苷酸

【1140】在一些實施例中，本文所提供之低免疫原性細胞經遺傳修飾以包括插入低免疫原性細胞之一或多個基因體基因座中之一或多個外源多核苷酸。在一些實施例中，外源多核苷酸編碼所關注蛋白質，例如嵌合抗原受體。可使用任一適宜方法將外源多核苷酸插入低免疫原性細胞之基因體基因座中，包括本文所述之基因編輯方法(*例如*CRISPR/Cas系統)。

【1141】外源多核苷酸可插入低免疫原性細胞之任何適宜基因體基因座中。在一些實施例中，外源多核苷酸插入如本文所述之安全港或靶基因座中。適宜安全港及靶基因座包括(但不限於) CCR5基因、CXCR4基因、PPP1R12C(亦稱為AAVS1)基因、白蛋白基因、SHS231基因座、CLYBL基因、Rosa基因(*例如*ROSA26)、F3基因(亦稱為CD142)、MICA基因、MICB基因、LRP1基因(亦稱為CD91)、HMGB1基因、ABO基因、RHD基因、FUT1基因、PDGFRa基因、OLIG2基因、GFAP基因及KDM5D基因(亦稱為HY)。在一些實施例中，外源多核苷酸插入至安全港或靶基因座之內含子、外顯子或編碼序列區域中。在一些實施例中，外源多核苷酸插入內源基因中，其中插入引起內源基因沈默或表現減少。在一些實施例中，多核苷酸插入B2M、CIITA、TRAC、TRB、PD-1或CTLA-4基因座中。插入外源多核苷酸之例示性基因體基因座繪示於表16及表17中。

表 16：用於插入外源多核苷酸之例示性基因體基因座

編號	物種	名稱	Ensembl ID	裂解之靶區域	亦稱為
1	人類	B2M	ENSG00000166710	CDS	
2	人類	CIITA	ENSG00000179583	CDS	
3	人類	TRAC	ENSG00000277734	CDS	
4	人類	PPP1R12C	ENSG00000125503	內含子 1 及 2	AAVS1
5	人類	CLYBL	ENSG00000125246	內含子 2	
6	人類	CCR5	ENSG00000160791	外顯子 1-3、內含子 1-2 及 CDS	
7	人類	THUMPD3-AS1	ENSG00000206573	內含子 1	ROSA26
8	人類	Ch-4:58,976,613		500 bp 窗口	SHS231
9	人類	F3	ENSG00000117525	CDS	CD142
10	人類	MICA	ENSG00000204520	CDS	
11	人類	MICB	ENSG00000204516	CDS	
12	人類	LRP1	ENSG00000123384	CDS	
13	人類	HMGB1	ENSG00000189403	CDS	
14	人類	ABO	ENSG00000175164	CDS	
15	人類	RHD	ENSG00000187010	CDS	
16	人類	FUT1	ENSG00000174951	CDS	
17	人類	KDM5D	ENSG00000012817	CDS	HY

表 17：Cas9 引導 RNA 之非限制性實例

基因	SEQ ID NO:	引導序列	PAM	靶位點	gRNA 切割位置
ABO	85	UCUCUCCAUGUGCAGUAGGA	AGG	外顯子 7	chr9:133,257,541
FUT1	86	CUGGAUGUCGGAGGAGUACG	CGG	外顯子 4	chr19:48,750,822
RH	87	GUCUCCGGAAACUCGAGGUG	AGG	外顯子 2	chr1:25,284,622
F3 (CD142)	88	ACAGUGUAGACUUGAUUGAC	GGG	外顯子 2	chr1:94,540,281
B2M	89	CGUGAGUAAACCUGAAUCUU	TGG	外顯子 2	chr15:44,715,434
CIITA	90	GAUAUUGGCAUAAGCCUCCC	TGG	外顯子 3	chr16:10,895,747
TRAC	91	AGAGUCUCUCAGCUGGUACA	CGG	外顯子 1	chr14:22,5547,533

【1142】對於Cas9引導物，所有Cas9引導物之間隔體序列提供於表18中，其描述20 nt引導序列對應於獨特的引導序列且可為本文所述彼等引導序列中之任一者，包括例如表18中所列出之彼等引導序列。

表18：Cas9引導RNA

描述	SEQ ID NO:	序列
20 nt引導序列*	92	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
12 nt crRNA重複序列	93	GUUUUAGAGCUA
4 nt四環序列	94	GAAA
64 nt tracrRNA序列	95	UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU
例示性完整序列	96	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU

【1143】在一些實施例中，包括外源多核苷酸之低免疫原性細胞衍生自低免疫原性誘導性多能細胞(HIP)，例如如本文所述。該等低免疫原性細胞包括例如心臟細胞、神經細胞、大腦內皮細胞、多巴胺能神經元、神經膠質祖細胞、內皮細胞、甲狀腺細胞、胰島細胞(β細胞)、視網膜色素上皮細胞、NK細胞及T細胞。在一些實施例中，包括外源多核苷酸之低免疫原性細胞係β細胞、T細胞(*例如*原代T細胞)或神經膠質細胞。

【1144】在一些實施例中，外源多核苷酸編碼外源CD47多肽(*例如*人類CD47多肽)，且外源多肽插入安全港或靶基因座、或如本文所揭示之安全港或靶位點、或引起內源基因沈默或表現減少之基因體基因座中。在一些實施例中，多核苷酸插入B2M、CIITA、TRAC、TRB、PD1或CTLA4基因座中。

【1145】在一些實施例中，包括外源多核苷酸之低免

疫原性細胞係原代T細胞或衍生自低免疫原性多能細胞(*例如*低免疫原性iPSC)之T細胞。在一些實施例中，外源多核苷酸係嵌合抗原受體(*例如*本文所述之任一CAR)。在一些實施例中，外源多核苷酸可操作連接至啟動子用於在低免疫原性細胞中表現外源多核苷酸。

GG. 醫藥學上可接受之載劑

【1146】在一些實施例中，本文所提供之醫藥組合物進一步包括醫藥學上可接受之載劑。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒，且包括緩衝劑，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六甲雙銨；苯紮氯銨(benzalkonium chloride)、苄索氯銨(benzethonium chloride)；苯酚、丁醇或苯甲醇；對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間-甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物，例如聚乙烯基吡咯啶酮；胺基酸，例如甘胺酸、麩胺醯胺、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、二糖及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，例如EDTA；糖，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成鹽抗衡離子，例如鈉；金屬錯合物(*例如*Zn-蛋白質錯合物)；鹽，例如氯化鈉；及/或非離子型表面活性劑，例如

聚山梨醇酯(TWEEN™)、泊洛沙姆(poloxamer，PLURONICS™)或聚乙二醇(PEG)。在一些實施例中，醫藥組合物包括醫藥學上可接受之緩衝液(*例如*中性緩衝鹽水或磷酸鹽緩衝鹽水)。

【1147】在一些實施例中，醫藥組合物包括一或多種選自由以下組成之群之電解質鹼溶液：乳酸化CryoStor®、林格氏溶液(Ringer's solution)、PlasmaLyte-A™、伊格爾改良達爾伯克氏培養基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)、Normosol-R™、Veen-D™、Polysal®及漢克氏平衡鹽溶液(Hank's Balanced Salt Solution，不含酚紅)。該等鹼溶液非常接近細胞外哺乳動物生理流體之組成。

【1148】在一些實施例中，醫藥組合物包括一或多種選自由以下組成之群之冷凍保護劑：阿拉伯半乳聚糖、甘油、聚乙烯基吡咯啶酮(PVP)、右旋糖、葡聚糖、海藻糖、蔗糖、棉子糖、羥乙基澱粉(HES)、丙二醇、人類血清白蛋白(HSA)及二甲基亞砜(DMSO)。在一些實施例中，醫藥學上可接受之緩衝液係中性緩衝鹽水或磷酸鹽緩衝鹽水。在一些實施例中，本文所提供之醫藥組合物包括CryoStor® CSB、Plasma-Lyte-A™、HSA、DMSO及海藻糖中之一或多者。

【1149】CryoStor®係細胞內樣最佳化溶液，其含有滲透/溶脹劑、自由基清除劑及能源，以最小化細胞凋亡、最小化缺血/再灌注損傷並最大化最大數量之活功能

細胞之解凍後恢復。CryoStor®不含血清及蛋白質，且不具免疫原性。CryoStor®係自USP級或更高級原材料製造之cGMP。CryoStor®係使用0%、2%、5%或10% DMSO預調配之溶液之家族。CryoStor® CSB係CryoStor®之不含DMSO之形式。在一些實施例中，醫藥組合物包括濃度為約0-100%、5%-95%、10%-90%、15%-85%、20%-80%、30%-80%、40%-80%、50%-80%、60%-80%、70%-80%、25%-75%、30%-70%、35%-65%、40%-60%或45%-55% w/w之CryoStor® CSB鹼溶液。在一些實施例中，醫藥組合物包括濃度為約0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100% w/w之CryoStor® CSB鹼溶液。

【1150】PlasmaLyte-A™係非聚合物血漿膨脹劑且含有與在培養基中所發現相似之必需鹽及營養素，但不含在組織培養基中所發現經批準用於人類輸注(例如酚紅)或無法以U.S.P.級獲得之其他成分。PlasmaLyte-A™含有約140 mEq/公升之鈉(Na)、約5 mEq/公升之鉀(K)、約3 mEq/公升之鎂(Mg)、約98 mEq/公升之氯(Cl)、約27 mEq/公升之乙酸鹽及約23 mEq/公升之葡糖酸鹽。(PlasmaLyte-A™可自Baxter, Hyland Division, Glendale Calif.，產品號2B2543)購得。在一些實施例中，醫藥組合物包括濃度為約0-100%、5%-95%、10%-90%、15%-85%、15%-80%、15%-75%、15%-70%、15%-65%、15%-60%、15%-55%、15%-

50%、15%-45%、15%-40%、15%-35%、15%-30%、15%-25%、20%-80%、20%-75%、20%-70%、20%-65%、20%-60%、20%-55%、20%-50%、20%-45%、20%-40%、20%-35%、20%-30%、25%-75%、30%-70%、35%-65%、40%-60%或45%-55% w/w之PlasmaLyte-A™鹼溶液。在一些實施例中，醫藥組合物包括濃度為約0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100% w/w之PlasmaLyte-A™鹼溶液。

【1151】在一些實施例中，醫藥組合物包括濃度為約0-10%、0.3%-9.3%、0.3%-8.3%、0.3%-7.3%、0.3%-6.3%、0.3%-5.3%、0.3%-4.3%、0.3%-3.3%、0.3%-2.3%、0.3%-1.3%、0.6%-8.3%、0.9%-7.3%、1.2%-6.3%、1.5%-5.3%、1.8%-4.3%或2.1%-3.3% w/v之人類血清白蛋白(HSA)。在一些實施例中，醫藥組合物包括濃度為約0%、0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5%、1.8%、2.1%、2.4%、2.7%、3.0%、3.3%、3.6%、3.9%、4.3%、4.6%、4.9%、5.3%、5.6%、5.9%、6.3%、6.6%、6.9%、7.3%、7.6%、7.9%、8.3%、8.6%、8.9%、9.3%、9.6%、9.9%或10% w/v之HSA。

【1152】在一些實施例中，醫藥組合物包括濃度為約0-10%、0.5%-9.5%、1%-9%、1.5%-8.5%、2%-8%、3%-8%、4%-8%、5%-8%、6%-8%、7%-8%、2.5%-7.5%、3%-7%、3.5%-6.5%、4%-6%或4.5%-5.5% v/v之二甲基亞砜

(DMSO)。在一些實施例中，醫藥組合物包括濃度為約0%、0.25%、0.5%、0.75%、1.0%、1.25%、1.5%、1.75%、2.0%、2.25%、2.5%、2.75%、3.0%、3.25%、3.5%、3.75%、4.0%、4.25%、4.5%、4.75%、5.0%、5.25%、5.5%、5.75%、6.0%、6.25%、6.5%、6.75%、7.0%、7.25%、7.5%、7.75%、8.0%、8.25%、8.5%、8.75%、9.0%、9.25%、9.5%、9.75%或10.0% v/v之HSA。

【1153】在一些實施例中，醫藥組合物包括濃度為約0-500 mM、50-450 mM、100-400 mM、150-350 mM或200-300 mM之海藻糖。在一些實施例中，醫藥組合物包括濃度為約0 mM、10 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、125 mM、150 mM、175 mM、200 mM、225 mM、250 mM、275 mM、300 mM、325 mM、350 mM、375 mM、400 mM、425 mM、450 mM、475 mM或500 mM之海藻糖。

【1154】例示性醫藥組合物組分顯示於表34中。

表34. 例示性醫藥組合物組分。

調配物	鹼溶液	c[DMSO]	額外 c[HSA]*	c[海藻糖]
A	75% CroStor® CSB + 25% PlasmaLyte A™ + 1.2% HSA	7.5%	0.3%	
B		3.75%	0.3%	
C			5.3%	
D			0.3%	250 mM
E	100% PlasmaLyte A™ + 1.2% HSA	7.5%	0.3%	
F		7.5%	5.3%	
G		7.5%	5.3%	250 mM

* 除 PlasmaLyte 外之額外 HSA。

【1155】在一些實施例中，醫藥組合物包含本文所述

之低免疫原性細胞及醫藥學上可接受之載劑，該載劑包含31.25% (v/v) Plasma-Lyte A、31.25% (v/v)之5%右旋糖/0.45%氯化鈉、10%葡聚糖40 (LMD)/5%右旋糖、20% (v/v)之25%人類血清白蛋白(HSA)及7.5% (v/v)二甲基亞砜(DMSO)。

HH. 調配物及劑量方案

【1156】可將任一治療有效量之本文所述細胞納入醫藥組合物中，此端視所治療之適應症而定。細胞之非限制性實例包括原代T細胞、自低免疫原性誘導性多能幹細胞分化之T細胞、及自本文所述之低免疫原性誘導性多能幹細胞分化之其他細胞。在一些實施例中，醫藥組合物包括至少約1×10^2個、5×10^2個、1×10^3個、5×10^3個、1×10^4個、5×10^4個、1×10^5個、5×10^5個、1×10^6個、5×10^6個、1×10^7個、5×10^7個、1×10^8個、5×10^8個、1×10^9個、5×10^9個、1×10^{10}個或5×10^{10}個細胞。在一些實施例中，醫藥組合物包括多達約1×10^2個、5×10^2個、1×10^3個、5×10^3個、1×10^4個、5×10^4個、1×10^5個、5×10^5個、1×10^6個、5×10^6個、1×10^7個、5×10^7個、1×10^8個、5×10^8個、1×10^9個、5×10^9個、1×10^{10}個或5×10^{10}個細胞。在一些實施例中，醫藥組合物包括多達約6.0×10^8個細胞。在一些實施例中，醫藥組合物包括多達約8.0×10^8個細胞。在一些實施例中，醫藥組合物包括至少約1×10^2-5×10^2個、5×10^2-1×10^3個、1×10^3-5×10^3個、5×10^3-1×10^4個、1×10^4-5×10^4個、

5×10^4-1×10^5 個 、 1×10^5-5×10^5 個 、 5×10^5-1×10^6 個 、 1×10^6-5×10^6 個 、 5×10^6-1×10^7 個 、 1×10^7-5×10^7 個 、 5×10^7-1×10^8 個 、 1×10^8-5×10^8 個 、 5×10^8-1×10^9 個 、 1×10^9-5×10^9個、5×10^9-1×10^{10}個或1×10^{10} - 5×10^{10}個細胞。在一些實施例中，醫藥組合物包括約1.0×10^6至約2.5×10^8個細胞。在某些實施例中，醫藥組合物包括約2.0×10^6至約2.0×10^8個細胞，例如(但不限於)原代T細胞、自低免疫原性誘導性多能幹細胞分化之T細胞。

【1157】在一些實施例中，醫藥組合物之體積係至少5 ml、10 ml、15 ml、20 ml、25 ml、30 ml、35 ml、40 ml、45 ml、50 ml、55 ml、60 ml、65 ml、70 ml、75 ml、80 ml、85 ml、90 ml、95 ml、100 ml、110 ml、120 ml、130 ml、140 ml、150 ml、160 ml、170 ml、180 ml、190 ml、200 ml、250 ml、300 ml、350 ml、400 ml或500 ml。在一些實施例中，醫藥組合物之體積高達約5 ml、10 ml、15 ml、20 ml、25 ml、30 ml、35 ml、40 ml、45 ml、50 ml、55 ml、60 ml、65 ml、70 ml、75 ml、80 ml、85 ml、90 ml、95 ml、100 ml、110 ml、120 ml、130 ml、140 ml、150 ml、160 ml、170 ml、180 ml、190 ml、200 ml、250 ml、300 ml、350 ml、400 ml或500 ml。在一些實施例中，醫藥組合物之體積為約5 ml、10 ml、15 ml、20 ml、25 ml、30 ml、35 ml、40 ml、45 ml、50 ml、55 ml、60 ml、65 ml、70 ml、75 ml、80 ml、85 ml、90 ml、95 ml、100 ml、110 ml、120 ml、130 ml、140 ml、150 ml、160

ml、170 ml、180 ml、190 ml、200 ml、250 ml、300 ml、350 ml、400 ml或500 ml。在一些實施例中，醫藥組合物之體積為約1-50 ml、50-100 ml、100-150 ml、150-200 ml、200-250 ml、250-300 ml、300-350 ml、350-400 ml、400-450 ml或450-500 ml。在一些實施例中，醫藥組合物之體積為約1-50 ml、50-100 ml、100-150 ml、150-200 ml、200-250 ml、250-300 ml、300-350 ml、350-400 ml、400-450 ml或450-500 ml。在一些實施例中，醫藥組合物之體積為約1-10 ml、10-20 ml、20-30 ml、30-40 ml、40-50 ml、50-60 ml、60-70 ml、70-80 ml、70-80 ml、80-90 ml或90-100 ml。在一些實施例中，醫藥組合物之體積介於約5 ml至約80 ml範圍內。在一些實施例中，醫藥組合物之體積介於約10 ml至約70 ml範圍內。在某些實施例中，醫藥組合物之體積介於約10 ml至約50 ml範圍內。

【1158】具體量/劑量方案將端視個體之體重、性別、年齡及健康狀況、調配物、細胞之生物化學性質、生物活性、生物利用度及副作用以及完整治療方案中細胞之數量及屬性而變化。

【1159】在一些實施例中，醫藥組合物之治療有效劑量或臨床有效劑量包括體積為約10 ml至50 ml之約1.0×10^5至約2.5×10^8個細胞，且醫藥組合物係以單一治療有效劑量或臨床有效劑量投與。在一些情形下，治療有效劑量或臨床有效劑量包括體積為約10 ml至50 ml之約1.0×10^5至約2.5×10^8個本文所述之原代T細胞。在一些情形下，治療有

效劑量或臨床有效劑量包括上文已闡述體積為約10 ml至50 ml之約1.0×10^5至約2.5×10^8個原代T細胞。在多種情形下，治療有效劑量或臨床有效劑量包括體積為約10 ml至50 ml之自本文所述之低免疫原性誘導性多能幹細胞分化之約1.0×10^5至約2.5×10^8個T細胞。在一些實施例中，治療有效劑量或臨床有效劑量係體積為約10 ml至50 ml之自本文所述之低免疫原性誘導性多能幹細胞分化之1.0×105個、1.1×105個、1.2×105個、1.3×105個、1.4×105個、1.5×105個、1.6×105個、1.7×105個、1.8×105個、1.9×105個、2.0×105個、2.1×105個、2.2×105個、2.3×105個、2.4×105個、2.5×105個、1.0×106個、1.1×106個、1.2×106個、1.3×106個、1.4×106個、1.5×106個、1.6×106個、1.7×106個、1.8×106個、1.9×106個、2.0×106個、2.1×106個、2.2×106個、2.3×106個、2.4×106個、2.5×106個、1.0×107個、1.1×107個、1.2×107個、1.3×107個、1.4×107個、1.5×107個、1.6×107個、1.7×107個、1.8×107個、1.9×107個、2.0×107個、2.1×107個、2.2×107個、2.3×107個、2.4×107個、2.5×107個、1.0×108個、1.1×108個、1.2×108個、1.3×108個、1.4×108個、1.5×108個、1.6×108個、1.7×108個、1.8×108個、1.9×108個、2.0×108個、2.1×108個、2.2×108個、2.3×108個、2.4×108個或2.5×108個T細胞。在其他情形下，治療有效劑量或臨床有效劑量之範圍低於約1.0×10^5至約2.5×10^8個T細胞，包括原代T細胞或自低免疫原性誘導性多能幹細胞分化之T細胞。在其

他情形下，治療有效劑量或臨床有效劑量之範圍高於約1.0×10^5至約2.5×10^8個T細胞，包括原代T細胞及自低免疫原性誘導性多能幹細胞分化之T細胞。

【1160】在一些實施例中，對於50 kg或以下之個體，醫藥組合物係以約1.0×10^5至約1.0×10^7個細胞(例如原代T細胞及自低免疫原性誘導性多能幹細胞分化之T細胞)/kg體重之單一治療有效劑量或臨床有效劑量投與。在一些實施例中，對於50 kg或以下之個體，醫藥組合物係以下列單一治療有效劑量或臨床有效劑量投與：約0.5×10^5至約1.0×10^7個、約1.0×10^5至約1.0×10^7個、約1.0×10^5至約1.0×10^7個、約5.0×10^5至約1×10^7個、約1.0×10^6至約1×10^7個、約5.0×10^6至約1.0×10^7個、約1.0×10^5至約5.0×10^6個、約1.0×10^5至約1.0×10^6個、約1.0×10^5至約5.0×10^5個、約1.0×10^5至約5.0×10^6個、約2.0×10^5至約5.0×10^6個、約3.0×10^5至約5.0×10^6個、約4.0×10^5至約5.0×10^6個、約5.0×10^5至約5.0×10^6個、約6.0×10^5至約5.0×10^6個、約7.0×10^5至約5.0×10^6個、約8.0×10^5至約5.0×10^6個或約9.0×10^5至約5.0×10^6個細胞/kg體重。在一些實施例中，對於50 kg或以下之個體，治療有效劑量或臨床有效劑量係約0.2×10^6至約5.0×10^6個細胞/kg體重。在某些實施例中，對於50 kg或以下之個體，治療有效劑量或臨床有效劑量之範圍低於約0.2×10^6至約5.0×10^6個細胞/kg體重。在一些實施例中，對於50 kg或以下之個體，治療有效劑量或臨床有效劑量係0.5×10^5個、

0.6×10^5個、0.7×10^5個、0.8×10^5個、0.9×10^5個、1.0×10^5個、1.1×10^5個、1.2×10^5個、1.3×10^5個、1.4×10^5個、1.5×10^5個、1.6×10^5個、1.7×10^5個、1.8×10^5個、1.9×10^5個、2.0×10^5個、2.1×10^5個、2.2×10^5個、2.3×10^5個、2.4×10^5個、2.5×10^5個、2.6×10^5個、2.7×10^5個、2.8×10^5個、2.9×10^5個、3.0×10^5個、3.1×10^5個、3.2×10^5個、3.3×10^5個、3.4×10^5個、3.5×10^5個、3.6×10^5個、3.7×10^5個、3.8×10^5個、3.9×10^5個、4.0×10^5個、4.1×10^5個、4.2×10^5個、4.3×10^5個、4.4×10^5個、4.5×10^5個、4.6×10^5個、4.7×10^5個、4.8×10^5個、4.9×10^5個、5.0×10^5個、0.5×10^6個、0.6×10^6個、0.7×10^6個、0.8×10^6個、0.9×10^6個、1.0×10^6個、1.1×10^6個、1.2×10^6個、1.3×10^6個、1.4×10^6個、1.5×10^6個、1.6×10^6個、1.7×10^6個、1.8×10^6個、1.9×10^6個、2.0×10^6個、2.1×10^6個、2.2×10^6個、2.3×10^6個、2.4×10^6個、2.5×10^6個、2.6×10^6個、2.7×10^6個、2.8×10^6個、2.9×10^6個、3.0×10^6個、3.1×10^6個、3.2×10^6個、3.3×10^6個、3.4×10^6個、3.5×10^6個、3.6×10^6個、3.7×10^6個、3.8×10^6個、3.9×10^6個、4.0×10^6個、4.1×10^6個、4.2×10^6個、4.3×10^6個、4.4×10^6個、4.5×10^6個、4.6×10^6個、4.7×10^6個、4.8×10^6個、4.9×10^6個、5.0×10^6個、5.1×10^6個、5.2×10^6個、5.3×10^6個、5.4×10^6個、5.5×10^6個、5.6×10^6個、5.7×10^6個、5.8×10^6個、5.9×10^6個、6.0×10^6個、6.1×10^6個、6.2×10^6個、6.3×10^6個、6.4×10^6個、6.5×10^6個、6.6×10^6個、6.7×10^6個、

6.8×10⁶個、6.9×10⁶個、7.0×10⁶個、7.1×10⁶個、7.2×10⁶個、7.3×10⁶個、7.4×10⁶個、7.5×10⁶個、7.6×10⁶個、7.7×10⁶個、7.8×10⁶個、7.9×10⁶個、8.0×10⁶個、8.1×10⁶個、8.2×10⁶個、8.3×10⁶個、8.4×10⁶個、8.5×10⁶個、8.6×10⁶個、8.7×10⁶個、8.8×10⁶個、8.9×10⁶個、9.0×10⁶個、9.1×10⁶個、9.2×10⁶個、9.3×10⁶個、9.4×10⁶個、9.5×10⁶個、9.6×10⁶個、9.7×10⁶個、9.8×10⁶個、9.9×10⁶個、0.5×10⁷個、0.6×10⁷個、0.7×10⁷個、0.8×10⁷個、0.9×10⁷個或1.0×10⁷個細胞/kg體重。在一些實施例中，對於50 kg或以下之個體，治療有效劑量或臨床有效劑量係約0.2×10⁶至約5.0×10⁶個細胞/kg體重。在某些實施例中，對於50 kg或以下之個體，治療有效劑量或臨床有效劑量之範圍高於約0.2×10⁶至約5.0×10⁶個細胞/kg體重。在一些實施例中，單一 治療有效劑量或臨床有效劑量係約10 ml至50 ml之體積。在一些實施例中，治療有效劑量或臨床有效劑量係靜脈內投與。

【1161】在一些實施例中，對於50 kg以上之個體，細胞係以約1.0×10⁶至約5.0×10⁸個細胞(例如原代T細胞及自低免疫原性誘導性多能幹細胞分化之T細胞)之單一治療有效劑量或臨床有效劑量投與。在一些實施例中，對於50 kg或以下之個體，醫藥組合物係以下列單一治療有效劑量或臨床有效劑量投與：約0.5×10⁶至約1.0×10⁹個、約1.0×10⁶至約1.0×10⁹個、約1.0×10⁶至約1.0×10⁹個、約5.0×10⁶至約1.0×10⁹個、約1.0×10⁷至約1.0×10⁹個、約

5.0×10^7至約1.0×10^9個、約1.0×10^6至約5.0×10^7個、約1.0×10^6至約1.0×10^7個、約1.0×10^6至約5.0×10^7個、約1.0×10^7至約5.0×10^8個、約2.0×10^7至約5.0×10^8個、約3.0×10^7至約5.0×10^8個、約4.0×10^7至約5.0×10^8個、約5.0×10^7至約5.0×10^8個、約6.0×10^7至約5.0×10^8個、約7.0×10^7至約5.0×10^8個、約8.0×10^7至約5.0×10^8個或約9.0×10^7至約5.0×10^8個細胞/kg體重。在一些實施例中，對於50 kg或以下之個體，治療有效劑量或臨床有效劑量係1.0×10^6個、1.1×10^6個、1.2×10^6個、1.3×10^6個、1.4×10^6個、1.5×10^6個、1.6×10^6個、1.7×10^6個、1.8×10^6個、1.9×10^6個、2.0×10^6個、2.1×10^6個、2.2×10^6個、2.3×10^6個、2.4×10^6個、2.5×10^6個、2.6×10^6個、2.7×10^6個、2.8×10^6個、2.9×10^6個、3.0×10^6個、3.1×10^6個、3.2×10^6個、3.3×10^6個、3.4×10^6個、3.5×10^6個、3.6×10^6個、3.7×10^6個、3.8×10^6個、3.9×10^6個、4.0×10^6個、4.1×10^6個、4.2×10^6個、4.3×10^6個、4.4×10^6個、4.5×10^6個、4.6×10^6個、4.7×10^6個、4.8×10^6個、4.9×10^6個、5.0×10^6個、5.1×10^6個、5.2×10^6個、5.3×10^6個、5.4×10^6個、5.5×10^6個、5.6×10^6個、5.7×10^6個、5.8×10^6個、5.9×10^6個、6.0×10^6個、6.1×10^6個、6.2×10^6個、6.3×10^6個、6.4×10^6個、6.5×10^6個、6.6×10^6個、6.7×10^6個、6.8×10^6個、6.9×10^6個、7.0×10^6個、7.1×10^6個、7.2×10^6個、7.3×10^6個、7.4×10^6個、7.5×10^6個、7.6×10^6個、7.7×10^6個、7.8×10^6個、7.9×10^6個、8.0×10^6個、8.1×10^6個、

8.2×10^{6}個、8.3×10^{6}個、8.4×10^{6}個、8.5×10^{6}個、8.6×10^{6}個、8.7×10^{6}個、8.8×10^{6}個、8.9×10^{6}個、9.0×10^{6}個、9.1×10^{6}個、9.2×10^{6}個、9.3×10^{6}個、9.4×10^{6}個、9.5×10^{6}個、9.6×10^{6}個、9.7×10^{6}個、9.8×10^{6}個、9.9×10^{6}個、1.0×10^{7}個、1.1×10^{7}個、1.2×10^{7}個、1.3×10^{7}個、1.4×10^{7}個、1.5×10^{7}個、1.6×10^{7}個、1.7×10^{7}個、1.8×10^{7}個、1.9×10^{7}個、2.0×10^{7}個、2.1×10^{7}個、2.2×10^{7}個、2.3×10^{7}個、2.4×10^{7}個、2.5×10^{7}個、2.6×10^{7}個、2.7×10^{7}個、2.8×10^{7}個、2.9×10^{7}個、3.0×10^{7}個、3.1×10^{7}個、3.2×10^{7}個、3.3×10^{7}個、3.4×10^{7}個、3.5×10^{7}個、3.6×10^{7}個、3.7×10^{7}個、3.8×10^{7}個、3.9×10^{7}個、4.0×10^{7}個、4.1×10^{7}個、4.2×10^{7}個、4.3×10^{7}個、4.4×10^{7}個、4.5×10^{7}個、4.6×10^{7}個、4.7×10^{7}個、4.8×10^{7}個、4.9×10^{7}個、5.0×10^{7}個、5.1×10^{7}個、5.2×10^{7}個、5.3×10^{7}個、5.4×10^{7}個、5.5×10^{7}個、5.6×10^{7}個、5.7×10^{7}個、5.8×10^{7}個、5.9×10^{7}個、6.0×10^{7}個、6.1×10^{7}個、6.2×10^{7}個、6.3×10^{7}個、6.4×10^{7}個、6.5×10^{7}個、6.6×10^{7}個、6.7×10^{7}個、6.8×10^{7}個、6.9×10^{7}個、7.0×10^{7}個、7.1×10^{7}個、7.2×10^{7}個、7.3×10^{7}個、7.4×10^{7}個、7.5×10^{7}個、7.6×10^{7}個、7.7×10^{7}個、7.8×10^{7}個、7.9×10^{7}個、8.0×10^{7}個、8.1×10^{7}個、8.2×10^{7}個、8.3×10^{7}個、8.4×10^{7}個、8.5×10^{7}個、8.6×10^{7}個、8.7×10^{7}個、8.8×10^{7}個、8.9×10^{7}個、9.0×10^{7}個、9.1×10^{7}個、9.2×10^{7}個、9.3×10^{7}個、9.4×10^{7}個、9.5×10^{7}個、9.6×10^{7}個、9.7×10^{7}個、9.8×10^{7}個、9.9×10^{7}個、

1.0×10^8個、1.1×10^8個、1.2×10^8個、1.3×10^8個、1.4×10^8個、1.5×10^8個、1.6×10^8個、1.7×10^8個、1.8×10^8個、1.9×10^8個、2.0×10^8個、2.1×10^8個、2.2×10^8個、2.3×10^8個、2.4×10^8個、2.5×10^8個、2.6×10^8個、2.7×10^8個、2.8×10^8個、2.9×10^8個、3.0×10^8個、3.1×10^8個、3.2×10^8個、3.3×10^8個、3.4×10^8個、3.5×10^8個、3.6×10^8個、3.7×10^8個、3.8×10^8個、3.9×10^8個、4.0×10^8個、4.1×10^8個、4.2×10^8個、4.3×10^8個、4.4×10^8個、4.5×10^8個、4.6×10^8個、4.7×10^8個、4.8×10^8個、4.9×10^8個或5.0×10^8個細胞/kg體重。在某些實施例中，對於50 kg以上之個體，細胞係以約1.0×10^7至約2.5×10^8個細胞之單一治療有效劑量或臨床有效劑量投與。在一些實施例中，對於50 kg以上之個體，細胞係以小於約1.0×10^7至約2.5×10^8個細胞之範圍之單一治療有效劑量或臨床有效劑量投與。在一些實施例中，對於50 kg以上之個體，細胞係以高於約1.0×10^7至約2.5×10^8個細胞之範圍之單一治療有效劑量或臨床有效劑量投與。在一些實施例中，劑量係靜脈內投與。在一些實施例中，單一治療有效劑量或臨床有效劑量係約10 ml至50 ml之體積。在一些實施例中，治療有效劑量或臨床有效劑量係靜脈內投與。

【1162】在一些實施例中，治療有效劑量或臨床有效劑量係以下列速率靜脈內投與：約1至50 ml/分鐘、1至40 ml/分鐘、1至30 ml/分鐘、1至20 ml/分鐘、10至20 ml/分鐘、10至30 ml/分鐘、10至40 ml/分鐘、10至50 ml/分鐘、

20至50 ml/分鐘、30至50 ml/分鐘、40至50 ml/分鐘。在多個實施例中，醫藥組合物儲存在一或多個輸注袋中用於靜脈內投與。在一些實施例中，以不超過10分鐘、15分鐘、20分鐘、25分鐘、30分鐘、35分鐘、40分鐘、45分鐘、50分鐘、55分鐘、60分鐘、70分鐘、80分鐘、90分鐘、120分鐘、150分鐘、180分鐘、240分鐘或300分鐘完全投與劑量。

【1163】在一些實施例中，單一治療有效劑量或臨床有效劑量之醫藥組合物存在於單一輸注袋中。在其他實施例中，單一治療有效劑量或臨床有效劑量之醫藥組合物分成2個、3個、4個或5個單獨輸注袋。

【1164】在一些實施例中，本文所述之細胞係以複數個劑量(例如2個、3個、4個、5個、6個或更多個劑量)投與，其中複數個劑量共同構成治療有效劑量或臨床有效劑量方案。在一些實施例中，複數個劑量中之每一劑量係間隔1至24小時投與個體。在一些情況下，後續劑量係在初始或先前劑量後約1小時至約24小時(*例如*約1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、13小時、14小時、15小時、16小時、17小時、18小時、19小時、20小時、21小時、22小時、23小時或約24小時)投與。在一些實施例中，複數個劑量中之每一劑量係間隔約1天至28天投與個體。在一些情況下，後續劑量係在初始或先前劑量後約1天至約28天(*例如*約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7

天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天或約28天)投與。在某些實施例中，複數個劑量中之每一劑量係間隔1週至約6週投與個體。在某些情況下，後續劑量係在初始或先前劑量後約1週至約6週(*例如*約1週、2週、3週、4週、5週或6週)投與。在若干實施例中，複數個劑量中之每一劑量係間隔約1個月至約12個月投與個體。在若干情況下，後續劑量係在初始或先前劑量後約1個月至約12個月(*例如*約1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月或12個月)投與。

【1165】在一些實施例中，在第一時間點向個體投與第一劑量方案，且然後在第二時間點投與第二劑量方案。在一些實施例中，第一劑量方案與第二劑量方案相同。在其他實施例中，第一劑量方案與第二劑量方案不同。在一些情況下，第一劑量方案及第二劑量方案之細胞數係相同的。在一些情況下，第一劑量方案及第二劑量方案之細胞數係不同的。在一些情形下，第一劑量方案及第二劑量方案之劑量數係相同的。在一些情形下，第一劑量方案及第二劑量方案之劑量數係不同的。

【1166】在一些實施例中，第一劑量方案包括表現第一CAR之低免疫(HIP) T細胞或原代T細胞，且第二劑量方案包括表現第二CAR之低免疫(HIP) T細胞或原代T細胞，使得第一CAR及第二CAR係不同的。例如，第一CAR及第

二CAR結合不同的靶抗原。在一些情形下，第一CAR包括結合抗原之scFv，且第二CAR包括結合不同抗原之scFv。在一些實施例中，第一劑量方案包括表現第一CAR之低免疫(HIP) T細胞或原代T細胞，且第二劑量方案包括表現第二CAR之低免疫(HIP) T細胞或原代T細胞，使得第一CAR及第二CAR係相同的。第一劑量方案可與第二劑量方案間隔至少1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月、12個月、1-3個月、1-6個月、4-6個月、3-9個月、3-12個月或更長時間投與個體。在一些實施例中，在疾病(*例如*癌症)進程期間向個體投與複數個劑量方案，且至少兩個劑量方案包括相同類型之低免疫(HIP) T細胞或本文所述之原代T細胞。在其他實施例中，複數個劑量方案中之至少兩者包括不同類型之低免疫(HIP) T細胞或本文所述之原代T細胞。

【1167】在一些實施例中，本文所述之CD19特異性(CD19) CAR-T細胞係以下列劑量投與個體：約50×10^6至約110×10^6個(例如50×10^6個、51×10^6個、52×10^6個、53×10^6個、54×10^6個、55×10^6個、56×10^6個、57×10^6個、58×10^6個、59×10^6個、60×10^6個、61×10^6個、62×10^6個、63×10^6個、64×10^6個、65×10^6個、66×10^6個、67×10^6個、68×10^6個、69×10^6個、70×10^6個、71×10^6個、72×10^6個、73×10^6個、74×10^6個、75×10^6個、76×10^6個、77×10^6個、78×10^6個、79×10^6個、80×10^6個、81×10^6個、82×10^6個、83×10^6個、84×10^6個、85×10^6個、86×10^6個、87×10^6個、88×10^6

個、89×10⁶個、90×10⁶個、91×10⁶個、92×10⁶個、93×10⁶個、94×10⁶個、95×10⁶個、96×10⁶個、97×10⁶個、98×10⁶個、99×10⁶個、100×10⁶個、101×10⁶個、102×10⁶個、103×10⁶個、104×10⁶個、105×10⁶個、106×10⁶個、107×10⁶個、108×10⁶個、109×10⁶個或110×10⁶個)活CD19特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，劑量係活CD19特異性CAR-T細胞之治療有效量。在其他實施例中，劑量係活CD19特異性CAR-T細胞之臨床有效量。在一些實施例中，活CD19特異性CAR-T細胞包括比率為約1:1之CD19特異性CAR表現CD4+ T細胞及CD19特異性CAR表現CD8+ T細胞。在一些實施例中，細胞之CD19特異性CAR係利基邁崙賽(BREYANZI®)、其結構等效物或其功能等效物。

【1168】在一些實施例中，向個體投與約50×10⁶至約110×10⁶個(例如50×10⁶個、51×10⁶個、52×10⁶個、53×10⁶個、54×10⁶個、55×10⁶個、56×10⁶個、57×10⁶個、58×10⁶個、59×10⁶個、60×10⁶個、61×10⁶個、62×10⁶個、63×10⁶個、64×10⁶個、65×10⁶個、66×10⁶個、67×10⁶個、68×10⁶個、69×10⁶個、70×10⁶個、71×10⁶個、72×10⁶個、73×10⁶個、74×10⁶個、75×10⁶個、76×10⁶個、77×10⁶個、78×10⁶個、79×10⁶個、80×10⁶個、81×10⁶個、82×10⁶個、83×10⁶個、84×10⁶個、85×10⁶個、86×10⁶個、87×10⁶個、88×10⁶個、89×10⁶個、90×10⁶個、91×10⁶個、92×10⁶個、93×10⁶個、94×10⁶個、95×10⁶個、96×10⁶個、97×10⁶個、98×10⁶個、99×10⁶個、100×10⁶個、101×10⁶個、102×10⁶個、

103×10^6個、104×10^6個、105×10^6個、106×10^6個、107×10^6個、108×10^6個、109×10^6個或110×10^6個)本文所述之活CD19特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，劑量係活CD19特異性CAR-T細胞之治療有效量。在其他實施例中，劑量係活CD19特異性CAR-T細胞之臨床有效量。在一些情況下，50%之活CD19特異性CAR-T細胞係CD19特異性CAR表現CD4+ T細胞，且50%之活CD19特異性CAR-T細胞係CD19特異性CAR表現CD8+ T細胞。在一些實施例中，細胞之CD19特異性CAR係利基邁崙賽(BREYANZI®)、其結構等效物或其功能等效物。

【1169】在一些實施例中，本文所述之CD19特異性CAR-T細胞係以約2×10^6 /kg體重之劑量投與個體。在一些實施例中，所投與之最大劑量係約2×10^8個活CD19特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，劑量係活CD19特異性CAR-T細胞之治療有效量。在其他實施例中，劑量係活CD19特異性CAR-T細胞之臨床有效量。在一些實施例中，細胞之CD19特異性CAR係與阿基崙賽(YESCARTA®)、其結構等效物或其功能等效物相同之CD19特異性CAR。

【1170】在一些實施例中，本文所述之CD19特異性CAR-T細胞係以約2×10^6 /kg體重之劑量投與個體。在一些實施例中，將約2×10^8個活CD19特異性CAR-T細胞之最大劑量投與約100 kg體重及以上之患者。在一些實施例中，劑量係活CD19特異性CAR-T細胞之治療有效量。在其他實施例中，劑量係活CD19特異性CAR-T細胞之臨床有效量。

在一些實施例中，細胞之CD19特異性CAR係與佈瑞基奧侖塞(TECARTUS®)、其結構等效物或其功能等效物相同之CD19特異性CAR。

【1171】在一些實施例中，本文所述之CD19特異性CAR-T細胞係以高達約2×10^8個活CD19特異性CAR-T細胞之劑量投與個體。在一些實施例中，對於體重為約50 kg或以下之個體，向個體投與約0.2×10^6至約5.0×10^6個(例如約0.2×10^6個、0.4×10^6個、0.5×10^6個、0.6×10^6個、0.8×10^6個、0.9×10^6個、1.0×10^6個、1.2×10^6個、1.4×10^6個、1.5×10^6個、1.6×10^6個、1.8×10^6個、1.9×10^6個、2.0×10^6個、2.2×10^6個、2.4×10^6個、2.5×10^6個、2.6×10^6個、2.8×10^6個、2.9×10^6個、3.0×10^6個、3.2×10^6個、3.4×10^6個、3.5×10^6個、3.6×10^6個、3.8×10^6個、3.9×10^6個、4.0×10^6個、4.2×10^6個、4.4×10^6個、4.5×10^6個、4.6×10^6個、4.8×10^6個、4.9×10^6個或5.0×10^6個)活CD19特異性CAR-T細胞/kg體重。在一些實施例中，對於體重大於約50 kg之個體，向個體投與約0.1×10^8至約2.5×10^8個(例如約0.1×10^6個、0.2×10^6個、0.4×10^6個、0.5×10^6個、0.6×10^6個、0.8×10^6個、0.9×10^6個、1.0×10^6個、1.2×10^6個、1.4×10^6個、1.5×10^6個、1.6×10^6個、1.8×10^6個、1.9×10^6個、2.0×10^6個、2.2×10^6個、2.4×10^6個或2.5×10^6個)活CD19特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，向個體投與約0.6×10^8至約6.0×10^8個(例如約0.6×10^8個、0.8×10^8個、0.9×10^8個、1.0×10^8個、1.2×10^8個、1.4×10^8個、1.5×10^8

個、1.6×10^8個、1.8×10^8個、1.9×10^8個、2.0×10^8個、2.2×10^8個、2.4×10^8個、2.5×10^8個、2.6×10^8個、2.8×10^8個、2.9×10^8個、3.0×10^8個、3.2×10^8個、3.4×10^8個、3.5×10^8個、3.6×10^8個、3.8×10^8個、3.9×10^8個、4.0×10^8個、4.2×10^8個、4.4×10^8個、4.5×10^8個、4.6×10^8個、4.8×10^8個、4.9×10^8個、5.0×10^8個、5.2×10^8個、5.4×10^8個、5.5×10^8個、5.6×10^8個、5.8×10^8個、5.9×10^8個或6.0×10^8個)活CD19特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，劑量係活CD19特異性CAR-T細胞之治療有效量。在其他實施例中，劑量係活CD19特異性CAR-T細胞之臨床有效量。在一些實施例中，細胞之CD19特異性CAR係與替沙崙賽(KYMRIAH®)、其結構等效物或其功能等效物相同之CD19特異性CAR。

【1172】在一些實施例中，本文所述之任一CD19特異性CAR-T細胞之單一劑量包括約50×10^6至約110×10^6個(例如50×10^6個、51×10^6個、52×10^6個、53×10^6個、54×10^6個、55×10^6個、56×10^6個、57×10^6個、58×10^6個、59×10^6個、60×10^6個、61×10^6個、62×10^6個、63×10^6個、64×10^6個、65×10^6個、66×10^6個、67×10^6個、68×10^6個、69×10^6個、70×10^6個、71×10^6個、72×10^6個、73×10^6個、74×10^6個、75×10^6個、76×10^6個、77×10^6個、78×10^6個、79×10^6個、80×10^6個、81×10^6個、82×10^6個、83×10^6個、84×10^6個、85×10^6個、86×10^6個、87×10^6個、88×10^6個、89×10^6個、90×10^6個、91×10^6個、92×10^6個、93×10^6個、94×10^6

個、95×10⁶個、96×10⁶個、97×10⁶個、98×10⁶個、99×10⁶個、100×10⁶個、101×10⁶個、102×10⁶個、103×10⁶個、104×10⁶個、105×10⁶個、106×10⁶個、107×10⁶個、108×10⁶個、109×10⁶個或110×10⁶個)活CD19特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，劑量係活CD19特異性CAR-T細胞之治療有效量。在其他實施例中，劑量係活CD19特異性CAR-T細胞之臨床有效量。在一些實施例中，活CD19特異性CAR-T細胞包括比率為約1:1之CD19特異性CAR表現CD4+ T細胞及CD19特異性CAR表現CD8+ T細胞。在一些實施例中，CD19特異性CAR係與利基邁崙賽(BREYANZI®)、其結構等效物或其功能等效物相同之CD19特異性CAR。

【1173】在一些實施例中，本文所述之任一CD19特異性CAR-T細胞之單一劑量包括約2×10⁸個活CD19特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，本文所述之任一CD19特異性CAR-T細胞之單一輸注袋包括約68 mL細胞懸浮液中之約2×10⁸個活CD19特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，CD19特異性CAR係與阿基崙賽(YESCARTA®)、其結構等效物或其功能等效物相同之CD19特異性CAR。

【1174】在一些實施例中，本文所述之任一CD19特異性CAR-T細胞之單一劑量包括約2×10⁸個活CD19特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，本文所述之任一CD19特異性CAR-T細胞之單一輸注袋包括約68 mL細胞懸浮液中之約2×10⁸個活CD19特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，CD19特異性CAR係與佈瑞基奧侖塞(TECARTUS®)、其結

構等效物或其功能等效物相同之CD19特異性CAR。

【1175】在一些實施例中，對於體重為50 kg或以下之個體，本文所述之任一CD19特異性CAR-T細胞之單一劑量包括約0.2×10^6至約5.0×10^6個(例如約0.2×10^6個、0.3×10^6個、0.4×10^6個、0.5×10^6個、0.6×10^6個、0.7×10^6個、0.8×10^6個、0.9×10^6個、1.0×10^6個、1.1×10^6個、1.2×10^6個、1.3×10^6個、1.4×10^6個、1.5×10^6個、1.6×10^6個、1.7×10^6個、1.8×10^6個、1.9×10^6個、2.0×10^6個、2.1×10^6個、2.2×10^6個、2.3×10^6個、2.4×10^6個、2.5×10^6個、2.6×10^6個、2.7×10^6個、2.8×10^6個、2.9×10^6個、3.0×10^6個、3.1×10^6個、3.2×10^6個、3.3×10^6個、3.4×10^6個、3.5×10^6個、3.6×10^6個、3.7×10^6個、3.8×10^6個、3.9×10^6個、4.0×10^6個、4.1×10^6個、4.2×10^6個、4.3×10^6個、4.4×10^6個、4.5×10^6個、4.6×10^6個、4.7×10^6個、4.8×10^6個、4.9×10^6個或5.0×10^6個)活CD19特異性CAR-T細胞/kg體重。在一些實施例中，對於體重大於50 kg之個體，本文所述之任一CD19特異性CAR-T細胞之單一劑量包括約0.1×10^8至約2.5×10^8個(例如約0.1×10^6個、0.2×10^6個、0.3×10^6個、0.4×10^6個、0.5×10^6個、0.6×10^6個、0.7×10^6個、0.8×10^6個、0.9×10^6個、1.0×10^6個、1.1×10^6個、1.2×10^6個、1.3×10^6個、1.4×10^6個、1.5×10^6個、1.6×10^6個、1.7×10^6個、1.8×10^6個、1.9×10^6個、2.0×10^6個、2.1×10^6個、2.2×10^6個、2.3×10^6個、2.4×10^6個或2.5×10^6個)活CD19特異性CAR-T細胞/kg體重。在一些實施

例中，本文所述之任一CD19特異性CAR-T細胞之單一劑量包括約0.6×10^8至約6.0×10^8個(例如約0.6×10^8個、0.7×10^8個、0.8×10^8個、0.9×10^8個、1.0×10^8個、1.1×10^8,1.2×10^8個、1.3×10^8個、1.4×10^8個、1.5×10^8個、1.6×10^8個、1.7×10^8個、1.8×10^8個、1.9×10^8個、2.0×10^8個、2.1×10^8個、2.2×10^8個、2.3×10^8個、2.4×10^8個、2.5×10^8個、2.6×10^8個、2.7×10^8個、2.8×10^8個、2.9×10^8個、3.0×10^8個、3.1×10^8個、3.2×10^8個、3.3×10^8個、3.4×10^8個、3.5×10^8個、3.6×10^8個、3.7×10^8個、3.8×10^8個、3.9×10^8個、4.0×10^8個、4.1×10^8個、4.2×10^8個、4.3×10^8個、4.4×10^8個、4.5×10^8個、4.6×10^8個、4.7×10^8個、4.8×10^8個、4.9×10^8個、5.0×10^8個、5.1×10^8個、5.2×10^8個、5.3×10^8個、5.4×10^8個、5.5×10^8個、5.6×10^8個、5.7×10^8個、5.8×10^8個、5.9×10^8個或6.0×10^8個)活CD19特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，本文所述之任一CD19特異性CAR-T細胞之單一輸注袋包括約10 mL至約50 mL細胞懸浮液中之約0.6×10^8至約6.0×10^8個(例如約0.6×10^8個、0.7×10^8個、0.8×10^8個、0.9×10^8個、1.0×10^8個、1.1×10^8個、1.2×10^8個、1.3×10^8個、1.4×10^8個、1.5×10^8個、1.6×10^8個、1.7×10^8個、1.8×10^8個、1.9×10^8個、2.0×10^8個、2.1×10^8個、2.2×10^8個、2.3×10^8個、2.4×10^8個、2.5×10^8個、2.6×10^8個、2.7×10^8個、2.8×10^8個、2.9×10^8個、3.0×10^8個、3.1×10^8個、3.2×10^8個、3.3×10^8個、3.4×10^8個、3.5×10^8個、3.6×10^8個、3.7×10^8個、3.8×10^8

個、3.9×10^8個、4.0×10^8個、4.1×10^8個、4.2×10^8個、4.3×10^8個、4.4×10^8個、4.5×10^8個、4.6×10^8個、4.7×10^8個、4.8×10^8個、4.9×10^8個、5.0×10^8個、5.1×10^8個、5.2×10^8個、5.3×10^8個、5.4×10^8個、5.5×10^8個、5.6×10^8個、5.7×10^8個、5.8×10^8個、5.9×10^8個或6.0×10^8個)活CD19特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，劑量係活CD19特異性CAR-T細胞之治療有效量。在其他實施例中，劑量係活CD19特異性CAR-T細胞之臨床有效量。在一些實施例中，細胞之CD19特異性CAR係與替沙崙賽(KYMRIAH®)、其結構等效物或其功能等效物相同之CD19特異性CAR。

【1176】在一些實施例中，本文所述之BCMA特異性(BCMA) CAR-T細胞係以下列劑量投與個體：約250×10^6至約500×10^6個(例如250×10^6個、255×10^6個、260×10^6個、265×10^6個、270×10^6個、275×10^6個、280×10^6個、285×10^6個、290×10^6個、295×10^6個、300×10^6個、305×10^6個、310×10^6個、315×10^6個、320×10^6個、325×10^6個、330×10^6個、335×10^6個、340×10^6個、345×10^6個、350×10^6個、355×10^6個、360×10^6個、365×10^6個、370×10^6個、375×10^6個、380×10^6個、385×10^6個、390×10^6個、395×10^6個、400×10^6個、405×10^6個、410×10^6個、415×10^6個、420×10^6個、425×10^6個、430×10^6個、435×10^6個、440×10^6個、445×10^6個、450×10^6個、455×10^6個、460×10^6個、465×10^6個、470×10^6個、475×10^6個、480×10^6個、485×10^6個、

490×10⁶個、495×10⁶個或500×10⁶個)活BCMA特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，劑量係活BCMA特異性CAR-T細胞之治療有效量。在其他實施例中，劑量係活BCMA特異性CAR-T細胞之臨床有效量。在一些實施例中，活BCMA特異性CAR-T細胞包括比率為約1:1之BCMA特異性CAR表現CD4+ T細胞及BCMA特異性CAR表現CD8+ T細胞。在一些實施例中，細胞之BCMA特異性CAR係艾基維侖塞(ABECEMA®)、其結構等效物或其功能等效物。

【1177】在一些實施例中，向個體投與約250×10⁶至約500×10⁶個(例如250×10⁶個、255×10⁶個、260×10⁶個、265×10⁶個、270×10⁶個、275×10⁶個、280×10⁶個、285×10⁶個、290×10⁶個、295×10⁶個、300×10⁶個、305×10⁶個、310×10⁶個、315×10⁶個、320×10⁶個、325×10⁶個、330×10⁶個、335×10⁶個、340×10⁶個、345×10⁶個、350×10⁶個、355×10⁶個、360×10⁶個、365×10⁶個、370×10⁶個、375×10⁶個、380×10⁶個、385×10⁶個、390×10⁶個、395×10⁶個、400×10⁶個、405×10⁶個、410×10⁶個、415×10⁶個、420×10⁶個、425×10⁶個、430×10⁶個、435×10⁶個、440×10⁶個、445×10⁶個、450×10⁶個、455×10⁶個、460×10⁶個、465×10⁶個、470×10⁶個、475×10⁶個、480×10⁶個、485×10⁶個、490×10⁶個、495×10⁶個或500×10⁶個)本文所述之活BCMA特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，劑量係活BCMA特異性CAR-T細胞之治療有效量。在其他實施例中，劑量係活BCMA特異性CAR-T細胞之臨床有效量。在一些情況

下，50%之活BCMA特異性CAR-T細胞係BCMA特異性CAR表現CD4+ T細胞，且50%之活BCMA特異性CAR-T細胞係BCMA特異性CAR表現CD8+ T細胞。在一些實施例中，細胞之BCMA特異性CAR係艾基維侖塞(ABECEMA®)、其結構等效物或其功能等效物。

【1178】在一些實施例中，本文所述之BCMA特異性CAR-T細胞係以高達約5×10^8個活BCMA特異性CAR-T細胞之劑量投與個體。在一些實施例中，向個體投與約2.5×10^8至約5.0×10^8個(例如約0.2×10^8個、0.4×10^8個、0.5×10^8個、0.6×10^8個、0.8×10^8個、0.9×10^8個、1.0×10^8個、1.2×10^8個、1.4×10^8個、1.5×10^8個、1.6×10^8個、1.8×10^8個、1.9×10^8個、2.0×10^8個、2.2×10^8個、2.4×10^8個、2.5×10^8個、2.6×10^8個、2.8×10^8個、2.9×10^8個、3.0×10^8個、3.2×10^8個、3.4×10^8個、3.5×10^8個、3.6×10^8個、3.8×10^8個、3.9×10^8個、4.0×10^8個、4.2×10^8個、4.4×10^8個、4.5×10^8個、4.6×10^8個、4.8×10^8個、4.9×10^8個或5.0×10^8個)活BCMA特異性CAR-T細胞/kg體重。在一些實施例中，劑量係活BCMA特異性CAR-T細胞之治療有效量。在其他實施例中，劑量係活BCMA特異性CAR-T細胞之臨床有效量。在一些實施例中，細胞之BCMA特異性CAR係與艾基維侖塞(ABECEMA®)、其結構等效物或其功能等效物相同之BCMA特異性CAR。

【1179】在一些實施例中，本文所述之任一BCMA特異性CAR-T細胞之單一劑量包括約250×10^6至約500×10^6個

(例如250×10⁶個、255×10⁶個、260×10⁶個、265×10⁶個、270×10⁶個、275×10⁶個、280×10⁶個、285×10⁶個、290×10⁶個、295×10⁶個、300×10⁶個、305×10⁶個、310×10⁶個、315×10⁶個、320×10⁶個、325×10⁶個、330×10⁶個、335×10⁶個、340×10⁶個、345×10⁶個、350×10⁶個、355×10⁶個、360×10⁶個、365×10⁶個、370×10⁶個、375×10⁶個、380×10⁶個、385×10⁶個、390×10⁶個、395×10⁶個、400×10⁶個、405×10⁶個、410×10⁶個、415×10⁶個、420×10⁶個、425×10⁶個、430×10⁶個、435×10⁶個、440×10⁶個、445×10⁶個、450×10⁶個、455×10⁶個、460×10⁶個、465×10⁶個、470×10⁶個、475×10⁶個、480×10⁶個、485×10⁶個、490×10⁶個、495×10⁶個或500×10⁶個)活BCMA特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，劑量係活BCMA特異性CAR-T細胞之治療有效量。在其他實施例中，劑量係活BCMA特異性CAR-T細胞之臨床有效量。在一些實施例中，活BCMA特異性CAR-T細胞包括比率為約1:1之BCMA特異性CAR表現CD4+ T細胞及BCMA特異性CAR表現CD8+ T細胞。在一些實施例中，BCMA特異性CAR係與艾基維侖塞(ABECEMA®)、其結構等效物或其功能等效物相同之BCMA特異性CAR。

【1180】在一些實施例中，本文所述之任一BCMA特異性CAR-T細胞之單一劑量包括約250×10⁶至約500×10⁶個(例如250×10⁶個、255×10⁶個、260×10⁶個、265×10⁶個、270×10⁶個、275×10⁶個、280×10⁶個、285×10⁶個、290×10⁶個、295×10⁶個、300×10⁶個、305×10⁶個、310×10⁶個、

315×10⁶個、320×10⁶個、325×10⁶個、330×10⁶個、335×10⁶個、340×10⁶個、345×10⁶個、350×10⁶個、355×10⁶個、360×10⁶個、365×10⁶個、370×10⁶個、375×10⁶個、380×10⁶個、385×10⁶個、390×10⁶個、395×10⁶個、400×10⁶個、405×10⁶個、410×10⁶個、415×10⁶個、420×10⁶個、425×10⁶個、430×10⁶個、435×10⁶個、440×10⁶個、445×10⁶個、450×10⁶個、455×10⁶個、460×10⁶個、465×10⁶個、470×10⁶個、475×10⁶個、480×10⁶個、485×10⁶個、490×10⁶個、495×10⁶個或500×10⁶個)活BCMA特異性CAR-T細胞/kg體重。在一些實施例中，本文所述之任一BCMA特異性CAR-T細胞之單一劑量包括約2.5×10⁸至約5.0×10⁸個(例如約0.2×10⁸個、0.4×10⁸個、0.5×10⁸個、0.6×10⁸個、0.8×10⁸個、0.9×10⁸個、1.0×10⁸個、1.2×10⁸個、1.4×10⁸個、1.5×10⁸個、1.6×10⁸個、1.8×10⁸個、1.9×10⁸個、2.0×10⁸個、2.2×10⁸個、2.4×10⁸個、2.5×10⁸個、2.6×10⁸個、2.8×10⁸個、2.9×10⁸個、3.0×10⁸個、3.2×10⁸個、3.4×10⁸個、3.5×10⁸個、3.6×10⁸個、3.8×10⁸個、3.9×10⁸個、4.0×10⁸個、4.2×10⁸個、4.4×10⁸個、4.5×10⁸個、4.6×10⁸個、4.8×10⁸個、4.9×10⁸個或5.0×10⁸個)活BCMA特異性CAR-T細胞/kg體重。在一些實施例中，本文所述之任一BCMA特異性CAR-T細胞之單一劑量包括約2.5×10⁸至約5.0×10⁸個(例如約0.2×10⁸個、0.4×10⁸個、0.5×10⁸個、0.6×10⁸個、0.8×10⁸個、0.9×10⁸個、1.0×10⁸個、1.2×10⁸個、1.4×10⁸個、1.5×10⁸個、1.6×10⁸個、1.8×10⁸個、

1.9×10^{8}個、2.0×10^{8}個、2.2×10^{8}個、2.4×10^{8}個、2.5×10^{8}個、2.6×10^{8}個、2.8×10^{8}個、2.9×10^{8}個、3.0×10^{8}個、3.2×10^{8}個、3.4×10^{8}個、3.5×10^{8}個、3.6×10^{8}個、3.8×10^{8}個、3.9×10^{8}個、4.0×10^{8}個、4.2×10^{8}個、4.4×10^{8}個、4.5×10^{8}個、4.6×10^{8}個、4.8×10^{8}個、4.9×10^{8}個或5.0×10^{8}個)活BCMA特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，本文所述之任一BCMA特異性CAR-T細胞之單一輸注袋包括約10 mL至約500 mL細胞懸浮液中之約2.5×10^{8}至約5.0×10^{8}個(例如約0.2×10^{8}個、0.4×10^{8}個、0.5×10^{8}個、0.6×10^{8}個、0.8×10^{8}個、0.9×10^{8}個、1.0×10^{8}個、1.2×10^{8}個、1.4×10^{8}個、1.5×10^{8}個、1.6×10^{8}個、1.8×10^{8}個、1.9×10^{8}個、2.0×10^{8}個、2.2×10^{8}個、2.4×10^{8}個、2.5×10^{8}個、2.6×10^{8}個、2.8×10^{8}個、2.9×10^{8}個、3.0×10^{8}個、3.2×10^{8}個、3.4×10^{8}個、3.5×10^{8}個、3.6×10^{8}個、3.8×10^{8}個、3.9×10^{8}個、4.0×10^{8}個、4.2×10^{8}個、4.4×10^{8}個、4.5×10^{8}個、4.6×10^{8}個、4.8×10^{8}個、4.9×10^{8}個或5.0×10^{8}個)活BCMA特異性CAR-T細胞。在一些實施例中，細胞懸浮液係約50 mL、250 mL或約500 mL。在一些實施例中，劑量係活BCMA特異性CAR-T細胞之治療有效量。在其他實施例中，劑量係活BCMA特異性CAR-T細胞之臨床有效量。在一些實施例中，細胞之BCMA特異性CAR係與艾基維侖塞(ABECEMA®)、其結構等效物或其功能等效物相同之BCMA特異性CAR。

II. 投與低免疫原性細胞(包括T細胞)之方法

【1181】如本文進一步詳細闡述，本文提供經由投與低免疫原性細胞、具體而言低免疫原性T細胞治療患有疾患、病症或病症之患者的方法。如應瞭解，對於與療法之時間及/或組合相關之本文所述之所有多個實施例，細胞之投與係藉由導致所引入之細胞至少部分定位於期望位點之方法或途徑來完成。細胞可直接輸注、植入或移植至期望位點，或替代地藉由可遞送至個體中之期望位置之任一適當途徑投與，其中所植入細胞或細胞組分之至少一部分保持為活的。

【1182】本文提供治療患有疾患、病症或病症之患者之方法，其包括向個體(例如人類患者)投與低免疫原性細胞之群體(*例如*原代T細胞、自低免疫原性誘導性多能幹細胞分化之T細胞或自本文所述之低免疫原性誘導性多能幹細胞分化之其他細胞)。例如，將低免疫原性原代T細胞之群體(例如但不限於CD3+ T細胞、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、幼稚T細胞、調控T (Treg)細胞、非調控T細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th9細胞、Th17細胞、T濾泡性輔助(Tfh)細胞、細胞毒性T淋巴球(CTL)、效應T (Teff)細胞、中央記憶T (Tcm)細胞、效應記憶T (Tem)細胞、表現CD45RA之效應記憶T細胞(TEMRA細胞)、組織駐留記憶(Trm)細胞、虛擬記憶T細胞、先天記憶T細胞、記憶幹細胞(Tsc)、γδ T細胞及T細胞之任何其他亞型)投與患者來治療疾患、病症或病症。在一些實施例中，免疫阻抑及/或免

疫調節劑(例如但不限於淋巴清除劑)並未在投與低免疫原性細胞群體之前投與患者。在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑係在投與細胞之前至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天或更長時間投與。在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑係在投與細胞之前至少1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間投與。在多個實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑並未在投與細胞後投與患者，或在投與細胞後至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天或更長時間投與。在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑係在投與細胞後至少1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間投與。在其中在投與細胞之前或之後向患者投與免疫阻抑及/或免疫調節劑之一些實施例中，投與之劑量低於具有一或多種MHC I及/或MHC II分子表現且不具外源CD47表現之細胞所必需之劑量。

【1183】免疫阻抑及/或免疫調節劑(例如但不限於淋巴清除劑)之非限制性實例包括環孢素、硫唑嘌呤、黴酚酸、麥考酚酸嗎乙酯、皮質類固醇(例如普賴鬆)、胺甲喋呤、金鹽、柳氮磺吡啶、抗瘧疾藥、佈喹那、來氟米特、咪唑立賓、15-去氧精胍菌素、6-巰基嘌呤、環磷醯胺、雷帕黴素、他克莫司(FK-506)、OKT3、抗胸腺細胞球蛋白、胸腺噴丁、胸腺素-α及類似劑。在一些實施例中，免

疫阻抑及/或免疫調節劑選自由以下組成之免疫阻抑抗體之群：結合至IL-2受體之p75之抗體、結合至例如MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD28、B7、CD40、CD45、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6R、IL-6、IGF、IGFR1、IL-7、IL-8、IL-10、CD11a或CD58之抗體及結合至其配位體中之任一者之抗體。在一些實施例中，該免疫阻抑及/或免疫調節劑可選自可溶性IL-15R、IL-10、B7分子(*例如*B7-1、B7-2、其變異體及其片段)、ICOS及OX40、T細胞負調控劑之抑制劑(例如針對CTLA-4之抗體)及類似劑。

【1184】在一些實施例中，在投與細胞之前或之後向患者投與免疫阻抑及/或免疫調節劑時，投與之劑量低於具有一或多種MHC I及/或MHC II分子表現、TCR表現且不具外源CD47表現之細胞所必需之劑量。在一些實施例中，在第一次投與細胞之前或之後向患者投與免疫阻抑及/或免疫調節劑時，投與之劑量低於具有一或多種MHC I及MHC II表現、TCR表現且不具外源CD47表現之細胞所必需之劑量。

【1185】在一些實施例中，所述細胞係與一或多種選自由以下組成之群之受體結合及/或相互作用之治療劑共投與：CD94、KIR2DL4、PD-1、抑制性NK細胞受體及活化NK受體。在一些情況下，治療劑結合至NK細胞(包括一或多個NK細胞亞群)表面上之受體。在一些實施例中，治療劑選自由以下組成之群：抗體及其片段及變異體、抗體

模擬物、小分子、阻斷肽及受體拮抗劑。

【1186】對於治療應用，根據所揭示方法製備之細胞通常可以包含等滲賦形劑之醫藥組合物之形式供應，且在對人類投與足夠無菌之條件下製備。關於細胞組合物之藥物調配物之一般原則參見「Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy」，Morstyn及Sheridan編輯，Cambridge University Press, 1996；及「Hematopoietic Stem Cell Therapy」, E. D. Ball, J. Lister及P. Law, Churchill Livingstone, 2000。細胞可封裝於適於分配或臨床使用之裝置或容器中。

【1187】在一些實施例中，本文所述之細胞禁忌用於對鼠類蛋白、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞蛋白或本文所述組合物之任一組分具有已知I型超敏或過敏反應之患者。在一些實施例中，本文所述之細胞禁忌用於患有或曾經患有進行性多灶性白質腦病(PML)之患者。在一些實施例中，本文所述之細胞不建議用於患有重度活動性感染之患者。

【1188】在一些實施例中，將本文所述之細胞投與先前已用利妥昔單抗(RITUXAN®)治療之患有自體免疫疾病/病症及/或發炎性疾病/病症之個體。在一些實施例中，將本文所述之細胞投與先前已用利妥昔單抗(RITUXAN®)治療且已對利妥昔單抗治療失敗及/或無反應之患有自體免疫疾病/病症及/或發炎性疾病/病症之個體。在一些實施例中，患者患有類風濕性關節炎(RA)。在一些實施例中，患者患有RA且利妥昔單抗治療與胺甲喋呤組合。在一些實

施例中，患者係患有中度至重度活動性RA之成年患者。在一些實施例中，患者係患有中度至重度活動性RA且利妥昔單抗治療與胺甲喋呤組合之成年患者。在一些實施例中，患者係對一或多種TNF拮抗劑療法之反應不足且利妥昔單抗治療與胺甲喋呤組合之患有中度至重度活動性RA之成年患者。在一些實施例中，與胺甲喋呤組合之用於RA之利妥昔單抗劑量係每24週及/或基於臨床評估間隔2週(一個療程)、但不快於每16週之兩次1000 mg靜脈內輸注。在一些實施例中，建議在每次輸注前30分鐘甲基普賴蘇濃(Methylprednisolone) 100 mg靜脈內或等效糖皮質素。

【1189】在一些實施例中，將本文所述之細胞投與先前已用利妥昔單抗(RITUXAN®)治療之患有自體免疫疾病/病症及/或發炎性疾病/病症之個體。在一些實施例中，將本文所述之細胞投與先前已用利妥昔單抗(RITUXAN®)治療且已對利妥昔單抗治療失敗及/或無反應之患有自體免疫疾病/病症及/或發炎性疾病/病症之個體。在一些實施例中，患者患有肉芽腫伴多血管炎(GPA) (華格納氏肉芽腫(Wegener's Granulomatosis))。在一些實施例中，患者患有與糖皮質素組合之成年患者之顯微多血管炎(MPA)。在一些實施例中，與糖皮質素組合之用於GPA及MPA之利妥昔單抗劑量係375 mg/m^2 每週一次持續4週。在一些實施例中，利妥昔單抗係以一次性小瓶中之100 mg/10 mL溶液投與。在一些實施例中，利妥昔單抗係以一次性小瓶中之500 mg/50 mL溶液投與。

免疫阻抑劑

【1190】在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑並未在第一次投與經改造原代細胞群體或含有其之組合物之前投與患者。

【1191】在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑可投與接受經改造原代細胞投與之患者。在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑係在投與經改造原代細胞之前投與。在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑係在投與經改造原代細胞之第一次及/或第二次投與之前投與。

【1192】免疫阻抑及/或免疫調節劑之非限制性實例包括環孢素、硫唑嘌呤、黴酚酸、麥考酚酸嗎乙酯、皮質類固醇(例如普賴鬆)、胺甲喋呤、金鹽、柳氮磺吡啶、抗瘧疾藥、佈喹那、來氟米特、咪唑立賓、15-去氧精胍菌素、6-巰基嘌呤、環磷醯胺、雷帕黴素、他克莫司(FK-506)、OKT3、抗胸腺細胞球蛋白、胸腺噴丁、胸腺素-α及類似劑。在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑選自由以下組成之免疫阻抑抗體之群：結合至IL-2受體之p75之抗體、結合至例如MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD28、B7、CD40、CD45、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6R、IL-6、IGF、IGFR1、IL-7、IL-8、IL-10、CD11a或CD58之抗體及結合至其配位體中之任一者之抗體。在其中在第一次投與細胞之前或之後向患者投與免疫阻抑及

/或免疫調節劑之一些實施例中，投與之劑量低於具有一或多種MHC I類分子及/或一或多種MHC II類分子表現且不具外源CD47表現之細胞所必需之劑量。

【1193】在一個實施例中，該免疫阻抑及/或免疫調節劑可選自可溶性IL-15R、IL-10、B7分子(例如B7-1、B7-2、其變異體及其片段)、ICOS及OX40、T細胞負調控劑之抑制劑(例如針對CTLA-4之抗體)及類似劑。

【1194】在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑可在第一次投與經改造原代細胞群體之前投與患者。在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑係在第一次投與細胞之前至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天或更長時間投與。在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑係在第一次投與細胞之前至少1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間投與。

【1195】在具體實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑並未在第一次投與細胞後投與患者，或在第一次投與細胞後至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天或更長時間投與。在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑係在第一次投與細胞後至少1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間投與。

【1196】在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑並未在投與經改造細胞群體之前投與患者。在許多實施

例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑係在第一次及/或第二次投與經改造原代細胞群體之前投與患者。在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑係在投與細胞之前至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天或更長時間投與。在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑係在第一次及/或第二次投與細胞之前至少1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間投與。在具體實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑係在投與細胞後至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天或更長時間投與。在一些實施例中，免疫阻抑及/或免疫調節劑係在第一次及/或第二次投與細胞後至少1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間投與。

【1197】在其中在投與細胞之前或之後向患者投與免疫阻抑及/或免疫調節劑之一些實施例中，投與之劑量低於免疫原性細胞(例如經改造原代細胞之相同或相似之細胞類型或表型但不含修飾(例如遺傳修飾)之細胞群體，例如具有一或多種MHC I類分子及/或一或多種MHC II類分子表現且不具外源CD47表現)所必需之劑量。

其他實施例

【1198】在一些實施例中，本文提供經改造細胞，其包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，i)減少一

或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加一或多種耐受原性因子之表現的可調控修飾。

【1199】在一些實施例中，本文提供低免疫原性細胞，其包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加一或多種耐受原性因子之表現的可調控修飾。

【1200】在一些實施例中，可調控修飾包含一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之可調控敲除。

【1201】在一些實施例中，可調控修飾包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞一或多個選自B2M及CIITA之靶之可調控減少的表現。

【1202】在一些實施例中，可調控修飾包含一或多個選自B2M及CIITA之靶之可調控敲除。

【1203】在一些實施例中，本文提供經改造細胞，其包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，i)減少一或多個選自β-2微球蛋白(B2M)及MHC II類反式活化劑(CIITA)之靶之表現，及ii)增加一或多種耐受原性因子之表現的可調控修飾。

【1204】在一些實施例中，本文提供低免疫原性細胞，其包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，i)減少一或多個選自β-2微球蛋白(B2M)及MHC II類反式活化

劑(CIITA)之靶之表現，及ii)增加一或多種耐受原性因子之表現的可調控修飾。

【1205】在一些實施例中，細胞進一步包含減少或敲除一或多種Y染色體基因之表現之可調控修飾。

【1206】在一些實施例中，細胞包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞減少或敲除一或多個選自Y連鎖原鈣黏蛋白-11及Y連鎖神經配蛋白-4之靶之表現的可調控修飾。

【1207】在一些實施例中，可調控修飾包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞減少或敲除一或多個靶之表現的基於RNA之條件或可誘導組分。

【1208】在一些實施例中，基於RNA之條件或可誘導組分選自由以下組成之群：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。

【1209】在一些實施例中，基於RNA之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【1210】在一些實施例中，基於RNA之可誘導組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1211】在一些實施例中，可調控修飾包含相對於不

包含修飾之相同細胞類型之細胞減少或敲除一或多個靶之表現的基於DNA之條件或可誘導組分。

【1212】在一些實施例中，基於DNA之條件或可誘導組分係使用選自由以下組成之群之方法敲除：條件或可誘導CRISPR、條件或可誘導TALEN、條件或可誘導鋅指核酸酶、條件或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件或可誘導大範圍核酸酶。

【1213】在一些實施例中，基於DNA之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【1214】在一些實施例中，基於DNA之條件組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1215】在一些實施例中，可調控修飾包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞減少或敲除一或多個靶之表現的基於蛋白質之條件或可誘導組分。

【1216】在一些實施例中，基於蛋白質之條件或可誘導組分係條件或可誘導降解子方法。

【1217】在一些實施例中，條件或可誘導降解子方法選自由以下組成之群：使用SMASH標籤之配位體誘導之降解(LID)、使用Shield-1之LID、使用生長素之LID、使用雷帕黴素之LID、條件或可誘導肽降解子(*例如*基於IKZF3

之降解子)及條件或可誘導蛋白水解靶向嵌合體(PROTAC)。

【1218】在一些實施例中，基於蛋白質之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【1219】在一些實施例中，基於蛋白質之組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1220】在一些實施例中，細胞包含可操作連接至外源多核苷酸之條件啟動子，該外源多核苷酸編碼一或多種耐受原性因子。

【1221】在一些實施例中，細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之條件啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼一或多種耐受原性因子之貨物多核苷酸。

【1222】在一些實施例中，條件啟動子係細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。

【1223】在一些實施例中，細胞包含可操作連接至外源多核苷酸之可誘導啟動子，該外源多核苷酸編碼一或多種耐受原性因子。

【1224】在一些實施例中，細胞包含(i)包含可操作連

接至轉座酶之可誘導啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼一或多種耐受原性因子之貨物多核苷酸。

【1225】在一些實施例中，可誘導啟動子係由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1226】在一些實施例中，一或多種耐受原性因子選自由以下組成之群：HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、PD-L1、CTLA-4-Ig、CD47、CI抑制劑及IL-35。

【1227】在一些實施例中，細胞包含可操作連接至編碼CD47之外源多核苷酸之條件或可誘導啟動子。

【1228】在一些實施例中，細胞包含與SEQ ID NO:13之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之CD47多肽。

【1229】在一些實施例中，細胞包含與SEQ ID NO:14之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之CD47多肽。

【1230】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現增加量之CD47。

【1231】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之CD47。

【1232】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之CD47。

【1233】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約1000%之量之CD47。

【1234】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞進一步包含減少以下之表現之可調控修飾：B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【1235】在一些實施例中，細胞並不表現B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【1236】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞進一步包含增加以下中之一或多者之表現的可調控修飾：CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。

【1237】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、

CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。

【1238】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。

【1239】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約1000%之量之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。

【1240】在一些實施例中，細胞衍生自人類細胞或動物細胞。

【1241】在一些實施例中，人類細胞或動物細胞係多能幹細胞。

【1242】在一些實施例中，多能幹細胞係誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)或胚胎幹細胞(ESC)。

【1243】在一些實施例中，經改造細胞或低免疫原性

細胞係衍生自多能幹細胞之分化細胞或其子代。

【1244】在一些實施例中，多能幹細胞係誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)或胚胎幹細胞(ESC)。

【1245】在一些實施例中，分化細胞選自由以下組成之群：T細胞、自然殺手(NK)細胞、內皮細胞、胰島細胞、心肌細胞、平滑肌細胞、骨骼肌細胞、肝細胞、神經膠質祖細胞、多巴胺能神經元、視網膜色素上皮細胞及甲狀腺細胞。

【1246】在一些實施例中，經改造細胞或低免疫原性細胞係原代免疫細胞或其子代。

【1247】在一些實施例中，原代免疫細胞或其子代係T細胞或NK細胞。

【1248】在一些實施例中，T細胞進一步包含減少的T細胞受體(TCR)-α及/或TCR-β表現。

【1249】在一些實施例中，T細胞並不表現TCR-α及/或TCR-β。

【1250】在一些實施例中，T細胞進一步包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之第二外源多核苷酸。

【1251】在一些實施例中，第一及/或第二外源多核苷酸插入細胞之至少一個對偶基因之第一及/或第二特定基因座中。

【1252】在一些實施例中，第一及/或第二特定基因座選自由以下組成之群：安全港基因座、靶基因座、*RHD*基因座、*B2M*基因座、*CIITA*基因座、*TRAC*基因座及*TRB*

基因座。

【1253】在一些實施例中，安全港基因座選自由以下組成之群：*CCR5*基因座、*PPP1R12C*基因座、*Rosa*基因座及*CLYBL*基因座。

【1254】在一些實施例中，靶基因座選自由以下組成之群：*CXCR4*基因座、*ALB*基因座、*SHS231*基因座、*F3*(*CD142*)基因座、*MICA*基因座、*MICB*基因座、*LRP1*(*CD91*)基因座、*HMGB1*基因座、*ABO*基因座、*FUT1*基因座及*KDM5D*基因座。

【1255】在一些實施例中，使用慢病毒載體將第一及/或第二外源多核苷酸引入經改造細胞或低免疫原性細胞中。

【1256】在一些實施例中，使用選自由以下組成之群之促融劑介導之遞送或轉座酶系統將第一及/或第二外源多核苷酸引入經改造細胞或低免疫原性細胞中：條件性或可誘導轉座酶、條件性或可誘導PiggyBac轉座子、條件性或可誘導睡美人(SB11)轉座子、條件性或可誘導Mos1轉座子及條件性或可誘導Tol2轉座子。

【1257】在一些實施例中，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後逃避NK細胞介導之細胞毒性。

【1258】在一些實施例中，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後經保護免於成熟NK細胞之細胞溶解。

【1259】在一些實施例中，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後逃避巨噬細胞吞噬。

【1260】在一些實施例中，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之先天及/或適應性免疫反應。

【1261】在一些實施例中，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之基於抗體之免疫反應。

【1262】在一些實施例中，本文提供經改造細胞，其包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞增加CD47之表現之可調控修飾。

【1263】在一些實施例中，本文提供低免疫原性細胞，其包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞增加CD47之表現之可調控修飾。

【1264】在一些實施例中，細胞包含可操作連接至編碼CD47之外源多核苷酸之條件啟動子。

【1265】在一些實施例中，細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之條件啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼CD47之貨物多核苷酸。

【1266】在一些實施例中，條件啟動子係細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。

【1267】在一些實施例中，細胞包含可操作連接至編碼CD47之外源多核苷酸之可誘導啟動子。

【1268】在一些實施例中，細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之可誘導啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼CD47之貨物多核苷酸。

【1269】在一些實施例中，可誘導啟動子係由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1270】在一些實施例中，外源多核苷酸細胞包含與SEQ ID NO:13之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之CD47多肽。

【1271】在一些實施例中，細胞包含與SEQ ID NO:14之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之CD47多肽。

【1272】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現增加量之CD47。

【1273】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之CD47。

【1274】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之CD47。

【1275】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同

細胞類型之細胞，細胞表現至少高約1000%之量之CD47。

【1276】在一些實施例中，細胞進一步包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現的可調控修飾。

【1277】在一些實施例中，細胞包含一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之可調控敲除。

【1278】在一些實施例中，可調控修飾包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞一或多個選自B2M及CIITA之靶之可調控減少的表現。

【1279】在一些實施例中，可調控修飾包含一或多個選自B2M及CIITA之靶之可調控敲除。

【1280】在一些實施例中，細胞進一步包含減少或敲除一或多種Y染色體基因之表現之可調控修飾。

【1281】在一些實施例中，細胞包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞減少或敲除一或多個選自Y連鎖原鈣黏蛋白-11及Y連鎖神經配蛋白-4之靶之表現的可調控修飾。

【1282】在一些實施例中，可調控修飾包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞減少或敲除一或多個靶之表現的基於RNA之條件或可誘導組分。

【1283】在一些實施例中，基於RNA之條件或可誘導組分選自由以下組成之群：條件或可誘導shRNA、條件或

可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。

【1284】在一些實施例中，基於RNA之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【1285】在一些實施例中，基於RNA之可誘導組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1286】在一些實施例中，可調控修飾包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞減少或敲除一或多個靶之表現的基於DNA之條件或可誘導組分。

【1287】在一些實施例中，基於DNA之條件或可誘導組分係使用選自由以下組成之群之方法敲除：條件或可誘導CRISPR、條件或可誘導TALEN、條件或可誘導鋅指核酸酶、條件或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件或可誘導大範圍核酸酶。

【1288】在一些實施例中，基於DNA之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【1289】在一些實施例中，基於DNA之條件組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位

體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1290】在一些實施例中，可調控修飾包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞減少或敲除一或多個靶之表現的基於蛋白質之條件或可誘導組分。

【1291】在一些實施例中，基於蛋白質之條件或可誘導組分係條件或可誘導降解子方法。

【1292】在一些實施例中，條件或可誘導降解子方法選自由以下組成之群：使用SMASH標籤之配位體誘導之降解(LID)、使用Shield-1之LID、使用生長素之LID、使用雷帕黴素之LID、條件或可誘導肽降解子(*例如*基於IKZF3之降解子)及條件或可誘導蛋白水解靶向嵌合體(PROTAC)。

【1293】在一些實施例中，基於蛋白質之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【1294】在一些實施例中，基於蛋白質之組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1295】在一些實施例中，細胞進一步包含可操作連接至外源多核苷酸之條件啟動子，該外源多核苷酸編碼一或多種其他耐受原性因子。

【1296】在一些實施例中，細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之條件啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼一或多種其他耐受原性因子之貨物多核苷酸。

【1297】在一些實施例中，條件啟動子係細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。

【1298】在一些實施例中，細胞包含可操作連接至外源多核苷酸之可誘導啟動子，該外源多核苷酸編碼一或多種其他耐受原性因子。

【1299】在一些實施例中，細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之可誘導啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼一或多種其他耐受原性因子之貨物多核苷酸。

【1300】在一些實施例中，可誘導啟動子係由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1301】在一些實施例中，一或多種其他耐受原性因子選自由以下組成之群：HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、PD-L1、CTLA-4-Ig、CI抑制劑及IL-35。

【1302】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞進一步包含減少以下之表現之可調控修飾：B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/

或RHD。

【1303】在一些實施例中，細胞並不表現B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【1304】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞進一步包含增加以下中之一或多者之表現的可調控修飾：CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。

【1305】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。

【1306】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、

CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。

【1307】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約1000%之量之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。

【1308】在一些實施例中，細胞衍生自人類細胞或動物細胞。

【1309】在一些實施例中，人類細胞或動物細胞係多能幹細胞。

【1310】在一些實施例中，多能幹細胞係誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)或胚胎幹細胞(ESC)。

【1311】在一些實施例中，經改造細胞或低免疫原性細胞係衍生自多能幹細胞之分化細胞或其子代。

【1312】在一些實施例中，多能幹細胞係誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)或胚胎幹細胞(ESC)。

【1313】在一些實施例中，分化細胞選自由以下組成之群：T細胞、自然殺手(NK)細胞、內皮細胞、胰島細胞、心肌細胞、平滑肌細胞、骨骼肌細胞、肝細胞、神經

膠質祖細胞、多巴胺能神經元、視網膜色素上皮細胞及甲狀腺細胞。

【1314】在一些實施例中，經改造細胞或低免疫原性細胞係原代免疫細胞或其子代。

【1315】在一些實施例中，原代免疫細胞或其子代係T細胞或NK細胞。

【1316】在一些實施例中，T細胞進一步包含減少的T細胞受體(TCR)-α及/或TCR-β表現。

【1317】在一些實施例中，T細胞並不表現TCR-α及/或TCR-β。

【1318】在一些實施例中，T細胞進一步包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之第二外源多核苷酸。

【1319】在一些實施例中，第一及/或第二外源多核苷酸插入細胞之至少一個對偶基因之第一及/或第二特定基因座中。

【1320】在一些實施例中，第一及/或第二特定基因座選自由以下組成之群：安全港基因座、靶基因座、*RHD*基因座、*B2M*基因座、*CIITA*基因座、*TRAC*基因座及*TRB*基因座。

【1321】在一些實施例中，安全港基因座選自由以下組成之群：*CCR5*基因座、*PPP1R12C*基因座、*Rosa*基因座及*CLYBL*基因座。

【1322】在一些實施例中，靶基因座選自由以下組成之群：*CXCR4*基因座、*ALB*基因座、*SHS231*基因座、*F3*

(*CD142*)基因座、*MICA*基因座、*MICB*基因座、*LRP1*(*CD91*)基因座、*HMGB1*基因座、*ABO*基因座、*FUT1*基因座及*KDM5D*基因座。

【1323】在一些實施例中，使用慢病毒載體將第一及/或第二外源多核苷酸引入經改造細胞或低免疫原性細胞中。

【1324】在一些實施例中，使用選自由以下組成之群之促融劑介導之遞送或轉座酶系統將第一及/或第二外源多核苷酸引入經改造細胞或低免疫原性細胞中：條件性或可誘導轉座酶、條件性或可誘導PiggyBac轉座子、條件性或可誘導睡美人(SB11)轉座子、條件性或可誘導Mos1轉座子及條件性或可誘導Tol2轉座子。

【1325】在一些實施例中，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後逃避NK細胞介導之細胞毒性。

【1326】在一些實施例中，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後經保護免於成熟NK細胞之細胞溶解。

【1327】在一些實施例中，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後逃避巨噬細胞吞噬。

【1328】在一些實施例中，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之先天及/或適應性免疫反應。

【1329】在一些實施例中，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之基於抗體之免疫反應。

【1330】在一些實施例中，本文提供經改造內皮細胞，其包含相對於不包含修飾之內皮細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中內皮細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1331】在一些實施例中，本文提供經改造胰島細胞，其包含相對於不包含修飾之胰島細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中胰島細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1332】在一些實施例中，本文提供經改造心肌細胞，其包含相對於不包含修飾之心肌細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表

現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中心肌細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1333】在一些實施例中，本文提供經改造平滑肌細胞，其包含相對於不包含修飾之平滑肌細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中平滑肌細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1334】在一些實施例中，本文提供經改造骨骼肌細胞，其包含相對於不包含修飾之骨骼肌細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中骨骼肌細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1335】在一些實施例中，本文提供經改造肝細胞，其包含相對於不包含修飾之肝細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中肝細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1336】在一些實施例中，本文提供經改造神經膠質祖細胞，其包含相對於不包含修飾之神經膠質祖細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中神經膠質祖細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1337】在一些實施例中，本文提供經改造多巴胺能神經元，其包含相對於不包含修飾之多巴胺能神經元，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、

80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中多巴胺能神經元衍生自多能幹細胞或其子代。

【1338】在一些實施例中，本文提供經改造視網膜色素上皮細胞，其包含相對於不包含修飾之視網膜色素上皮細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中視網膜色素上皮細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1339】在一些實施例中，本文提供經改造甲狀腺細胞，其包含相對於不包含修飾之甲狀腺細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中甲狀腺細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1340】在一些實施例中，本文提供經改造T細胞，其包含相對於不包含修飾之T細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/

或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，其中T細胞視情況地進一步包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之外源多核苷酸，且其中T細胞衍生自多能幹細胞或其子代，或T細胞係原代免疫細胞或其子代。

【1341】在一些實施例中，本文提供經改造NK細胞，其包含相對於不包含修飾之NK細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，其中NK細胞視情況地進一步包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之外源多核苷酸，且其中NK細胞衍生自多能幹細胞或其子代，或NK細胞係原代免疫細胞或其子代。

【1342】在一些實施例中，本文提供細胞，其相對於相同細胞類型之野生型細胞或對照細胞表現至少高約10%之量之CD47，或表現相同細胞類型之野生型細胞或對照細胞中表現之CD47水準的至少約1.1倍。

【1343】在一些實施例中，本文提供細胞，其相對於

來自供體之起始細胞或來自供體集合之起始細胞集合表現至少高約10%之量之CD47，或表現來自供體之起始細胞或來自供體集合之起始細胞集合中表現之CD47水準的至少約1.1倍。

【1344】在一些實施例中，相對於野生型細胞或對照細胞，細胞表現至少高約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%、約200%、約300%、約400%、約500%、約600%、約700%、約800%、約900%或約1000%之量之CD47。

【1345】在一些實施例中，細胞表現相同細胞類型之野生型細胞中表現之CD47水準的至少約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍或約5倍。

【1346】在一些實施例中，本文提供T細胞，其具有減少的一或多種MHC I類HLA表現及/或減少的一或多種MHC II類HLA表現且相對於野生型T細胞或對照T細胞表現至少高約10%之量之CD47，表現野生型T細胞或對照T細胞中表現之CD47水準的至少約1.1倍，或表現至少約170,000個CD47分子。

【1347】在一些實施例中，細胞係T細胞，其相對於野生型T細胞或對照T細胞表現至少高約300%或至少高約400%之量之CD47。

【1348】在一些實施例中，細胞係T細胞，其表現野生型T細胞或對照T細胞中表現之CD47水準的至少約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍或約5倍。

【1349】在一些實施例中，本文提供T細胞，其表現至少約170,000個CD47分子。

【1350】在一些實施例中，T細胞表現至少約180,000個CD47分子、至少約190,000個CD47分子、至少約200,000個CD47分子、至少約210,000個CD47分子、至少約220,000個CD47分子、至少約230,000個CD47分子、至少約240,000個CD47分子、至少約250,000個CD47分子、至少約260,000個CD47分子、至少約270,000個CD47分子、至少約280,000個CD47分子、至少約290,000個CD47分子、或至少約300,000個CD47分子。

【1351】在一些實施例中，本文提供T細胞，其相對於來自供體之起始T細胞或來自供體集合之起始T細胞集合表現至少高約10%之量之CD47，或表現來自供體之起始細胞或來自供體集合之起始細胞集合中表現之CD47水準的至少約1.1倍。

【1352】在一些實施例中，細胞係原代胰島細胞，其相對於野生型胰島細胞或對照胰島細胞表現至少高約1000%或至少高約2000%之量之CD47。

【1353】在一些實施例中，本文提供胰島細胞，其具有減少的一或多種MHC I類HLA表現及/或減少的一或多種MHC II類HLA表現且相對於野生型胰島細胞或對照胰島細胞表現至少高約1000%之量之CD47。

【1354】在一些實施例中，細胞係原代β胰島細胞，其表現野生型β胰島細胞或對照β胰島細胞中表現之CD47

水準的至少約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍。

【1355】在一些實施例中，細胞包含1個、2個、3個、4個或5個拷貝之編碼CD47之外源多核苷酸。

【1356】在一些實施例中，細胞包含可操作連接至編碼CD47之外源多核苷酸之組成型啟動子。

【1357】在一些實施例中，編碼CD47之外源多核苷酸係經由病毒介導之整合遞送至細胞。

【1358】在一些實施例中，病毒介導之整合係慢病毒介導之整合。

【1359】在一些實施例中，編碼CD47之外源多核苷酸經由HDR整合至細胞基因體之位點。

【1360】在一些實施例中，編碼CD47之外源多核苷酸整合至TRAC基因之基因座、TRBC基因之基因座或其組合中。

【1361】在一些實施例中，編碼CD47之外源多核苷酸整合至至少一個TRAC對偶基因、至少一個TRBC對偶基因或其組合中。

【1362】在一些實施例中，編碼CD47之外源多核苷酸整合至至少兩個TRAC對偶基因、至少兩個TRBC對偶基因或其組合中。

【1363】在一些實施例中，細胞包含含有CD47多肽之外源多核苷酸，該CD47多肽與SEQ ID NO:13之胺基酸序列具有至少約95%之序列一致性、與SEQ ID NO:13之胺基酸序列具有至少約98%之序列一致性、與SEQ ID NO:13

之胺基酸序列具有至少約99%之序列一致性，或具有SEQ ID NO:13之胺基酸序列。

【1364】在一些實施例中，細胞包含含有CD47多肽之外源多核苷酸，該CD47多肽與SEQ ID NO:14之胺基酸序列具有至少約95%之序列一致性、與SEQ ID NO:14之胺基酸序列具有至少約98%之序列一致性、與SEQ ID NO:14之胺基酸序列具有至少約99%之序列一致性，或具有SEQ ID NO:14之胺基酸序列。

【1365】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之野生型細胞或對照細胞，細胞包含一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子(HLA)之靶之減少的表現。

【1366】在一些實施例中，一或多種MHC I類及MHC II類HLA之減少的表現係由編碼MHC I類及/或II類HLA之一或多種基因之組成型修飾引起。

【1367】在一些實施例中，細胞包含選自MHC I類及MHC II類HLA之靶之一或多個敲除。

【1368】在一些實施例中，一或多個敲除係組成型敲除。

【1369】在一些實施例中，相對於不包含修飾之相同細胞類型之野生型細胞或對照細胞，細胞包含一或多個選自B2M及CIITA之靶之減少的表現。

【1370】在一些實施例中，B2M及/或CIITA之減少的表現係由B2M基因及/或CIITA基因之組成型修飾引起。

【1371】在一些實施例中，其中細胞包含選自B2M及CIITA之靶之一或多個敲除。

【1372】在一些實施例中，細胞包含B2M之兩個對偶基因及/或CIITA之兩個對偶基因的敲除。

【1373】在一些實施例中，一或多個敲除係組成型敲除。

【1374】在一些實施例中，細胞進一步包含編碼一或多種其他耐受原性因子之外源多核苷酸。

【1375】在一些實施例中，一或多種其他耐受原性因子選自由以下組成之群：HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、PD-L1、CTLA-4-Ig、CI抑制劑及IL-35。

【1376】在一些實施例中，相對於相同細胞類型之野生型細胞或對照細胞，細胞包含B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD之減少的表現。

【1377】在一些實施例中，細胞並不表現B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【1378】在一些實施例中，細胞係多能幹細胞。

【1379】在一些實施例中，多能幹細胞係誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)或胚胎幹細胞(ESC)。

【1380】在一些實施例中，細胞係衍生自多能幹細胞之分化細胞或其子代。

【1381】在一些實施例中，分化細胞選自由以下組成

之群：T細胞、自然殺手(NK)細胞、內皮細胞、胰島細胞、心肌細胞、平滑肌細胞、骨骼肌細胞、肝細胞、神經膠質祖細胞、多巴胺能神經元、視網膜色素上皮細胞及甲狀腺細胞。

【1382】在一些實施例中，細胞係原代細胞或其子代。

【1383】在一些實施例中，原代細胞或其子代係T細胞或NK細胞。

【1384】在一些實施例中，T細胞進一步包含減少的T細胞受體(TCR)-α及/或TCR-β表現。

【1385】在一些實施例中，T細胞並不表現TCR-α及/或TCR-β。

【1386】在一些實施例中，T細胞進一步包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之第二外源多核苷酸。

【1387】在一些實施例中，相對於不具或具有低CD47表現之相同或不同細胞類型之對照細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47表現，及相對於對照細胞減少的一或多種MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之表現。

【1388】在一些實施例中，細胞表現不具或具有低CD47表現之相同或不同細胞類型之對照細胞中表現之CD47水準的至少約2倍、約3倍、約4倍或約5倍，及相對

於對照細胞減少的一或多種MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之表現。

【1389】在一些實施例中，細胞表現不具或具有低CD47表現之相同細胞類型之對照細胞中表現之CD47水準的至少約3倍、約4倍或約5倍。

【1390】在一些實施例中，對照細胞係T細胞、自然殺手(NK)細胞、內皮細胞、胰島細胞、心肌細胞、平滑肌細胞、骨骼肌細胞、肝細胞、神經膠質祖細胞、多巴胺能神經元、視網膜色素上皮細胞或甲狀腺細胞。

【1391】在一些實施例中，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後逃避NK細胞介導之細胞毒性，在投與接受患者後經保護免於成熟NK細胞之細胞溶解，在投與接受患者後逃避巨噬細胞吞噬，在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之先天及/或適應性免疫反應，及/或在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之基於抗體之免疫反應。

【1392】在一些實施例中，本文提供醫藥組合物，其包含本文所述之經改造細胞或低免疫原性細胞之群體及醫藥學上可接受之添加劑、載劑、稀釋劑或賦形劑。

【1393】在一些實施例中，本文提供治療將受益於基於細胞之療法之患有疾病或疾患之患者的方法，其包括向患者投與本文所述之經改造細胞或低免疫原性細胞之群體。

【1394】在一些實施例中，本文提供治療將受益於基

於細胞之療法之患有疾病或疾患之患者的方法，其包括向患者投與本文所述分化細胞之群體。

【1395】在一些實施例中，分化細胞選自由以下組成之群：T細胞、自然殺手(NK)細胞、內皮細胞、胰島細胞、心肌細胞、平滑肌細胞、骨骼肌細胞、肝細胞、神經膠質祖細胞、多巴胺能神經元、視網膜色素上皮細胞及甲狀腺細胞。

【1396】在一些實施例中，本文提供本文所述之經改造細胞或低免疫原性細胞之群體的用途，其用於治療將受益於基於細胞之療法之接受患者之病症或疾患。

【1397】在一些實施例中，本文提供產生經改造細胞之方法，該經改造細胞包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及ii)增加一或多種耐受原性因子之表現的可調控修飾，該方法包括：

(a) 獲得經分離細胞；

(b) 將以下引入細胞中：用於一或多個靶之可調控減少的表現之基於RNA之條件或可誘導組分、用於一或多個靶之可調控減少的表現之基於DNA之條件或可誘導組分或用於一或多個靶之可調控減少的表現之基於蛋白質之條件或可誘導組分；

(c) 將細胞暴露於活化條件或可誘導方法之條件或外源因子，由此減少MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之表現；

(d) 將包含可操作連接至外源多核苷酸之條件或可誘導啟動子之核酸引入經分離細胞中，該外源多核苷酸編碼一或多種耐受原性因子；及

(e) 將經改造細胞暴露於活化條件或可誘導啟動子之條件或外源因子，由此表現一或多種外源耐受原性因子，且由此產生經改造細胞。

【1398】在一些實施例中，步驟(a)-(d)係以任一順序實施。

【1399】在一些實施例中，步驟(a)-(d)中之一或多者係同時實施。

【1400】在一些實施例中，步驟(b)及(c)係在步驟(d)及(e)之前實施。

【1401】在一些實施例中，步驟(d)及(e)係在步驟(b)及(c)之前實施。

【1402】在一些實施例中，步驟(c)及(e)係依序實施。

【1403】在一些實施例中，步驟(c)及(e)係同時實施。

【1404】在一些實施例中，本文提供確定免疫逃避低免疫原性細胞所需之CD47表現水準之臨限值的方法，該方法包括：

(a) 產生包含編碼CD47之第一外源多核苷酸之經改造細胞；

(b) 基於CD47表現水準分選經改造細胞，以生成具有

相似CD47表現水準之細胞之集合；

(c) 評價由細胞集合誘導之免疫反應；及

(d) 確定免疫逃避所需之CD47表現水準之臨限值。

【1405】在一些實施例中，該方法之步驟(a)進一步包括改造細胞以包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞一或多種Y染色體基因及I類及/或II類主要組織相容性複合物(MHC)人類白血球抗原分子之減少的表現。

【1406】在一些實施例中，使用活體外分析或活體內分析來實施免疫反應之評價。

【1407】在一些實施例中，免疫反應之評價係藉由量測NK細胞介導之細胞毒性、成熟NK細胞之溶解、巨噬細胞吞噬、針對細胞之基於抗體之免疫反應或藉由量測在投與接受患者後之某一時間段後仍存在於接受者中之細胞之百分比來實施。

IV. 實例

實例1：生成具有外源CD47之可調控表現之B2M及CIITA雙敲除神經膠質祖細胞

【1408】本文闡述產生具有外源CD47轉基因之可調控表現之B2M及CIITA雙敲除神經膠質祖細胞的例示性方法。使用慢病毒表現技術將可操作連接至條件啟動子之編碼CD47之外源多核苷酸引入iPSC中，且使用CRISPR/Cas9技術使B2M及CIITA基因在iPSC中失活。

A. 雙敲除B2M/CIITA：

【1409】使用CRISPR/Cas9技術藉由熟習此項技術者所意識到之任一方法編輯iPSC細胞。在一個實例中，使靶向B2M及CIITA中每一者之引導RNA與sp Cas9複合以形成Cas9核糖核蛋白(RNP)。使B2M及CIITA中每一者之RNP以特定sgRNA:Cas9比率單獨複合，然後混合兩種RNP。然後將RNP混合物與iPSC混合，且在特定條件下進行核轉染。將核轉染細胞接種且培養。

B. 引入CD47轉基因：

【1410】使用熟習此項技術者所意識到之任一方法生成可操作連接至不同條件啟動子(細胞週期特異性啟動子及組織/分化特異性啟動子)之編碼CD47之多核苷酸。所用啟動子包括(但不限於)：

- *細胞週期特異性啟動子*：細胞週期蛋白B1啟動子、Cdc25B啟動子、細胞週期蛋白A2啟動子、Cdc2啟動子、Cdc25C啟動子、細胞週期蛋白E啟動子、Cdc6啟動子、DHFR啟動子及組蛋白啟動子。不受限於理論，使用細胞週期特異性啟動子使得可操作連接之CD47轉基因在iPSC中在細胞週期之不同階段表現。
- *組織/分化特異性啟動子*：Sox-2啟動子(神經祖細胞特異性)、神經膠質原纖維酸性蛋白(GFAP)啟動子(星形細胞特異性)、髓鞘鹼性蛋白(MBP)啟動子(寡突膠質細胞

特異性)、人類髓鞘相關之糖蛋白(MAG)啟動子(寡突膠質細胞特異性)、芳族胺基酸脫羧酶(AADC)啟動子、Ca2+鈣調蛋白依賴性蛋白激酶II-α (CamKIIα)啟動子、CMV增強子/血小板源性生長因子-β啟動子、DAT啟動子、DNMT啟動子、腦啡肽啟動子、ENO2啟動子、GnRH啟動子、L7啟動子、MAP2啟動子、神經絲輕鏈基因啟動子、神經絲啟動子、NURR1啟動子、PITX3啟動子、S100啟動子、血清素受體啟動子、突觸蛋白啟動子、Tau啟動子、thy-1啟動子、TUBA1A啟動子、TUJ1啟動子、酪胺酸羥化酶(TH)啟動子、VGF啟動子、VMAT2啟動子、A2B5啟動子、BLBP啟動子、腦源性神經營養因子BDNF啟動子、CD105啟動子、CD11b啟動子、CD11c啟動子、CD133啟動子、CD140a啟動子、CD45啟動子、CD9啟動子、睫狀神經營養因子CNTF啟動子、連結蛋白43啟動子、CX3CR1啟動子、EGFR啟動子、表皮生長因子EGF啟動子、FGF8啟動子、FOXG1啟動子、GalC啟動子、GAP-43啟動子、GD3啟動子、GLAST、麩醯胺酸合成酶啟動子、IBA-1啟動子、LNGFR啟動子、MBP啟動子、Musashi啟動子、神經生長因子NGF啟動子、巢蛋白啟動子、神經營養因子-3 NT-3啟動子、NG2啟動子、NKX2.2啟動子、NT-4啟動子、O4啟動子、OLIG1啟動子、OLIG2啟動子、P2RY12啟動子、PAX6啟動子、PDGFαR啟動子、S100β啟動子、SOX10啟動子、TMEM119啟動子及波形蛋白啟動子。不受限於理論，使用組織/分化特異性啟動子使得可操作連接

之CD47轉基因在iPSC中在其分化成GPC之不同階段表現。

【1411】藉由熟習此項技術者所意識到之任一方法產生慢病毒載體。舉例而言，使用含有病毒表現及轉移載體之標準化學轉染複合物轉染細胞株，該等載體具有可操作連接至條件啟動子(例如細胞週期特異性或組織/分化特異性啟動子)之編碼CD47之多核苷酸。在轉染後收穫細胞培養物且使其澄清，然後離心濃縮。將慢病毒沈澱物重懸浮成最終濃縮物。

【1412】將慢病毒濃縮物與iPSC在標準培養板中混合，且用含有可操作連接至條件啟動子之編碼CD47之多核苷酸之構築體旋染並轉導iPSC。

【1413】應注意步驟A可在步驟B之前、同時或之後進行以生成具有可調控外源CD47轉基因之B2M/CIITA雙敲除iPSC。

分化成GPC：

【1414】神經膠質祖細胞係藉由熟習此項技術者所意識到之任一方法自iPSC分化而來。

【1415】在一些情形下，神經膠質細胞、其前體及祖細胞係藉由將具有可調控外源CD47轉基因之B2M/CIITA雙敲除iPSC培養於包含一或多種選自由以下組成之群之劑的培養基中來生成：視黃酸、IL-34、M-CSF、FLT3配位體、GM-CSF、CCL2、TGFβ抑制劑、BMP信號傳導抑制劑(例如LDN193189、SB431542或其組合)、SHH信號傳導活

化劑、FGF、血小板源性生長因子PDGF、PDGFR-α、HGF、IGF-1、頭蛋白、音猬因子(SHH)、多索嗎啡、頭蛋白及其任一組合。分化培養基包括可促進或使得能夠生成如熟習此項技術者所意識到之神經膠質細胞類型之任何特定因子及/或小分子。

【1416】單獨地或另外，多能幹細胞之分化係藉由使細胞暴露於或接觸特定因子來實施，已知該等特定因子產生神經膠質細胞，例如小神經膠質細胞(例如變形蟲樣、分枝、活化吞噬及活化非吞噬細胞)、大神經膠質細胞(例如星形細胞、寡突膠質細胞、室管膜細胞、放射狀神經膠質細胞、許旺細胞及衛星細胞、其前體及其祖細胞。可用於自幹細胞生成神經膠質細胞、其前體及祖細胞之方法參見例如美國專利第7,579,188號；美國專利第7,595,194號；美國專利第8,263,402號；美國專利第8,206,699號；美國專利第8,227,247號；美國專利第8,252,586號；美國專利第9,193,951號；美國專利第9,709,553；及美國專利第9,862,925號；及美國公開申請案第2018/0187148號；美國公開申請案第2017/0198255號；美國公開申請案第2017/0183627號；美國公開申請案第2017/0182097號；美國公開申請案第2017/253856號；美國公開申請案第2018/0236004號；及PCT公開申請案第WO2017/172976號及PCT公開申請案第WO2018/093681號，該等申請案中每一者之全文皆以引用方式併入本文中。

【1417】使用陽性選擇策略、陰性選擇策略或二者選

擇或純化神經膠質細胞。

GPC之表徵：

【1418】在一些情形下，為監測神經膠質細胞分化以及評價神經膠質細胞之表型，評估特異性針對神經膠質細胞及其祖細胞之任一數量之分子及遺傳標記物之表現。舉例而言，藉由熟習此項技術者已知之多種方法來確定遺傳標記物之存在。藉由諸如(但不限於)以下之量化方法來確定分子標記物之表現：基於qPCR之分析、RNA-seq分析、蛋白質體分析、免疫分析、免疫細胞化學分析、免疫印跡分析及諸如此類。

【1419】在一些情形下，神經膠質細胞表現NKX2.2、PAX6、SOX10、腦源性神經營養因子BDNF、神經營養因子-3 NT-3、NT-4、表皮生長因子EGF、睫狀神經營養因子CNTF、神經生長因子NGF、FGF8、EGFR、OLIG1、OLIG2、髓鞘鹼性蛋白MBP、GAP-43、LNGFR、巢蛋白、GFAP、CD11b、CD11c、CD105、CX3CR1、P2RY12、IBA-1、TMEM119、CD45及其任一組合。在一些情形下，神經膠質細胞(包括寡突膠質細胞、星形細胞及其祖細胞)表現一或多種選自以下之標記物：A2B5、CD9、CD133、CD140a、FOXG1、GalC、GD3、GFAP、巢蛋白、NG2、MBP、Musashi、O4、Olig1、Olig2、PDGFαR、S100β、麩醯胺酸合成酶、連結蛋白43、波形蛋白、BLBP、GLAST、及諸如此類。在一些情形下，神經

膠質細胞(包括寡突膠質細胞、星形細胞及其祖細胞)不表現一或多種選自以下之標記物：PSA-NCAM、CD9、CD11、CD32、CD36、CD105、CD140a、巢蛋白、PDGFαR及諸如此類。使用該等例示性標記物中之任一者來表徵本文所述之神經膠質細胞。

【1420】單獨地或另外，根據如藉由免疫細胞化學及免疫組織化學確定之形態來表徵神經膠質細胞。在一些情形下，根據諸如(但不限於)以下之功能表徵分析來評價神經膠質細胞：神經元共培養分析、使用脂多糖(LPS)之刺激分析、活體外髓鞘化分析、使用鈣波振蕩之ATP流入分析及諸如此類。

【1421】單獨地或另外，為確定神經膠質細胞展示細胞特異性特徵及特性，將細胞移植至動物模型中。在一些情形下，將神經膠質細胞注射至免疫受損小鼠(例如免疫受損發抖小鼠)中。將神經膠質細胞投與小鼠之腦且在預選量之時間後，評估植入細胞。在一些情況下，使用免疫染色及成像方法使腦中之植入細胞可視化。在一些情形下，可在植入細胞中確定已知神經膠質細胞生物標記物之表現。

【1422】用於測定神經細胞移植在神經病症或疾患之動物模型中之效應之其他方法闡述於以下參考文獻中：對於脊髓損傷 - Curtis等人，Cell Stem Cell, 2018, 22, 941-950；對於帕金森氏病 - Kikuchi等人，Nature, 2017, 548:592-596；對於ALS - Izrael等人，Stem Cell Research,

2018, 9(1):152 及 Izrael 等人，IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen. 72862；對於癲癇 - Upadhya 等人，PNAS, 2019, 116(1):287-296，該等參考文獻中每一者之全文皆以引用方式併入本文中。

【1423】在例如急性損傷脊髓之大鼠模型中評價經移植用於脊髓損傷之神經細胞之效能，如McDonald等人，Nat. Med., 1999, 5:1410及Kim等人，Nature, 2002, 418:50所述。例如，成功移植物可顯示移植物源性細胞在2-5週後存在於病灶中，分化成星形細胞、寡突膠質細胞及/或神經元，並沿脊髓自患病端遷移，及步態、協調性及負重之改良。具體動物模型係基於神經細胞類型及欲治療之神經疾病或疾患來選擇。

實例2：例示性實施例

細胞

【1424】生成經改造細胞，其包含i)相對於未經改變或未經修飾之野生型細胞可調控減少一或多個選自β-2微球蛋白(B2M)及MHC II類反式活化劑(CIITA)之靶之表現，及ii)相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，可調控過表現增加一或多種耐受原性因子之表現的可調控修飾。

【1425】生成低免疫原性細胞，其包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，i)可調控減少一或多個選自β-2微球蛋白(B2M)及MHC II類反式活化劑(CIITA)之靶之

表現，及ii)可調控過表現增加一或多種耐受原性因子之表現的可調控修飾。

【1426】生成經改造細胞，其包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加一或多種耐受原性因子之表現的可調控修飾。

【1427】生成低免疫原性細胞，其包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加一或多種耐受原性因子之表現的可調控修飾。

遺傳修飾

【1428】可生成經改造細胞或低免疫原性細胞以包含含有一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之可調控敲除的可調控修飾。視情況地，可生成經改造細胞或低免疫原性細胞以包含含有相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞一或多個選自B2M及CIITA之靶之可調控減少的表現的可調控修飾。視情況地，可生成經改造細胞或低免疫原性細胞以包含含有一或多個選自B2M及CIITA之靶之可調控敲除的可調控修飾。視情況地，可生成經改造細胞或低免疫原性細胞以進一步包含一或多種Y染色體基因之可調控減少的表現或可調控敲除。視情況地，可生成經改造細胞或低免疫原性細胞以包含Y連鎖原鈣黏蛋白-11及/或Y連鎖神經配蛋白-4之減少的表現或可

調控敲除。

條件或可誘導表現

【1429】可生成經改造細胞或低免疫原性細胞以包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞一或多個靶之可調控減少的表現或敲除的基於RNA之條件或可誘導組分。視情況地，基於RNA之條件或可誘導組分選自由以下組成之群：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。視情況地，基於RNA之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。視情況地，基於RNA之可誘導組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1430】可生成經改造細胞或低免疫原性細胞以包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞一或多個靶之可調控減少的表現敲除的基於DNA之條件或可誘導組分。視情況地，基於DNA之條件或可誘導組分係使用選自由以下組成之群之方法敲除：條件或可誘導CRISPR、條件或可誘導TALEN、條件或可誘導鋅指核酸酶、條件或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件或可誘導大範圍核酸酶。視情況地，基於DNA之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟

動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。視情況地，基於DNA之條件組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1431】可生成經改造細胞或低免疫原性細胞以包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞一或多個靶之可調控減少的表現或敲除的基於蛋白質之條件或可誘導組分。視情況地，基於蛋白質之條件或可誘導組分係條件或可誘導降解子方法。視情況地，條件或可誘導降解子方法選自由以下組成之群：使用SMASH標籤之配位體誘導之降解(LID)、使用Shield-1之LID、使用生長素之LID、使用雷帕黴素之LID、條件或可誘導肽降解子(*例如*基於IKZF3之降解子)及條件或可誘導蛋白水解靶向嵌合體(PROTAC)。視情況地，基於蛋白質之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。視情況地，基於蛋白質之組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1432】視情況地，細胞包含可操作連接至外源多核苷酸之條件啟動子，該外源多核苷酸編碼一或多種耐受原性因子。視情況地，細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之條件啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源

多核苷酸，該轉座子包含編碼一或多種耐受原性因子之貨物多核苷酸。視情況地，條件啟動子係細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。

【1433】視情況地，細胞包含可操作連接至外源多核苷酸之可誘導啟動子，該外源多核苷酸編碼一或多種耐受原性因子。視情況地，細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之可誘導啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼一或多種耐受原性因子之貨物多核苷酸。視情況地，可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1434】視情況地，一或多種耐受原性因子選自由以下組成之群：HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、PD-L1、CTLA-4-Ig、CD47、CI抑制劑及IL-35。視情況地，經改造細胞或低免疫原性細胞經改造以包含可操作連接至編碼CD47之外源多核苷酸之可誘導啟動子。視情況地，細胞包含與SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少80%序列一致性之CD47多肽。視情況地，細胞包含與SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少80%序列一致性之CD47多肽。視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現增加量之CD47。視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之

CD47。視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之CD47。視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約1000%之量之CD47。視情況地，相對於基線參考，細胞表現增加量之CD47。在一些實施例中，基線參考係背景信號。在一些實施例中，基線參考係對照信號。在一些實施例中，基線參考係同型對照信號。在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之CD47。在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之CD47。在一些實施例中，相對於對照，細胞表現至少高約1000%之量之CD47。在一些實施例中，細胞表現對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍、約1.5倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約11倍、約12倍、約13倍、約14倍、約15倍、約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍。在一些實施例中，細胞表現至少約180,000個CD47分子、至少約190,000個CD47分子、至少約200,000個CD47分子、至少約210,000個CD47分子、至少約220,000個CD47分子、至少約230,000個CD47分子、至少約240,000個CD47分子、至少約250,000個CD47分子、至少約260,000個CD47分子、至少約270,000個CD47

分子、至少約280,000個CD47分子、至少約290,000個CD47分子、至少約300,000個CD47分子、至少約350,000個、至少約400,000個CD47分子/細胞。

【1435】熟習此項技術者根據本揭示案已知之任一適宜分子量化方法可用於本揭示案中。可用於測定表現水準之方法之實例包括(但不限於)基於流式細胞術之方法、細胞表面生物素化方法、胰凝乳蛋白酶方法、成像方法、抗體標記方法、表面電漿子共振方法以及Prasad等人，Methods Enzymol. 2010;484:179-95及Drescher等人，Methods Mol Biol. 2009;493:323-43中所述之彼等方法，該兩篇文獻之全文皆以引用方式併入本文中。在一些實施例中，耐受原性因子或CD47表現水準係使用基於抗體之量化方法、視情況選用之Quantibrite™分析來測定。

其他修飾

【1436】視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞包含B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52 PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD之減少的表現。視情況地，細胞並不表現B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。視情況地，細胞進一步包含增加編碼以下中之一或多者之一或多種外源多核苷酸之表現的可調控修飾：CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、

CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約1000%之量之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16

Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。

細胞類型

【1437】視情況地，細胞衍生自人類細胞或動物細胞。視情況地，人類細胞或動物細胞係多能幹細胞。視情況地，多能幹細胞係誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)或胚胎幹細胞(ESC)。視情況地，細胞係衍生自多能幹細胞之分化細胞或其子代。視情況地，多能幹細胞係誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)或胚胎幹細胞(ESC)。視情況地，分化細胞選自由以下組成之群：T細胞、自然殺手(NK)細胞、內皮細胞、胰島細胞、心肌細胞、平滑肌細胞、骨骼肌細胞、肝細胞、神經膠質祖細胞、多巴胺能神經元、視網膜色素上皮細胞及甲狀腺細胞。視情況地，細胞係原代免疫細胞或其子代。

【1438】視情況地，原代免疫細胞或其子代係T細胞或NK細胞。視情況地，T細胞進一步包含減少的T細胞受體(TCR)-α及/或TCR-β表現。視情況地，T細胞並不表現TCR-α及/或TCR-β。視情況地，T細胞進一步包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之第二外源多核苷酸。

整合位點

【1439】視情況地，第一及/或第二外源多核苷酸插入細胞之至少一個對偶基因之第一及/或第二特定基因座中。視情況地，第一及/或第二特定基因座選自由以下組

成之群：安全港基因座、靶基因座、RHD基因座、B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座及TRB基因座。視情況地，安全港基因座選自由以下組成之群：CCR5基因座、PPP1R12C基因座、Rosa基因座及CLYBL基因座。視情況地，靶基因座選自由以下組成之群：CXCR4基因座、ALB基因座、SHS231基因座、F3 (CD142)基因座、MICA基因座、MICB基因座、LRP1 (CD91)基因座、HMGB1基因座、ABO基因座、FUT1基因座及KDM5D基因座。

【1440】視情況地，使用慢病毒載體將第一及/或第二外源多核苷酸引入經改造細胞或低免疫原性細胞中。視情況地，使用選自由以下組成之群之促融劑介導之遞送或轉座酶系統將第一及/或第二外源多核苷酸引入經改造細胞或低免疫原性細胞中：條件或可誘導轉座酶、條件或可誘導PiggyBac轉座子、條件或可誘導睡美人(SB11)轉座子、條件或可誘導Mos1轉座子及條件或可誘導Tol2轉座子。

患者反應

【1441】視情況地，細胞在投與接受患者後逃避NK細胞介導之細胞毒性。視情況地，細胞在投與接受患者後經保護免於成熟NK細胞之細胞溶解。視情況地，細胞在投與接受患者後逃避巨噬細胞吞噬。視情況地，細胞在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之先天及/或適應性免疫反應。視情況地，細胞在投與接受患者後不會誘導針對

該細胞之基於抗體之免疫反應。

其他細胞

【1442】產生經改造細胞，其包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞增加CD47之表現之可調控修飾。

【1443】產生低免疫原性細胞，其包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞增加CD47之表現之可調控修飾。

【1444】視情況地，經改造或低免疫原性細胞包含可操作連接至編碼CD47之外源多核苷酸之條件啟動子。視情況地，細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之條件啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼CD47之貨物多核苷酸。視情況地，條件啟動子係細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。視情況地，細胞包含可操作連接至編碼CD47之外源多核苷酸之可誘導啟動子。視情況地，細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之可誘導啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼CD47之貨物多核苷酸。視情況地，可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。視情況地，外源多核苷酸細胞包含與SEQ ID NO:13之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之CD47多肽。視情況地，細胞包含與SEQ ID NO:14之胺基酸序列具有至少95%

序列一致性之CD47多肽。

【1445】視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現增加量之CD47。視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之CD47。視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之CD47。視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約1000%之量之CD47。

【1446】視情況地，細胞進一步包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現的可調控修飾。視情況地，細胞包含一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之可調控敲除。視情況地，可調控修飾包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞一或多個選自B2M及CIITA之靶之可調控減少的表現。視情況地，可調控修飾包含一或多個選自B2M及CIITA之靶之可調控敲除。視情況地，細胞進一步包含減少或敲除一或多種Y染色體基因之表現之可調控修飾。視情況地，細胞包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞減少或敲除一或多個選自Y連鎖原鈣黏蛋白-11及Y連鎖神經配蛋白-4之靶之表現的可調控修飾。

【1447】視情況地，可調控修飾包含相對於不包含修

飾之相同細胞類型之細胞減少或敲除一或多個靶之表現的基於RNA之條件或可誘導組分。視情況地，基於RNA之條件或可誘導組分選自由以下組成之群：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。視情況地，基於RNA之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。視情況地，基於RNA之可誘導組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1448】視情況地，可調控修飾包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞減少或敲除一或多個靶之表現的基於DNA之條件或可誘導組分。視情況地，基於DNA之條件或可誘導組分係使用選自由以下組成之群之方法敲除：條件或可誘導CRISPR、條件或可誘導TALEN、條件或可誘導鋅指核酸酶、條件或可誘導歸巢核酸內切酶、及條件或可誘導大範圍核酸酶。視情況地，基於DNA之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。視情況地，基於DNA之條件組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1449】視情況地，可調控修飾包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞減少或敲除一或多個靶之表現的基於蛋白質之條件或可誘導組分。視情況地，基於蛋白質之條件或可誘導組分係條件或可誘導降解子方法。視情況地，條件或可誘導降解子方法選自由以下組成之群：使用SMASH標籤之配位體誘導之降解(LID)、使用Shield-1之LID、使用生長素之LID、使用雷帕黴素之LID、條件或可誘導肽降解子(*例如*基於IKZF3之降解子)及條件或可誘導蛋白水解靶向嵌合體(PROTAC)。視情況地，基於蛋白質之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。視情況地，基於蛋白質之組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【1450】視情況地，細胞進一步包含可操作連接至外源多核苷酸之條件啟動子，該外源多核苷酸編碼一或多種其他耐受原性因子。視情況地，細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之條件啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼一或多種其他耐受原性因子之貨物多核苷酸。視情況地，條件啟動子係細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子或分化誘導之啟動子。視情況地，細胞包含可操作連接至外源多核苷酸之可誘導啟動子，該外源多核苷酸編碼

一或多種其他耐受原性因子。視情況地，細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之可誘導啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼一或多種其他耐受原性因子之貨物多核苷酸。視情況地，可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。視情況地，一或多種其他耐受原性因子選自由以下組成之群：HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、PD-L1、CTLA-4-Ig、CI抑制劑及IL-35。

【1451】視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞進一步包含減少以下之表現之可調控修飾：B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。視情況地，細胞並不表現B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【1452】視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞進一步包含增加以下中之一或多者之表現的可調控修飾：CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細

胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。視情況地，相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約1000%之量之CD47、DUX4、CD24、CD27、CD35、CD46、CD55、CD59、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制劑、IL-10、IL-35、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8、CD16、CD52、H2-M3、CD16 Fc受體、IL15-RF及/或Serpinb9。

【1453】視情況地，細胞衍生自人類細胞或動物細胞。視情況地，人類細胞或動物細胞係多能幹細胞。視情況地，多能幹細胞係誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)或胚胎幹細胞(ESC)。視情況地，經改造細胞或

低免疫原性細胞係衍生自多能幹細胞之分化細胞或其子代。視情況地，多能幹細胞係誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)或胚胎幹細胞(ESC)。視情況地，分化細胞選自由以下組成之群：T細胞、自然殺手(NK)細胞、內皮細胞、胰島細胞、心肌細胞、平滑肌細胞、骨骼肌細胞、肝細胞、神經膠質祖細胞、多巴胺能神經元、視網膜色素上皮細胞及甲狀腺細胞。視情況地，經改造細胞或低免疫原性細胞係原代免疫細胞或其子代。視情況地，原代免疫細胞或其子代係T細胞或NK細胞。視情況地，T細胞進一步包含減少的T細胞受體(TCR)-α及/或TCR-β表現。視情況地，T細胞並不表現TCR-α及/或TCR-β。視情況地，T細胞進一步包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之第二外源多核苷酸。視情況地，第一及/或第二外源多核苷酸插入細胞之至少一個對偶基因之第一及/或第二特定基因座中。

【1454】視情況地，第一及/或第二特定基因座選自由以下組成之群：安全港基因座、靶基因座、*RHD*基因座、*B2M*基因座、*CIITA*基因座、*TRAC*基因座及*TRB*基因座。視情況地，安全港基因座選自由以下組成之群：*CCR5*基因座、*PPP1R12C*基因座、*Rosa*基因座及*CLYBL*基因座。視情況地，靶基因座選自由以下組成之群：*CXCR4*基因座、*ALB*基因座、*SHS231*基因座、*F3* (*CD142*)基因座、*MICA*基因座、*MICB*基因座、*LRP1* (*CD91*)基因座、*HMGB1*基因座、*ABO*基因座、*FUT1*基因座及*KDM5D*基因

座。視情況地，使用慢病毒載體將第一及/或第二外源多核苷酸引入經改造細胞或低免疫原性細胞中。視情況地，使用選自由以下組成之群之促融劑介導之遞送或轉座酶系統將第一及/或第二外源多核苷酸引入經改造細胞或低免疫原性細胞中：條件或可誘導轉座酶、條件或可誘導PiggyBac轉座子、條件或可誘導睡美人(SB11)轉座子、條件或可誘導Mos1轉座子及條件或可誘導Tol2轉座子。

【1455】視情況地，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後逃避NK細胞介導之細胞毒性。視情況地，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後經保護免於成熟NK細胞之細胞溶解。視情況地，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後逃避巨噬細胞吞噬。視情況地，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之先天及/或適應性免疫反應。視情況地，分化細胞或其子代、或原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之基於抗體之免疫反應。

【1456】生成經改造內皮細胞，其包含相對於不包含修飾之內皮細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、

400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中內皮細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1457】生成經改造胰島細胞，其包含相對於不包含修飾之胰島細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中胰島細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1458】生成經改造心肌細胞，其包含相對於不包含修飾之心肌細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中心肌細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1459】生成經改造平滑肌細胞，其包含相對於不包含修飾之平滑肌細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、

200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中平滑肌細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1460】生成經改造骨骼肌細胞，其包含相對於不包含修飾之骨骼肌細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中骨骼肌細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1461】生成經改造肝細胞，其包含相對於不包含修飾之肝細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中肝細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1462】生成經改造神經膠質祖細胞，其包含相對於不包含修飾之神經膠質祖細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾

之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中神經膠質祖細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1463】生成經改造多巴胺能神經元，其包含相對於不包含修飾之多巴胺能神經元，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中多巴胺能神經元衍生自多能幹細胞或其子代。

【1464】生成經改造視網膜色素上皮細胞，其包含相對於不包含修飾之視網膜色素上皮細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中視網膜色素上皮細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1465】生成經改造甲狀腺細胞，其包含相對於不包

含修飾之甲狀腺細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，且其中甲狀腺細胞衍生自多能幹細胞或其子代。

【1466】生成經改造T細胞，其包含相對於不包含修飾之T細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，其中T細胞視情況地進一步包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之外源多核苷酸，且其中T細胞衍生自多能幹細胞或其子代，或T細胞係原代免疫細胞或其子代。

【1467】經改造NK細胞，其包含相對於不包含修飾之NK細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及/或ii)增加CD47之表現的可調控修飾，其中相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、

500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，其中NK細胞視情況地進一步包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之外源多核苷酸，且其中NK細胞衍生自多能幹細胞或其子代，或NK細胞係原代免疫細胞或其子代。

醫藥組合物

【1468】細胞可調配成醫藥組合物。視情況地，醫藥組合物包含本文所述之經改造細胞或低免疫原性細胞之群體及醫藥學上可接受之添加劑、載劑、稀釋劑或賦形劑。

治療方法

【1469】細胞可用於治療將受益於基於細胞之療法之患有疾病或疾患之患者的方法中。視情況地，該方法包括向患者投與本文所述之經改造細胞或低免疫原性細胞之群體。視情況地，該方法包括向患者投與本文所述分化細胞之群體。視情況地，分化細胞選自由以下組成之群：T細胞、自然殺手(NK)細胞、內皮細胞、胰島細胞、心肌細胞、平滑肌細胞、骨骼肌細胞、肝細胞、神經膠質祖細胞、多巴胺能神經元、視網膜色素上皮細胞及甲狀腺細胞。

產生細胞之方法

【1470】藉由以下方式生成經改造細胞，該經改造細

胞包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞，i)減少一或多個選自MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之靶之表現，及ii)增加一或多種耐受原性因子之表現的可調控修飾：

(a) 獲得經分離細胞；

(b) 將以下引入細胞中：用於一或多個靶之可調控減少的表現之基於RNA之條件或可誘導組分、用於一或多個靶之可調控減少的表現之基於DNA之條件或可誘導組分或用於一或多個靶之可調控減少的表現之基於蛋白質之條件或可誘導組分；

(c) 將細胞暴露於活化條件或可誘導方法之條件或外源因子，由此減少MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之表現；

(d) 將包含可操作連接至外源多核苷酸之條件或可誘導啟動子之核酸引入經分離細胞中，該外源多核苷酸編碼一或多種耐受原性因子；及

(e) 將經改造細胞暴露於活化條件或可誘導啟動子之條件或外源因子，由此表現一或多種外源耐受原性因子，且由此產生經改造細胞。

【1471】視情況地，步驟(a)-(d)係以任一順序實施。視情況地，步驟(a)-(d)中之一或多者係同時實施。視情況地，步驟(b)及(c)係在步驟(d)及(e)之前實施。視情況地，步驟(d)及(e)係在步驟(b)及(c)之前實施。視情況地，步驟(c)及(e)係依序實施。視情況地，步驟(c)及(e)係同時實

施。

確定CD47臨限值水準之方法

【1472】實施確定免疫逃避低免疫原性細胞所需之CD47表現水準之臨限值的方法，該方法包括：

(a) 產生包含編碼CD47之第一外源多核苷酸之經改造細胞；

(b) 基於CD47表現水準分選經改造細胞，以生成具有相似CD47表現水準之細胞之集合；

(c) 評價由細胞集合誘導之免疫反應；及

(d) 確定免疫逃避所需之CD47表現水準之臨限值。

【1473】視情況地，該方法之步驟(a)進一步包括改造細胞以包含相對於不包含修飾之相同細胞類型之細胞一或多種Y染色體基因及MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原分子之可調控減少的表現。視情況地，使用活體外分析或活體內分析來實施免疫反應之評價，該等分析包括(但不限於)流式細胞術方法、抗體方法(供體特異性抗體偵測、ELISA、西方墨點分析、標準抗體偵測方法)、細胞殺傷分析、免疫細胞活化分析。視情況地，免疫反應之評價係藉由量測NK細胞介導之細胞毒性、成熟NK細胞之溶解、巨噬細胞吞噬、針對細胞之基於抗體之免疫反應或藉由量測在投與接受患者後之某一時間段後仍存在於接受者中之細胞之百分比來實施。

實例3：減少原代胰島細胞之MHC-II表現且增加其CD47表現

【1474】用含有CD47轉基因之慢病毒載體轉導B2M敲除之C57BL/6 (B6)小鼠(MHC單倍型$H2^b$)之原代β胰島細胞以生成$B2M^{-/-}$; CD47*tg*原代β胰島。對攜載CD47 cDNA轉基因之慢病毒粒子測試一系列MOI。24小時後，移除病毒且更換完全培養基。使用螢光標記之抗CD47使用標準FACS系統使細胞經受分選。

【1475】自C57BL/6 (B6)小鼠分離之$B2M^{-/-}$原代胰島細胞不會天然表現MHC-II分子，在刺激後亦不會上調MHC-II分子。藉由流式細胞術使用抗體特異性試劑評價一或多種MHC-I、MHC-II及CD47在$B2M^{-/-}$; CD47*tg*原代β胰島上之表面表現。使用同型抗體作為對照。評估$B2M^{-/-}$; CD47*tg* β胰島細胞中不同之CD47蛋白水準及細胞逃避免疫反應之能力的效應。

【1476】為確定原代β胰島細胞逃避NK細胞介導之細胞殺傷所需之CD47臨限值水準，將與同型對照相比$B2M^{-/-}$; CD47*tg* β胰島細胞中CD47之表現水準與小鼠NK細胞之殺傷進行平行分析。藉由流式細胞術(使用標準方法)分析$B2M^{-/-}$; CD47*tg* β胰島細胞。將細胞用抗Fc受體抗體封閉且用與同型對照濃度匹配之抗CD47抗體染色。如圖1A-1N中所顯示，$B2M^{-/-}$; CD47*tg* β胰島細胞表現相對於基線不同水準之CD47。在XCelligence MP平台(ACEA BioSciences, San Diego, CA)上實施小鼠NK細胞之NK細胞

殺傷分析。如圖1A-1N中所顯示，對表現比基線增加6.2倍、8.9倍、11.7倍或15.3倍之CD47之B2M$^{-/-}$; CD47*tg* β胰島細胞觀察到NK細胞殺傷。相比之下，對表現比基線增加19.1倍、38.4倍或72.5倍之CD47之B2M$^{-/-}$; CD47*tg* β胰島細胞未觀察到NK細胞殺傷。數據顯示，表現等於或高於臨限值水準之CD47之小鼠B2M$^{-/-}$; CD47*tg*原代β胰島細胞逃避NK細胞之免疫反應。小鼠NK細胞會殺傷相對於基線具有15.3倍或更低之CD47表現之該等原代小鼠β胰島，而小鼠NK細胞不會殺傷相對於基線具有19.1倍或更大之CD47表現之原代小鼠胰島細胞。

實例4：減少T細胞之MHC-I/II表現且增加其CD47表現

【1477】使用BD Quantibrite™珠粒來評價B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$; CD47*tg*原代人類T細胞中之總CD47分子數。評估B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$; CD47*tg*原代人類T細胞中不同之CD47蛋白水準對細胞逃避免疫反應之能力的效應。

【1478】為確定T細胞逃避NK細胞介導之細胞殺傷所需之CD47臨限值水準，在XCelligence MP平台(ACEA BioSciences, San Diego, CA)上使用包含不同CD47分子數/細胞之經修飾原代T細胞來實施NK細胞及巨噬細胞殺傷分析。如圖2A-2AB中所顯示，對表現53,118個或64,778個分子/細胞之內源CD47水準的B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$ T細胞以及對表現131,534個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約2至約2.5倍，或相對於對照細胞高約100%至約150%

之量之CD47)、95,893個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約1.5至約1.8倍，或相對於對照細胞高約50%至約80%之量之CD47)、135,284個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約2.1至約2.5倍，或相對於對照細胞高約110%至約150%之量之CD47)、168,751個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約2.6至約3.2倍，或相對於對照細胞高約160%至約220%之量之CD47)或179,236個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約2.8至約3.4倍，或相對於對照細胞高約180%至約240%之量之CD47)之CD47水準的B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$; CD47*tg* T細胞觀察到NK細胞及巨噬細胞殺傷。相比之下，對表現222,777個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約3.4至約4.2倍，或相對於對照細胞高約240%至約320%之量之CD47)、290,942個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約4.5至約5.5倍，或相對於對照細胞高約350%至約450%之量之CD47)、369,671個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約5.7至約7倍，或相對於對照細胞高約470%至約600%之量之CD47)、415,996個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約6.4至約7.8倍，或相對於對照細胞高約540%至約680%之量之CD47)、439,189個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約6.8至約8.3倍，或相對於對照細胞高約580%至約730%之量之CD47)、585,377個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約9至約11倍，或相對於對照細胞高約800%至約

1000%之量之CD47)或689,168個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約10.6至約13倍，或相對於對照細胞高約960%至約1200%之量之CD47)之CD47水準的B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$;CD47*tg* T細胞未觀察到NK細胞殺傷。

【1479】數據顯示，表現等於或高於臨限值水準之CD47之B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$;CD47*tg*原代T細胞逃避NK細胞之免疫反應。NK細胞及巨噬細胞會殺傷具有179,236個或更少CD47分子/細胞之該等T細胞，而NK細胞或巨噬細胞不會殺傷具有222,777個或更多CD47分子/細胞之T細胞。

實例5：減少原代人類胰島細胞之MHC-II表現且增加其CD47表現

【1480】使用BD Quantibrite™珠粒來評價B2M$^{-/-}$; CD47*tg*原代人類β胰島中之總CD47分子數。評估B2M$^{-/-}$; CD47*tg*原代β胰島中不同之CD47蛋白水準對細胞逃避免疫反應之能力的效應。

【1481】為確定胰島細胞逃避NK細胞介導之細胞殺傷所需之CD47臨限值水準，在XCelligence MP平台(ACEA BioSciences, San Diego, CA)上使用包含不同CD47分子數/細胞之經修飾胰島細胞來實施NK細胞殺傷分析。

【1482】如圖3A-3L中所顯示，對表現53,174個或60,410個分子/細胞之內源CD47水準的B2M$^{-/-}$; CD47*tg*原代β胰島細胞以及對表現91,558個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約1.7倍或1.5倍，或相對於對照細胞高

約70%或50%之量之CD47)、109,366個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約2倍或1.8倍，或相對於對照細胞高約100%或80%之量之CD47)、152,475個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約3倍或2.5倍，或相對於對照細胞高約200%或150%之量之CD47)及184,773個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約3.5倍或3倍，或相對於對照細胞高約250%或200%之量之CD47)的$B2M^{-/-}$; CD47*tg*原代β胰島細胞觀察到NK細胞殺傷。相比之下，對表現203,853個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約3.8倍，或相對於對照細胞高約280%之量之CD47)、226,566個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約4.3倍，或相對於對照細胞高約330%之量之CD47)、271,191個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約5倍，或相對於對照細胞高約400%之量之CD47)、297,154個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約5.6倍，或相對於對照細胞高約460%之量之CD47)、572,920個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約10.8倍，或相對於對照細胞高約980%之量之CD47)或802,429個分子/細胞(對照細胞中表現之CD47內源水準的約15.1倍，或相對於對照細胞高約1410%之量之CD47)之CD47水準的$B2M^{-/-}$; CD47*tg*原代β胰島細胞未觀察到NK細胞殺傷。

【1483】數據顯示，表現等於或高於臨限值水準之CD47之$B2M^{-/-}$; CD47*tg*原代人類β胰島細胞逃避NK細胞之

免疫反應。NK細胞會殺傷具有184,773個或更少CD47分子/細胞之該等胰島細胞，而NK細胞不會殺傷具有203,853個或更多CD47分子/細胞之胰島細胞。

實例6：原代人類RPE細胞之編輯

【1484】未經修飾之原代人類視網膜色素上皮(RPE)細胞表現HLA-I、不表現HLA-II及低CD47 (參見例如圖4A-4C)。

【1485】用含有CD47轉基因之慢病毒載體轉導原代人類RPE細胞以生成B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$; CD47*tg*原代RPE細胞。對攜載CD47 cDNA轉基因之慢病毒粒子測試一系列MOI。24小時後，移除病毒且更換完全培養基。使用螢光標記之抗CD47使用標準FACS系統使細胞經受分選。

【1486】藉由流式細胞術使用抗體特異性試劑評價一或多種HLA-I、HLA-II及CD47在B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$; CD47*tg*原代RPE上之表面表現。使用同型抗體作為對照。參見圖5A-5D。

【1487】評估B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$; CD47*tg* RPE細胞中不同之CD47蛋白水準及細胞逃避免疫反應之能力的效應。

【1488】將與同型對照相比未經修飾、B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$ (dKO)及B2M$^{-/-}$; CIITA$^{-/-}$; CD47*tg* (HIP)原代RPE細胞中CD47之表現水準與NK細胞及巨噬細胞之殺傷之評價進行平行分析。藉由流式細胞術(使用標準方法)分析RPE細胞。將細胞用抗Fc受體抗體封閉且用與同型對照濃度匹

配之抗CD47抗體染色。如圖6A-6I中所顯示，$B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$ (dKO) RPE細胞表現相對於基線約1.8倍水準之CD47，且$B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; CD47*tg* (HIP) RPE細胞表現相對於基線約20倍水準之CD47。在XCelligence MP平台(ACEA BioSciences, San Diego, CA)上實施NK細胞及巨噬細胞之殺傷分析。如圖7A-7I中所顯示，對於dKO RPE觀察到NK及巨噬細胞殺傷，但對於HIP RPE未觀察到NK及巨噬細胞殺傷。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="122864-5066-WO
Sequence Listing_from WIPO (已修改).xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.2.0" productionDate="2022-11-28">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>111130279</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-08-11</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>122864-01-5066-TW</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>US 63/232,141</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2021-08-11</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">美商薩那生物科技公司</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>Sana Biotechnology, Inc.</ApplicantNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">用於改變低免疫原性細胞中之基因表現之可誘導系
統</InventionTitle>
 <InventionTitle languageCode="en">INDUCIBLE SYSTEMS FOR ALTERING GENE
EXPRESSION IN HYPOIMMUNOGENIC CELLS</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>130</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length/>
   <INSDSeq_moltype/>
   <INSDSeq_division/>
   <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length/>
   <INSDSeq_moltype/>
   <INSDSeq_division/>
   <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
```

```
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q1">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic peptide</INSDQualifier_value>
```

```
      <NonEnglishQualifier_value>合成肽</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q2">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MALPVTALLLPLALLLHAARP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q3">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic peptide</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成肽</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q4">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>METDTLLLWVLLLWVPGSTG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q5">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic peptide</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成肽</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q6">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="9">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>45</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..45</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q7">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic hinge domain</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成鉸鏈結構域</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..45</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q8">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD</INSDSeq_sequenc
e>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="10">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>39</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..39</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q9">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic hinge domain</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成鉸鏈結構域</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..39</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q10">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q11">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic hinge domain</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成鉸鏈結構域</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q12">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ESKYGPPCPPCP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q13">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic hinge domain</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成鉸鏈結構域</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q14">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ESKYGPPCPSCP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>229</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..229</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q15">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic hinge domain</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成鉸鏈結構域</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..229</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q16">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSLGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q17">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic transmembrane domain</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成跨膜結構域</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q18">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
```

```
  <INSDSeq_sequence>IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q19">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic transmembrane domain</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成跨膜結構域</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q20">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>42</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..42</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q21">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic costimulatory domain</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成共刺激結構域</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..42</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q22">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>41</INSDSeq_length>
```

```
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..41</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q23">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic costimulatory domain</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成共刺激結構域</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..41</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q24">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="18">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q25">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic signaling domain</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成信號傳導結構域</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q26">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>245</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..245</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q27">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..245</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q28">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQS
LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAK
HYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="20">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q29">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q30">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="21">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier id="q31">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q32">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>QDISKY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="22">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="23">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q35">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q36">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QQGNTLPYT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="24">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q37">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid linker</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸連接體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q38">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSTSGSGKPGSGEGSTKG</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="25">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q39">
```

```
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q40">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSA
LKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="26">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q41">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
```

```
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q42">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GVSLPDYG</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q43">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q44">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>IWGSETT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q45">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q46">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>AKHYYYGGSYAMDY</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="29">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>242</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..242</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q47">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..242</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q48">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSV
TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYY
YGGSYAMDYWGQGTSVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="30">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q49">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid linker</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸連接體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q50">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GGGGSGGGGSGGGGS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="31">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>1458</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1458</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q51">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic nucleotide sequence</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成核苷酸序列</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1458</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q52">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggcc
ggacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtc
aggacattagtaaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccatacatcaaga
ttacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggaacagattattctctcaccattagcaacctggagca
agaagatattgccacttacttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagatca
caggtggcggtggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcggatctgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctg
gtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattacccgactatggtgtaagctggattcg
ccagcctccacgaaagggtctggagtggctgggagtaatatggggtagtgaaaccacatactataattcagctctcaaat
ccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagcc
atttactactgtgccaaacattattactacggtggtagctatgctatggactactggggccaaggaacctcagtcaccgt
ctcctcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccag
aggcgtgccggccagcggcgggggcgcagtgcacacgaggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgccc
ttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgta
tatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaag
aagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtacaagcagggccagaaccagctc
tataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggg
aaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgaga
ttgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacc
tacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="32">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>486</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..486</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier id="q53">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..486</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q54">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD
GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGG
SEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG
LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA
DAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="33">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1383</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..1383</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q55">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic nucleotide sequence</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成核苷酸序列</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..1383</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q56">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgagctgccccaccccgcctttctgctgat
ccccgacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcgaccgggtgaccatcagctgccgggcca
gccaggacatcagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagc
cggctgcacagcggcgtgcccagccggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctgga
acaggaagatatcgccacctacttttgccagcagggcaacacactgccctacacctttggcggcggaacaaagctggaaa
tcaccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcagcaccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagc
ggccctggcctggtggccccagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgt
gagctggatccggcagccccccaggaagggcctggaatggctgggcgtgatctggggcagcgagaccacctactacaaca
gcgccctgaagagccggctgaccatcatcaaggacaacagcaagagccaggtgttcctgaagatgaacagcctgcagacc
gacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacggcggcagctacgccatggactactggggccagggcac
cagcgtgaccgtgagcagcgaatctaagtacggaccgccctgccccccttgccctatgttctgggtgctggtggtggtcg
gaggcgtgctggcctgctacagcctgctggtcaccgtggccttcatcatcttttgggtgaaacggggcagaaagaaactc
ctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccaga
agaagaagaaggaggatgtgaactgcgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaatc
```

agctgtacaacgagctgaacctgggcagaagggaagagtacgacgtcctggataagcggagaggccgggaccctgagatg
ggcggcaagcctcggcggaagaacccccaggaaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacag
cgagatcggcatgaagggcgagcggaggcggggcaagggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaagg
atacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaagg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="34">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>461</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..461</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier id="q57">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..461</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q58">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP
DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGE
GSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSK
SQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAF
IIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR<
/INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1467</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1467</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier id="q59">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Synthetic nucleotide sequence</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成核苷酸序列</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1467</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q60">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgat
cccagacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaa
gtcaggacattagtaaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccatacatca
agattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggaacagattattctctcaccattagcaacctgga
gcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggaggggggactaagttggaaa
taacaggctccacctctggatccggcaagcccggatctggcgagggatccaccaagggcgaggtgaaactgcaggagtca
ggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattacccgactatggtgt
aagctggattcgccagcctccacgaaagggtctggagtggctgggagtaatatggggtagtgaaaccacatactataatt
cagctctcaaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagtctgcaaact
gatgacacagccatttactactgtgccaaacattattactacggtggtagctatgctatggactactggggtcaaggaac
ctcagtcaccgtctcctcagcggccgcaattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaa
ccattatccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttttgggtgctggtg
gtggttgggggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtgaggagtaagaggag
caggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaagcattaccagccctatgccc
caccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccag
aaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctga
gatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcct
acagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccacc
aaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="36">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>489</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..489</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q61">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..489</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q62">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP
DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGE
GSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSK
SQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPL
FPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFS
RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="37">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>246</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..246</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q63">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..246</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q64">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFS
GSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLQQSGAELVKPGASV
KMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCAR
SNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="38">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>106</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..106</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q65">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..106</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q66">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFS
GSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="39">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q67">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q68">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>RASSSVNYMD</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="40">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q69">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q70">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ATSNLAS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="41">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q71">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q72">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QQWSFNPPT</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="42">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>122</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q73">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q74">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQ
KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="43">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q75">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q76">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>SYNMH</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="44">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q77">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q78">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>AIYPGNGDTSYNQKFKG</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="45">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>246</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..246</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q79">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..246</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q80">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYND
YAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ
MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDF
ATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="46">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>124</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..124</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q81">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..124</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q82">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYND
YAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMVTVSS</INSDSeq_sequence
>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="47">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q83">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q84">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
```

```
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GDSVSSNSAA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="48">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q85">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q86">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>TYYRSKWYN</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="49">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q87">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q88">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>AREVTGDLEDAFDI</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="50">
 <INSDSeq>
```

```
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q89">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q90">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRF
SGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="51">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q91">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q92">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QTIWSY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="52">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="53">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q95">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q96">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QQSYSIPQT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="54">
 <INSDSeq>
```

```
    <INSDSeq_length>246</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..246</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q97">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..246</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q98">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQQSGPGMVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSVAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSTWYND
YAVSMKSRITINPDTNKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ
MIQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYRQRPGEAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDF
ATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="55">
   <INSDSeq>
```

```
    <INSDSeq_length>124</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..124</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q99">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..124</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q100">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQQSGPGMVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSVAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSTWYND
YAVSMKSRITINPDTNKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMVTVSS</INSDSeq_sequence
>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="56">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q101">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q102">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GDSVSSNSVA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="57">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q103">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q104">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>TYYRSTWYN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="58">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q105">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q106">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>AREVTGDLEDAFDI</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="59">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q107">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q108">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMIQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYRQRPGEAPNLLIYAASSLQSGVPSRF
SGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="60">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q109">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q110">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>QTIWSY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="61">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="62">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q113">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q114">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QQSYSIPQT</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="63">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>246</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..246</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q115">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..246</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q116">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVLTQSPASLAMSLGKRATISCRASESVSVIGAHLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGV
PARFSGSGSGTDFTLTIDPVEEDDVAIYSCLQSRIFPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKK
PGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTAT
YFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="64">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q117">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q118">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVLTQSPASLAMSLGKRATISCRASESVSVIGAHLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGV
PARFSGSGSGTDFTLTIDPVEEDDVAIYSCLQSRIFPRTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="65">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q119">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q120">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>RASESVSVIGAHLIH</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="66">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q121">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q122">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>LASNLET</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="67">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q123">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q124">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>LQSRIFPRT</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="68">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>117</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..117</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q125">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..117</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q126">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAY
DFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="69">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q127">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q128">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>DYSIN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="70">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q129">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q130">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>WINTETREPAYAYDFRG</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="71">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q131">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q132">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>DYSYAMDY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="72">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>246</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..246</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q133">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..246</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q134">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGV
PARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKK
```

PGETVKISCKASGYTFRHYSMNWVKQAPGKGLKWMGRINTESGVPIYADDFKGRFAFSVETSASTAYLVINNLKDEDTAS
YFCSNDYLYSLDFWGQGTALTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="73">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier id="q135">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q136">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGV
PARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>

```
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="74">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q137">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q138">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RASESVTILGSHLIY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="75">
```

```
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q139">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q140">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>LASNVQT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="76">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q141">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q142">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>LQSRTIPRT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="77">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>117</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..117</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q143">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..117</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q144">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYSMNWVKQAPGKGLKWMGRINTESGVPIYAD
DFKGRFAFSVETSASTAYLVINNLKDEDTASYFCSNDYLYSLDFWGQGTALTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="78">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q145">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q146">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>HYSMN</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="79">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q147">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q148">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RINTESGVPIYADDFKG</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="80">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q149">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q150">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DYLYSLDF</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="81">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>121</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..121</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q151">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..121</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q152">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGDYIYYAD
SVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGTGANSSLADYRGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="82">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q153">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q154">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GFTFSSYA</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="83">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q155">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q156">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ISGSGDYI</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="84">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q157">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q158">
```

```
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>AKEGTGANSSLADY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="85">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q159">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic poymer</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成聚合物</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q160">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>tctctccatgtgcagtagga</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="86">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q161">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic poymer</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成聚合物</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q162">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
```

```
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ctggatgtcggaggagtacg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="87">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q163">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic poymer</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成聚合物</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q164">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gtctccggaaactcgaggtg</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="88">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q165">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic poymer</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成聚合物</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q166">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>acagtgtagacttgattgac</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="89">
 <INSDSeq>
```

```
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q167">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic poymer</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成聚合物</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q168">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>cgtgagtaaacctgaatctt</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="90">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q169">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic poymer</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成聚合物</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q170">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gatattggcataagcctccc</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="91">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q171">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic poymer</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成聚合物</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q172">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>agagtctctcagctggtaca</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="92">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="93">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q176">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic poymer</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成聚合物</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q177">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gttttagagcta</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="94">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="95">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>63</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..63</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q180">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic poymer</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成聚合物</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..63</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q181">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgctt
t</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
```

<SequenceData sequenceIDNumber="96">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>99</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..99</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier id="q182">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic poymer</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成聚合物</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier id="q183">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>n is a, c, g, or u</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>n為a、c、g或u</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..99</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q184">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>

<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>nnnnnnnnnnnnnnnnnnngttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccg
ttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcttt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="97">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length/>
<INSDSeq_moltype/>
<INSDSeq_division/>
<INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="98">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length/>
<INSDSeq_moltype/>
<INSDSeq_division/>
<INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="99">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length/>
<INSDSeq_moltype/>
<INSDSeq_division/>
<INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="100">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length/>
<INSDSeq_moltype/>
<INSDSeq_division/>
<INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>

```
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="101">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="102">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="103">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="104">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="105">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
```

```
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="106">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="107">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="108">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="109">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="110">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
```

```
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="111">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="112">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="113">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>42</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..42</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q185">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic hinge domain</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成鉸鏈結構域</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..42</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q186">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="114">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>28</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q187">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic transmembrane domain</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成跨膜結構域</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..28</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q188">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="115">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q189">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic signaling domain</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成信號傳導結構域</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q190">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="116">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1467</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1467</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q191">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic nucleotide sequence</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成核苷酸序列</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1467</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q192">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggcc
ggacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtc
aggacattagtaaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccatacatcaaga
ttacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggaacagattattctctcaccattagcaacctggagca
agaagatattgccacttacttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagatca
caggctccacctctggatccggcaagcccggatctggcgagggatccaccaagggcgaggtgaaactgcaggagtcagga
cctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattacccgactatggtgtaag
ctggattcgccagcctccacgaaagggtctggagtggctgggagtaatatggggtagtgaaaccacatactataattcag
ctctcaaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagtctgcaaactgat
gacacagccatttactactgtgccaaacattattactacggtggtagctatgctatggactactggggccaaggaacctc
agtcaccgtctcctcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccc
tgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgatatctacatc
tgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccctttactgcaaacggggcagaaagaa
actcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttc
cagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccag
aaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctga
gatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcct
acagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccacc
aaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="117">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>489</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..489</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q193">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

<INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..489</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q194">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD
GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEG
STKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKS
QVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH
TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS
RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="118">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>243</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..243</INSDFeature_location>

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q195">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..243</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q196">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYDLLTFGGGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQLQLQESGPGLVKPSETL
SLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSISYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA
RDRGDTILDVWGQGTMVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="119">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>106</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..106</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q197">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..106</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q198">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYDLLTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="120">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q199">
```

```
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q200">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QSISSY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="121">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="122">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q203">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q204">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>QQKYDLLT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="123">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q205">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q206">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSISYSGSTYYN
PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDTILDVWGQGTMVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="124">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q207">
```

```
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q208">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GGSISSSSYY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="125">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q209">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q210">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ISYSGST</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="126">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q211">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q212">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ARDRGDTILDV</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="127">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>1503</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1503</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q213">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic nucleotide sequence</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成核苷酸序列</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1503</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q214">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggcc
ggacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtc
agagcattagcagctatttaaattggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagt
ttgcaaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtctgcaacc
tgaagattttgcaacttactactgtcagcaaaaatacgacctcctcacttttggcggagggaccaaggttgagatcaaag
gcagcaccagcggctccggcaagcctggctctggcgagggcagcacaaagggacagctgcagctgcaggagtcgggccca
ggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtggctccatcagcagtagtagttactactg
gggctggatccgccagccccccagggaaggggctggagtggattgggagtatctcctatagtgggagcacctactacaacc
cgtccctcaagagtcgagtcaccatatccgtagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagttctgtgaccgcc
gcagacacggcggtgtactactgcgccagagatcgtggagacaccatactagacgtatggggtcagggtacaatggtcac
cgtcagctcattcgtgcccgtgttcctgcccgccaaacctaccaccacccctgcccctagacctcccaccccagccccaa
caatcgccagccagcctctgtctctgcggcccgaagcctgtagacctgctgccggcggagccgtgcacaccagaggcctg
gacttcgcctgcgacatctacatctgggcccctctggccggcacctgtggcgtgctgctgctgagcctggtgatcaccct
gtactgcaaccaccggaacaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaa
ctactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagc
agatccgccgacgcccctgcctaccagcagggacagaaccagctgtacaacgagctgaacctgggcagacgggaagagta
cgacgtgctggacaagcggagaggccgggaccccgagatgggcggaaagcccagacggaagaaccccccaggaaggcctgt
ataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggaggcgcggcaagggc
cacgatggcctgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggacacctacgacgcccctgcacatgcaggccctgcccccag
a</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="128">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>501</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..501</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q215">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Synthetic amino acid</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成胺基酸</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..501</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q216">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG
KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYDLLTFGGGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGS
TKGQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSISYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSK
NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDTILDVWGQGTMVTVSSFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR
PAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE
EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="129">
```

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>305</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..305</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q217">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Human CD47 (without signal sequence) (aa 19-
323)</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>人類CD47（不具信號序列）(aa 19-
323)</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..305</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q218">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTD
FSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQF
GIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIA
ILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMM
NDE</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="130">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>323</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..323</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q219">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Human CD47 (with signal sequence) (aa 1-
323)</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>人類CD47（具有信號序列）(aa 1-
323)</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..323</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q220">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKG
RDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNEN
ILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILIL
```

LHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPP
RKAVEEPLNAFKESKGMMNDE</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種經改造細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項2】一種經改造細胞，其包含相對於對照增加CD47表現之可調控修飾。

【請求項3】如請求項1或2之經改造細胞，其中該經改造細胞選自由以下組成之群：幹細胞、多能幹細胞(PSC)、誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)、造血幹細胞(HSC)、胚胎幹細胞(ESC)、胰島細胞、β胰島細胞、免疫細胞、B細胞、T細胞、自然殺手(NK)細胞、自然殺手T (NKT)細胞、巨噬細胞、免疫特權細胞、視覺細胞、視網膜色素上皮細胞(RPE)、肝細胞、甲狀腺細胞、內皮細胞、皮膚細胞、神經膠質祖細胞、神經細胞、肌肉細胞、心臟細胞及血球。

【請求項4】一種經改造胰島細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項5】如請求項4之經改造胰島細胞，其中該胰島細胞係β胰島細胞。

【請求項6】一種經改造內皮細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，

及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項7】一種經改造心肌細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項8】一種經改造平滑肌細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項9】一種經改造骨骼肌細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項10】一種經改造肝細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項11】一種經改造神經膠質祖細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項12】一種經改造多巴胺能神經元，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之

表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項13】一種經改造免疫特權細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項14】一種經改造視網膜色素上皮細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項15】一種經改造甲狀腺細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項16】一種經改造免疫細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項17】如請求項16之經改造免疫細胞，其中該經改造免疫細胞包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之外源多核苷酸。

【請求項18】一種經改造T細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限

值水準或更高水準表現CD47。

【請求項19】如請求項18之經改造T細胞，其中該經改造T細胞包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之外源多核苷酸。

【請求項20】一種經改造NK細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項21】如請求項20之經改造T細胞，其中該經改造T細胞包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之外源多核苷酸。

【請求項22】一種經改造巨噬細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加CD47之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現CD47。

【請求項23】如請求項1至22中任一項之經改造細胞，其中相對於該對照，該細胞表現至少約相同量之CD47。

【請求項24】如請求項23之經改造細胞，其中該細胞係免疫特權細胞。

【請求項25】如請求項1至24中任一項之經改造細胞，其中相對於該對照，該細胞表現至少高約10%之量之CD47。

【請求項26】如請求項1至25中任一項之經改造細

胞，其中相對於該對照，該細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之CD47。

【請求項27】如請求項1至26中任一項之經改造細胞，其中相對於該對照，該細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之CD47。

【請求項28】如請求項1至27中任一項之經改造細胞，其中相對於該對照，該細胞表現至少高約1000%之量之CD47。

【請求項29】如請求項1至24中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍。

【請求項30】如請求項1至24或29中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之CD47水準的至少約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍或約5倍。

【請求項31】如請求項1至24、29或30中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之CD47水準的至少約4倍、約4.5倍、約5倍或約5.5倍。

【請求項32】如請求項1至24或29至31中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之CD47水準的至少約4倍。

【請求項33】如請求項1至24或29至32中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之CD47水準的

至少約4.5倍。

【請求項34】如請求項1至24或29至33中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之CD47水準的至少約5倍。

【請求項35】如請求項1至24或29至34中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之CD47水準的至少約5.5倍。

【請求項36】如請求項1至24或29至35中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之CD47水準的至少約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍。

【請求項37】如請求項1至36中任一項之經改造細胞，其中該對照係野生型細胞、對照細胞或基線參考。

【請求項38】如請求項37之經改造細胞，其中該對照細胞係未經修飾或未經改變之細胞，視情況地其中該未經修飾或未經改變之細胞具有與該經改造細胞相同之細胞類型。

【請求項39】如請求項37或38之經改造細胞，其中該對照細胞係來自供體之起始材料或來自供體集合之起始細胞集合。

【請求項40】如請求項37之經改造細胞，其中該基線參考係同型對照或背景信號水準。

【請求項41】如請求項37或40之經改造細胞，其中該基線係同型對照，視情況地其中該CD47水準係使用基於抗體之分析測定。

【請求項42】如請求項41之經改造細胞，其中該CD47水準係使用基於抗體之量化方法、視情況選用之Quantibrite™分析來測定。

【請求項43】如請求項40至42中任一項之經改造細胞，其中該經改造細胞係β胰島細胞，其表現至少約200,000個、250,000個、300,000個、350,000個或400,000個CD47分子/細胞。

【請求項44】如請求項40至42中任一項之經改造細胞，其中經改造細胞係視網膜色素上皮細胞，其表現比基線增加至少約2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、12倍、14倍、16倍、18倍、20倍或更高之CD47表現。

【請求項45】如請求項40至42中任一項之經改造細胞，其中該經改造細胞係T細胞，其表現至少約180,000個、190,000個、200,000個、210,000個、220,000個、230,000個、240,000個、250,000個、260,000個、270,000個、280,000個、290,000個、300,000個、350,000個、400,000個、450,000個、500,000個、550,000個、600,000個、650,000個或700,000個CD47分子/細胞。

【請求項46】一種經改造細胞，其包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類人類白血球抗原之表現，及ii)增加一或多種耐受原性因子之表現的修飾，其中該經改造細胞以臨限值水準或更高水準表現該耐受原性因子。

【請求項47】如請求項46之經改造細胞，其中該經改造細胞選自由以下組成之群：幹細胞、多能幹細胞(PSC)、誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)、造血幹細胞(HSC)、胚胎幹細胞(ESC)、胰島細胞、β胰島細胞、免疫細胞、B細胞、T細胞、自然殺手(NK)細胞、自然殺手T (NKT)細胞、巨噬細胞、免疫特權細胞、視覺細胞、視網膜色素上皮細胞(RPE)、肝細胞、甲狀腺細胞、內皮細胞、皮膚細胞、神經膠質祖細胞、神經細胞、肌肉細胞、心臟細胞及血球。

【請求項48】如請求項46或47之經改造細胞，其中該對照係野生型細胞、對照細胞或基線參考。

【請求項49】如請求項48之經改造細胞，其中該對照細胞係未經修飾或未經改變之細胞，視情況地其中該未經修飾或未經改變之細胞具有與該經改造細胞相同之細胞類型。

【請求項50】如請求項48或49之經改造細胞，其中該對照細胞係來自供體之起始材料或來自供體集合之起始細胞集合。

【請求項51】如請求項48之經改造細胞，其中該基線參考係同型對照或背景信號水準。

【請求項52】如請求項48或51之經改造細胞，其中該基線係同型對照，視情況地其中該耐受原性因子之量係使用基於抗體之分析測定。

【請求項53】如請求項52之經改造細胞，其中該耐受

原性因子之量係使用基於抗體之量化方法、視情況選用之Quantibrite™分析來測定。

【請求項54】如請求項46至53中任一項之經改造細胞，其中相對於該對照，該細胞表現至少約相同量之耐受原性因子。

【請求項55】如請求項54之經改造細胞，其中該細胞係免疫特權細胞。

【請求項56】如請求項46至55中任一項之經改造細胞，其中相對於該對照，該細胞表現至少高約10%之量之該耐受原性因子。

【請求項57】如請求項46至56中任一項之經改造細胞，其中相對於該對照，該細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之該耐受原性因子。

【請求項58】如請求項46至57中任一項之經改造細胞，其中相對於該對照，該細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之該耐受原性因子。

【請求項59】如請求項46至58中任一項之經改造細胞，其中相對於該對照，該細胞表現至少高約1000%之量之該耐受原性因子。

【請求項60】如請求項46至55中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之該耐受原性因子水準的至少約1.1倍。

【請求項61】如請求項46至55或60中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之該耐受原性因子水準的至少約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍或約5倍。

【請求項62】如請求項46至55、60或61中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之該耐受原性因子水準的至少約4倍、約4.5倍、約5倍或約5.5倍。

【請求項63】如請求項46至55或60至62中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之該耐受原性因子水準的至少約4倍。

【請求項64】如請求項46至55或60至63中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之該耐受原性因子水準的至少約4.5倍。

【請求項65】如請求項46至55或60至64中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之該耐受原性因子水準的至少約5倍。

【請求項66】如請求項46至55或60至65中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之該耐受原性因子水準的至少約5.5倍。

【請求項67】如請求項46至55或60至66中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之該耐受原性因子水準的至少約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍。

【請求項68】如請求項1至67中任一項之經改造細胞，其中該等修飾減少以下之表現：

a. MHC I類分子；

b. MHC II類分子；或

c. MHC I類分子及MHC II類分子。

【請求項69】如請求項1至68中任一項之經改造細胞，其中相對於對照，該等修飾減少以下中之一或多者之表現：B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B及/或NFY-C。

【請求項70】如請求項1至66中任一項之經改造細胞，其中該細胞並不表現MHC I類分子及/或MHC II類分子。

【請求項71】如請求項1至70中任一項之經改造細胞，其中相對於對照，該細胞並不表現以下中之一或多者：B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B及/或NFY-C。

【請求項72】如請求項71之經改造細胞，其中該等修飾包含一或多個選自由以下組成之群之靶之敲除：B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B及/或NFY-C。

【請求項73】如請求項1至72中任一項之經改造細胞，其中該等修飾減少一或多個選自由以下組成之群之靶之表現：B2M、TAP1、NLRC5及/或CIITA。

【請求項74】如請求項73之經改造細胞，其中該等修飾包含一或多個選自由以下組成之群之靶之敲除：B2M、TAP1、NLRC5及/或CIITA。

【請求項75】如請求項72或74之經改造細胞，其中該敲除發生在兩個對偶基因中。

【請求項76】如請求項1至75中任一項之經改造細胞，其中該細胞進一步包含一或多種修飾，相對於對照，該一或多種修飾減少CTLA-4、PD-1、IRF1、MIC-A、MIC-B、參與氧化或ER應激之蛋白質、TRAC、TRB、CD142、ABO、CD38、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD之表現。

【請求項77】如請求項76之經改造細胞，其中參與氧化或ER應激之該蛋白質選自由以下組成之群：硫氧還蛋白相互作用蛋白(TXNIP)、PKR樣ER激酶(PERK)、肌醇需求酶1α (IRE1α)及DJ-1 (PARK7)。

【請求項78】如請求項76或77之經改造細胞，其中該等修飾包含一或多個選自由以下組成之群之靶之敲除：CTLA-4、PD-1、IRF1、MIC-A、MIC-B、參與氧化或ER應激之蛋白質、TRAC、TRB、CD142、ABO、CD38、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【請求項79】如請求項78之經改造細胞，其中該敲除

發生在兩個對偶基因中。

【請求項80】如請求項1至79中任一項之經改造細胞，其中該等修飾減少B2M之表現。

【請求項81】如請求項1至79中任一項之經改造細胞，其中該等修飾減少CIITA之表現。

【請求項82】如請求項1至79中任一項之經改造細胞，其中該等修飾減少B2M及CIITA之表現。

【請求項83】如請求項80至82中任一項之經改造細胞，其中該等修飾包含B2M及/或CIITA之敲除。

【請求項84】如請求項83之經改造細胞，其中該B2M及/或CIITA敲除發生在兩個對偶基因中。

【請求項85】如請求項1至84中任一項之經改造細胞，其中該等修飾減少NK細胞配位體、視情況地MIC-A及/或MIC-B之表現。

【請求項86】如請求項85之經改造細胞，其中該等修飾包含MIC-A及/或MIC-B之敲除。

【請求項87】如請求項86之經改造細胞，其中該MIC-A及/或MIC-B敲除發生在兩個對偶基因中。

【請求項88】如請求項1至87中任一項之經改造細胞，其中該細胞進一步包含相對於對照減少一或多種Y染色體基因之表現之修飾。

【請求項89】如請求項88之經改造細胞，其中該一或多種Y染色體基因選自由Y連鎖原鈣黏蛋白-11及Y連鎖神經配蛋白-4組成之群。

【請求項90】如請求項1至89中任一項之經改造細胞，其中該等修飾減少TXNIP之表現。

【請求項91】如請求項90之經改造細胞，其中該等修飾包含TXNIP之敲除。

【請求項92】如請求項91之經改造細胞，其中該TXNIP敲除發生在兩個對偶基因中。

【請求項93】如請求項1至92中任一項之經改造細胞，其中該細胞進一步包含減少以下之表現之修飾：B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、CTLA-4、PD-1、IRF1、MIC-A、MIC-B、參與氧化或ER應激之蛋白質、TRAC、TRB、CD142、ABO、CD38、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【請求項94】如請求項92之經改造細胞，其中該細胞並不表現B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、CTLA-4、PD-1、IRF1、MIC-A、MIC-B、參與氧化或ER應激之蛋白質、TRAC、TRB、CD142、ABO、CD38、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【請求項95】如請求項1至92中任一項之經改造細胞，其中該細胞進一步包含相對於對照減少以下之表現之修飾：B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、

ABO、MIC-A/B、CD38、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【請求項96】如請求項95之經改造細胞，其中該細胞並不表現B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【請求項97】如請求項1至45中任一項之經改造細胞，其中該細胞包含減少一或多種耐受原性因子之表現之其他修飾。

【請求項98】如請求項97之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子選自由以下組成之群：A20/TNFAIP3、C1抑制劑、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受體、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1及/或Serpinb9。

【請求項99】如請求項46至67中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子選自由以下組成之群：A20/TNFAIP3、C1抑制劑、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受體、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、

Mfge8、PD-1、PD-L1及/或Serpinb9。

【請求項100】如請求項46至67及99中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含CD47。

【請求項101】如請求項46至67及97至100中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含HLA-E。

【請求項102】如請求項46至67及97至101中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含CD24。

【請求項103】如請求項46至67及97至102中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含PD-L1。

【請求項104】如請求項46至67及97至103中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含CD46。

【請求項105】如請求項46至67及97至104中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含CD55。

【請求項106】如請求項46至67及97至105中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含CD59。

【請求項107】如請求項46至67及97至106中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含CR1。

【請求項108】如請求項46至67及97至107中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含MANF。

【請求項109】如請求項46至67及97至108中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含A20/TNFAIP3。

【請求項110】如請求項46至67及97至109中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含HLA-E及

CD47。

【請求項111】如請求項46至67及97至110中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含CD24、CD47及/或PDL1中之一或多者。

【請求項112】如請求項46至67及97至111中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含HLA-E、CD24、CD47及/或PDL1中之一或多者。

【請求項113】如請求項46至67及97至112中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含CD46、CD55、CD59及/或CR1中之一或多者。

【請求項114】如請求項46至67及97至113中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含HLA-E、CD46、CD55、CD59及/或CR1中之一或多者。

【請求項115】如請求項46至67及97至114中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59及/或CR1中之一或多者。

【請求項116】如請求項46至67及97至115中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含HLA-E及PDL1。

【請求項117】如請求項46至67及97至116中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含HLA-E、PDL1及/或A20/TNFAIP中之一或多者。

【請求項118】如請求項46至67及97至117中任一項之

經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含HLA-E、PDL1及/或MANF中之一或多者。

【請求項119】如請求項46至67及97至118中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子包含HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP及/或MANF中之一或多者。

【請求項120】如請求項1至99中任一項之經改造細胞，其中該等修飾：

a. 減少MHC I類及/或MHC II類分子之表現；

b. 減少MIC-A及/或MIC-B之表現；

c. 增加CD47及視情況存在之CD24及PD-L1之表現；且

d. 增加CD46、CD55、CD59及CR1之表現。

【請求項121】如請求項1至99中任一項之經改造細胞，其中該修飾：

a. 減少MHC I類分子之表現；

b. 減少MIC-A及/或MIC-B之表現；

c. 減少TXNIP之表現；且

d. 增加PD-L1及HLA-E之表現。

【請求項122】如請求項121之經改造細胞，其中該等修飾進一步增加A20/TNFAIP3及MANF之表現。

【請求項123】如請求項1至122中任一項之經改造細胞，其中該細胞衍生自人類細胞或動物細胞。

【請求項124】如請求項1至123中任一項之經改造細胞，其中該細胞係衍生自幹細胞之分化細胞或其子代。

【請求項125】如請求項124之經改造細胞，其中該幹細胞選自由以下組成之群：多能幹細胞、誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)、造血幹細胞(HSC)及胚胎幹細胞(ESC)。

【請求項126】如請求項1至125中任一項之經改造細胞，其中該細胞衍生自原代細胞或其子代。

【請求項127】如請求項1至126中任一項之經改造細胞，其中該細胞在投與接受患者後逃避NK細胞介導之細胞毒性。

【請求項128】如請求項1至127中任一項之經改造細胞，其中該細胞在投與接受患者後經保護免於成熟NK細胞之細胞溶解。

【請求項129】如請求項1至128中任一項之經改造細胞，其中該細胞在投與接受患者後逃避巨噬細胞吞噬。

【請求項130】如請求項1至129中任一項之經改造細胞，其中該細胞在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之先天及/或適應性免疫反應。

【請求項131】如請求項1至130中任一項之經改造細胞，其中該細胞在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之基於抗體之免疫反應。

【請求項132】如請求項1至131中任一項之經改造細胞，其中該等修飾中之一或多者係可調控修飾。

【請求項133】一種經改造細胞，其包含一或多種可調控修飾以相對於對照改變該經改造細胞中一或多個靶之

表現，視情況地其中該一或多種可調控修飾相對於對照增加CD47之表現。

【請求項134】如請求項132或133之經改造細胞，其中該一或多種可調控修飾包含相對於對照，i)增加或ii)減少或敲除該一或多個靶之表現的基於RNA之條件或可誘導組分。

【請求項135】如請求項134之經改造細胞，其中該基於RNA之條件或可誘導組分選自由以下組成之群：條件或可誘導shRNA、條件或可誘導siRNA、條件或可誘導miRNA及條件或可誘導CRISPR干擾(CRISPRi)。

【請求項136】如請求項134或135之經改造細胞，其中該基於RNA之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【請求項137】如請求項134或135之經改造細胞，其中該基於RNA之可誘導組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【請求項138】如請求項132或133之經改造細胞，其中該等可調控修飾包含相對於對照，i)增加或ii)減少或敲除該一或多個靶之表現的基於DNA之條件或可誘導組分。

【請求項139】如請求項138之經改造細胞，其中該基於DNA之條件或可誘導組分選自由以下組成之群：條件或可誘導CRISPR、條件或可誘導TALEN、條件或可誘導鋅

指核酸酶、條件或可誘導歸巢核酸內切酶、條件或可誘導先導編輯、條件或可誘導PASTE編輯及條件或可誘導大範圍核酸酶。

【請求項140】如請求項138或139之經改造細胞，其中該基於DNA之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【請求項141】如請求項138或139之經改造細胞，其中該基於DNA之條件組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【請求項142】如請求項138或139之經改造細胞，其中該等可調控修飾包含相對於對照，i)增加或ii)減少或敲除該一或多個靶之表現的基於蛋白質之條件或可誘導組分。

【請求項143】如請求項142之經改造細胞，其中該基於蛋白質之條件或可誘導組分係條件或可誘導降解子組分。

【請求項144】如請求項143之經改造細胞，其中該條件或可誘導降解子組分選自由以下組成之群：使用SMASH標籤之配位體誘導之降解(LID)、使用Shield-1之LID、使用生長素之LID、使用雷帕黴素(rapamycin)之LID、條件或可誘導肽降解子(*例如*基於IKZF3之降解子)及條件或可誘導蛋白水解靶向嵌合體(PROTAC)。

【請求項145】如請求項142至144中任一項之經改造細胞，其中該基於蛋白質之條件組分處於選自由以下組成之群之條件啟動子之控制下：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【請求項146】如請求項142至144中任一項之經改造細胞，其中該基於蛋白質之組分處於可誘導啟動子之控制下，該可誘導啟動子由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【請求項147】如請求項142至146中任一項之經改造細胞，其中該細胞包含可操作連接至外源多核苷酸之條件啟動子，該外源多核苷酸編碼該一或多種耐受原性因子或該CD47。

【請求項148】如請求項142至146中任一項之經改造細胞，其中該細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之條件啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼該一或多種耐受原性因子或該CD47之貨物多核苷酸。

【請求項149】如請求項147或148之經改造細胞，其中該條件啟動子選自由以下組成之群：細胞週期特異性啟動子、組織特異性啟動子、譜系特異性啟動子及分化誘導之啟動子。

【請求項150】如請求項132至146中任一項之經改造細胞，其中該細胞包含可操作連接至外源多核苷酸之可誘

導啟動子，該外源多核苷酸編碼該一或多種耐受原性因子或該CD47。

【請求項151】如請求項132至146中任一項之經改造細胞，其中該細胞包含(i)包含可操作連接至轉座酶之可誘導啟動子之外源多核苷酸，及(ii)包含轉座子之外源多核苷酸，該轉座子包含編碼該一或多種耐受原性因子或該CD47之貨物多核苷酸。

【請求項152】如請求項150或151之經改造細胞，其中該可誘導啟動子係由小分子、配位體、生物劑、適配體介導之多腺苷酸化調節劑或適配體調控之核糖開關調控。

【請求項153】如請求項1至45或99至152中任一項之經改造細胞，其中該細胞包含與SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或100%序列一致性之CD47多肽。

【請求項154】如請求項1至45或99至152中任一項之經改造細胞，其中該細胞包含與SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或100%序列一致性之CD47多肽。

【請求項155】如請求項132至154中任一項之經改造細胞，其中該細胞進一步包含可調控修飾，其相對於對照增加以下中之一或多者之表現：A20/TNFAIP3、C1抑制劑、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受體、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、

HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1及/或Serpinb9。

【請求項156】如請求項155之經改造細胞，其中相對於對照，該細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之A20/TNFAIP3、C1抑制劑、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受體、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1及/或Serpinb9。

【請求項157】如請求項155或156之經改造細胞，其中相對於對照，該細胞表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之A20/TNFAIP3、C1抑制劑、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受體、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1及/或Serpinb9。

【請求項158】如請求項155至157中任一項之經改造細胞，其中相對於對照，該細胞表現至少高約1000%之量之A20/TNFAIP3、C1抑制劑、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受體、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、

DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鏈、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1及/或Serpinb9。

【請求項159】如請求項155至158中任一項之經改造細胞，其中該對照係野生型細胞、對照細胞或基線參考。

【請求項160】如請求項159之經改造細胞，其中該對照細胞係未經修飾或未經改變之細胞，視情況地其中該未經修飾或未經改變之細胞具有與該經改造細胞相同之細胞類型。

【請求項161】如請求項159或160之經改造細胞，其中該對照細胞係來自供體之起始材料或來自供體集合之起始細胞集合。

【請求項162】如請求項159之經改造細胞，其中該基線參考係同型對照或背景信號水準。

【請求項163】如請求項1至162中任一項之經改造細胞，其中該一或多種耐受原性因子或該CD47由第一外源多核苷酸編碼。

【請求項164】如請求項1至163中任一項之經改造細胞，其中該細胞包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之第二外源多核苷酸。

【請求項165】如請求項163或164之經改造細胞，其中該第一外源多核苷酸及/或該第二外源多核苷酸插入該細胞之至少一個對偶基因之第一及/或第二特定基因座中。

【請求項166】如請求項165之經改造細胞，其中該第一特定基因座及/或該第二特定基因座選自由以下組成之群：安全港基因座、靶基因座、*RHD*基因座、*B2M*基因座、*CIITA*基因座、*TRAC*基因座及*TRB*基因座。

【請求項167】如請求項166之經改造細胞，其中該安全港基因座選自由以下組成之群：*CCR5*基因座、*PPP1R12C*基因座、*Rosa*基因座、*ROSA26*基因座及*CLYBL*基因座。

【請求項168】如請求項166之經改造細胞，其中該靶基因座選自由以下組成之群：*CXCR4*基因座、*ALB*基因座、*SHS231*基因座、*F3* (*CD142*)基因座、*MICA*基因座、*MICB*基因座、*LRP1* (*CD91*)基因座、*HMGB1*基因座、*ABO*基因座、*FUT1*基因座及*KDM5D*基因座。

【請求項169】如請求項163至168中任一項之經改造細胞，其中使用慢病毒載體將該第一外源多核苷酸及/或該第二外源多核苷酸引入該細胞中。

【請求項170】如請求項163至169中任一項之經改造細胞，其中使用選自由以下組成之群之促融劑介導之遞送或轉座酶系統將該第一外源多核苷酸及/或該第二外源多核苷酸引入該細胞中：條件或可誘導轉座酶、條件或可誘導PiggyBac轉座子、條件或可誘導睡美人(SB11)轉座子、條件或可誘導Mos1轉座子及條件或可誘導Tol2轉座子。

【請求項171】一種胰島細胞，其具有減少的MHC I類HLA表現及/或減少的MHC II類HLA表現且相對於對照

表現至少高約1000%之量之CD47。

【請求項172】如請求項171之細胞，其中該細胞係原代β胰島細胞，其表現對照中表現之CD47水準的至少約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍。

【請求項173】一種經改造細胞，其相對於對照表現至少高約10%之量之CD47，或其表現對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍。

【請求項174】一種經改造細胞，其相對於對照表現至少高約10%之量之CD47，或其表現對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍。

【請求項175】如請求項173或174之經改造細胞，其中相對於該對照，該細胞表現至少高約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%、約200%、約300%、約400%、約500%、約600%、約700%、約800%、約900%或約1000%之量之CD47。

【請求項176】如請求項173至175中任一項之經改造細胞，其中該細胞表現該對照中表現之CD47水準的至少約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍或約5倍。

【請求項177】如請求項173至176中任一項之經改造細胞，其中該細胞係原代胰島細胞，其相對於對照表現至少高約1000%或至少高約2000%之量之CD47。

【請求項178】如請求項171至177中任一項之經改造細胞，其中該對照係野生型細胞、對照細胞或基線參考。

【請求項179】如請求項178之經改造細胞，其中該對

照細胞係未經修飾或未經改變之細胞，視情況地其中該未經修飾或未經改變之細胞具有與該經改造細胞相同之細胞類型。

【請求項180】如請求項178或179之經改造細胞，其中該對照細胞係來自供體之起始材料或來自供體集合之起始細胞集合。

【請求項181】如請求項178之經改造細胞，其中該基線參考係同型對照或背景信號水準。

【請求項182】如請求項171至181中任一項之經改造細胞，其中該CD47水準係使用基於抗體之量化方法、視情況選用之Quantibrite™分析來測定。

【請求項183】一種經改造T細胞，其具有減少的MHC I類HLA表現及/或減少的MHC II類HLA表現且相對於對照表現至少高約10%之量之CD47，表現對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍，或表現至少約170,000個CD47分子。

【請求項184】如請求項221之經改造細胞，其中該細胞係T細胞，其相對於對照表現至少高約300%或至少高約400%之量之CD47。

【請求項185】如請求項183之經改造細胞，其中該細胞係T細胞，其表現該對照中表現之CD47水準的至少約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍或約5倍。

【請求項186】一種經改造T細胞，其表現至少約170,000個CD47分子。

【請求項187】如請求項186之經改造T細胞，其中該T

細胞表現至少約180,000個CD47分子、至少約190,000個CD47分子、至少約200,000個CD47分子、至少約210,000個CD47分子、至少約220,000個CD47分子、至少約230,000個CD47分子、至少約240,000個CD47分子、至少約250,000個CD47分子、至少約260,000個CD47分子、至少約270,000個CD47分子、至少約280,000個CD47分子、至少約290,000個CD47分子、或至少約300,000個CD47分子。

【請求項188】如請求項183至187中任一項之經改造細胞，其中該對照係野生型細胞、對照細胞或基線參考。

【請求項189】如請求項188之經改造細胞，其中該對照細胞係未經修飾或未經改變之細胞，視情況地其中該未經修飾或未經改變之細胞具有與該經改造細胞相同之細胞類型。

【請求項190】如請求項188或189之經改造細胞，其中該對照細胞係來自供體之起始材料或來自供體集合之起始細胞集合。

【請求項191】如請求項190之經改造細胞，其中該基線參考係同型對照或背景信號水準。

【請求項192】如請求項183至191中任一項之經改造細胞，其中該CD47水準係使用基於抗體之量化方法、視情況選用之Quantibrite™分析來測定。

【請求項193】如請求項1至192中任一項之經改造細胞，其中該細胞包含1個、2個、3個、4個或5個拷貝之編

碼CD47之外源多核苷酸。

【請求項194】如請求項193之經改造細胞，其中該細胞包含可操作連接至編碼CD47之外源多核苷酸之組成型啟動子。

【請求項195】如請求項1至194中任一項之經改造細胞，其中編碼CD47之外源多核苷酸係經由病毒介導之整合遞送至該細胞。

【請求項196】如請求項195之經改造細胞，其中該病毒介導之整合係慢病毒介導之整合。

【請求項197】如請求項1至196中任一項之經改造細胞，其中編碼CD47之外源多核苷酸經由HDR整合至該細胞基因體之位點。

【請求項198】如請求項197之經改造細胞，其中該編碼CD47之外源多核苷酸整合至TRAC基因之基因座、TRBC基因之基因座或其組合中。

【請求項199】如請求項198之T細胞，其中該編碼CD47之外源多核苷酸整合至至少一個TRAC對偶基因、至少一個TRBC對偶基因或其組合中。

【請求項200】如請求項198或199之T細胞，其中該編碼CD47之外源多核苷酸整合至至少兩個TRAC對偶基因、至少兩個TRBC對偶基因或其組合中。

【請求項201】如請求項1至200中任一項之細胞，其中該細胞包含含有CD47多肽之外源多核苷酸，該CD47多肽與SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少約80%之序列

一致性、與該SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少約85%之序列一致性、與該SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少約90%之序列一致性、與該SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少約95%之序列一致性、與該SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少約98%之序列一致性、與該SEQ ID NO:129之胺基酸序列具有至少約99%之序列一致性，或具有該SEQ ID NO:129之胺基酸序列。

【請求項202】如請求項1至200中任一項之細胞，其中該細胞包含含有CD47多肽之外源多核苷酸，該CD47多肽與SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少約80%之序列一致性、與該SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少約85%之序列一致性、與該SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少約90%之序列一致性、與該SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少約95%之序列一致性、與該SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少約98%之序列一致性、與該SEQ ID NO:130之胺基酸序列具有至少約99%之序列一致性，或具有該SEQ ID NO:130之胺基酸序列。

【請求項203】如請求項171至202中任一項之細胞，其中該細胞包含相對於對照減少的一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現。

【請求項204】如請求項203之細胞，其中該一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之該減少的表現係由編碼該MHC I類及/或II類HLA之一或多種基因之組成型修飾引起。

【請求項205】如請求項204或205中任一項之細胞，其中該細胞包含選自由MHC I類及MHC II類HLA組成之群之靶之一或多個敲除。

【請求項206】如請求項205之細胞，其中該一或多個敲除係組成型敲除。

【請求項207】如請求項204至206中任一項之細胞，其中該細胞包含相對於該對照減少的一或多個選自由B2M及CIITA組成之群之靶之表現。

【請求項208】如請求項207之細胞，其中該減少的B2M及/或CIITA表現係由該B2M基因及/或該CIITA基因之組成型修飾引起。

【請求項209】如請求項204至208中任一項之細胞，其中該細胞包含選自由B2M及CIITA組成之群之靶之一或多個敲除。

【請求項210】如請求項209之細胞，其中該細胞包含B2M之兩個對偶基因及/或CIITA之兩個對偶基因的敲除。

【請求項211】如請求項209或210之細胞，其中該一或多個敲除係組成型敲除。

【請求項212】如請求項204至211中任一項之細胞，其中該細胞進一步包含編碼一或多種其他耐受原性因子之外源多核苷酸。

【請求項213】如請求項212之細胞，其中該一或多種其他耐受原性因子選自由以下組成之群：HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、PD-L1、CTLA-4-Ig、CI抑制劑及IL-35。

【請求項214】如請求項204至213中任一項之細胞，其中相對於該對照，該細胞包含減少的B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD表現。

【請求項215】如請求項214之細胞，其中該細胞並不表現B2M、CIITA、NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、MIC-A/B、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y及/或RHD。

【請求項216】如請求項204至215中任一項之細胞，其中該細胞係多能幹細胞。

【請求項217】如請求項216之細胞，其中該多能幹細胞係誘導性多能幹細胞(iPSC)、間質幹細胞(MSC)、造血幹細胞(HSC)或胚胎幹細胞(ESC)。

【請求項218】如請求項204至217中任一項之細胞，其中該細胞係衍生自多能幹細胞之分化細胞或其子代。

【請求項219】如請求項218之細胞，其中該分化細胞選自由以下組成之群：胰島細胞、T細胞、自然殺手(NK)細胞、CAR-M細胞、內皮細胞、心肌細胞、平滑肌細胞、骨骼肌細胞、肝細胞、神經膠質祖細胞、多巴胺能神經元、視網膜色素上皮細胞及甲狀腺細胞。

【請求項220】如請求項204至219中任一項之細胞，其中該細胞係原代細胞或其子代。

【請求項221】如請求項220之細胞，其中該原代細胞或其子代係T細胞或NK細胞。

【請求項222】如請求項219或221中任一項之細胞，其中該T細胞進一步包含減少的T細胞受體(TCR)-α及/或TCR-β表現。

【請求項223】如請求項222之細胞，其中該T細胞並不表現TCR-α及/或TCR-β。

【請求項224】如請求項219或221至223中任一項之細胞，其中該T細胞進一步包含編碼一或多種嵌合抗原受體(CAR)之第二外源多核苷酸。

【請求項225】如請求項204至224中任一項之細胞，其中相對於對照，該細胞表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47表現，及相對於對照減少的MHC I類及MHC II類人類白血球抗原中之一或多者之表現。

【請求項226】如請求項204至225中任一項之細胞，其中該細胞表現不具或具有低CD47表現之野生型細胞或對照細胞中表現之CD47水準的至少約2倍、約3倍、約4倍或約5倍，及相對於該對照細胞減少的MHC I類及MHC II類人類白血球抗原中之一或多者之表現。

【請求項227】如請求項226之細胞，其中該細胞表現不具或具有低CD47表現之相同細胞類型之野生型細胞或對照細胞中表現之CD47水準的至少約3倍、約4倍或約5倍。

【請求項228】如請求項225至227中任一項之細胞，

其中該對照細胞係胰島細胞、T細胞、自然殺手(NK)細胞、CAR-M細胞、內皮細胞、心肌細胞、平滑肌細胞、骨骼肌細胞、肝細胞、神經膠質祖細胞、多巴胺能神經元、視網膜色素上皮細胞或甲狀腺細胞。

【請求項229】如請求項219至228中任一項之細胞，其中該分化細胞或其子代、或該原代免疫細胞或其子代在投與接受患者後逃避NK細胞介導之細胞毒性，在投與接受患者後經保護免於成熟NK細胞之細胞溶解，在投與接受患者後逃避巨噬細胞吞噬，在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之先天及/或適應性免疫反應，及/或在投與接受患者後不會誘導針對該細胞之基於抗體之免疫反應。

【請求項230】如請求項1至229中任一項之經改造細胞，其中該細胞係自體細胞。

【請求項231】如請求項1至229中任一項之經改造細胞，其中該細胞係同種異體細胞。

【請求項232】一種醫藥組合物，其包含如請求項1至231中任一項之經改造細胞之群體及醫藥學上可接受之添加劑、載劑、稀釋劑或賦形劑。

【請求項233】如請求項232之醫藥組合物，其中該經改造細胞係β胰島細胞且該醫藥組合物之群體進一步包含一或多種額外胰島細胞。

【請求項234】一種治療將受益於基於細胞之療法之患有疾病或疾患之患者的方法，其包括向該患者投與臨床有效量或治療有效量之如請求項1至231中任一項之經改造

細胞。

【請求項235】一種治療將受益於基於細胞之療法之患有疾病或疾患之患者的方法，其包括向該患者投與包含如請求項1至231中任一項之經改造細胞之細胞群體。

【請求項236】一種治療將受益於基於細胞之療法之患有疾病或疾患之患者的方法，其包括向該患者投與包含如請求項1至231中任一項之分化細胞之細胞群體。

【請求項237】一種治療將受益於基於細胞之療法之患有疾病或疾患之患者的方法，其包括向該患者投與如請求項302或303之醫藥組合物。

【請求項238】如請求項234至237之方法，其中該疾病或疾患選自由以下組成之群：癌症、遺傳病症、慢性傳染病、自體免疫病症、神經病症、心臟病症(選自由以下組成之群：兒童心肌病、年齡相關之心肌病、擴張性心肌病、肥厚性心肌病、限制性心肌病、慢性缺血性心肌病、圍產期心肌病、發炎性心肌病、特發性心肌病、其他心肌病、心肌缺血性再灌注損傷、心室功能障礙、心臟衰竭、充血性心臟衰竭、冠狀動脈疾病、終末期心臟病、動脈粥樣硬化、缺血、高血壓、再狹窄、心絞痛、風濕性心臟病、動脈發炎、心血管疾病、心肌梗塞、心肌缺血、心肌梗塞、心臟缺血、心臟損傷、心肌缺血、血管疾病、獲得性心臟病、先天性心臟病、冠狀動脈疾病、傳導系統功能障礙、冠狀動脈功能障礙、肺部高血壓、心律不整、肌肉萎縮症、肌肉質量異常、肌肉變性、心肌炎、感染性心肌

炎、藥物或毒素誘發之肌肉異常、過敏性心肌炎、二尖瓣閉鎖不全、自體免疫性心內膜炎、原發性心律不整疾病、心臟通道病、長QT症候群、短QT症候群、布魯格達氏症候群(Brugada syndrome)、兒茶酚胺能多型性心室性心搏過速、傑維爾及朗格-尼爾森症候群(Jervell and Lange-Nielsen syndrome)、心肌梗塞、心臟衰竭、心肌病、先天性心臟缺陷、心臟瓣膜疾病或功能障礙、心內膜炎、風濕熱、二尖瓣瓣膜脫垂、感染性心內膜炎、肥厚性心肌病、擴張性心肌病、心肌炎、心肥大、二尖瓣閉鎖不全)、神經病症(選自由以下組成之群：阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)、亨廷頓氏病(Huntington's disease)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、佩梅病(Pelizaeus-Merzbacher disease)、其他神經變性疾病或疾患、注意力缺陷過動症(ADHD)、缺血、多發性硬化、創傷性腦損傷、癲癇、僵住症、腦炎、腦膜炎、偏頭痛、中風、短暫性缺血發作、蛛膜下出血、硬腦膜下出血、血腫、硬膜外出血、脊髓損傷、頸椎病、腕隧道症候群、腦或脊髓腫瘤、外周神經病變、格林-巴利症候群(Guillan-Barre syndrome)、神經痛、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)、tau蛋白病變、匹克病(Pick disease)、進行性核上性麻痺、皮質基底核變性、嗜銀顆粒病、伯爾氏麻痺(Bell's palsy)、大腦性麻痺、運動神經元疾病、神經纖維瘤病、腦炎、腦膜炎、妥瑞氏症候群(Tourette's syndrome)、精神分裂症、精神病、抑鬱症及其他神經精神病症)、血管型失智症、阿茲海默氏病、

帕金森氏病、亨廷頓氏病、多發性硬化、其他神經變性疾病或疾患、注意力缺陷過動症(ADHD)、妥瑞氏症候群(TS)、精神分裂症、精神病、抑鬱症、其他神經精神病症、HIV-1相關之神經認知病症、創傷性腦損傷、中風、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)、大腦出血、癲癇發作、脊髓損傷、嗜銀顆粒病(AGD)、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)、皮質基底核變性(CBD)、與染色體17相關之帕金森氏症(FTDP-17)、多系統萎縮症(MSA)、帕金森氏病/瀰漫性路易體病(diffuse Lewy body disease)(PD/DLBD)或阿茲海默氏病、動脈粥樣硬化、動脈粥樣化形成、動脈血栓形成、靜脈血栓形成、血小板性微血管病、血管滲漏、瀰漫性血管內凝血、糖尿病、胰島素抗性、心血管疾病、血管疾病、外周血管疾病、缺血性疾病、心肌梗塞、充血性心臟衰竭、外周血管阻塞性疾病、中風、再灌注損傷、肢體缺血、神經病變(*例如*外周神經病變或糖尿病性神經病變)、器官衰竭(*例如*肝衰竭、腎衰竭及諸如此類)、糖尿病、類風濕性關節炎、骨質疏鬆症、血管損傷、組織損傷、高血壓、因冠狀動脈疾病所致之心絞痛及心肌梗塞、腎血管性高血壓、因腎動脈狹窄所致之腎衰竭、下肢跛行、短暫性缺血發作或中風、心肌梗塞及肢體缺血、缺血性組織修復、血管及心臟瓣膜形成、人工血管改造、受損血管修復及誘導經改造組織中之血管形成(*例如*在移植之前)、修復或替代需要血管細胞或血管形成之組織，尤其心臟組織、肝組織、胰臟組織、腎組

織、肌肉組織、神經組織、骨組織，其可為受損的且特徵在於過量細胞死亡之組織、具有受損風險之組織或人工改造之組織)、冠狀動脈疾病、腦血管疾病、主動脈狹窄、主動脈瘤、外周動脈疾病、動脈粥樣硬化、靜脈曲張、血管病、缺乏冠狀動脈灌注之心臟梗塞區域、傷口不愈合、糖尿病性或非糖尿病性潰瘍或其中需要誘導血管形成、從而改良用於血管重建手術之假體植入物(*例如*由諸如Dacron及Gortex之合成材料製得之血管)的任何其他疾病或病症，選自由以下組成之群之血管病症：血管損傷、心血管疾病、血管疾病、外周血管疾病、缺血性疾病、心肌梗塞、充血性心臟衰竭、外周血管阻塞性疾病、高血壓、缺血性組織損傷、再灌注損傷、肢體缺血、中風、神經病變(*例如*外周神經病變或糖尿病性神經病變)、器官衰竭(*例如*肝衰竭、腎衰竭及諸如此類)、糖尿病、類風濕性關節炎、骨質疏鬆症、腦血管疾病、高血壓、因冠狀動脈疾病所致之心絞痛及心肌梗塞、腎血管性高血壓、因腎動脈狹窄所致之腎衰竭、下肢跛行、其他血管疾患或疾病，自體免疫性甲狀腺炎、甲狀腺腫、副甲狀腺高能症、副甲狀腺低能症(先天性或自體免疫性)、甲狀腺炎、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、產後甲狀腺炎、亞急性甲狀腺炎、醫源性甲狀腺低能症、格雷氏病(Grave's disease)及甲狀腺眼病、傳染性肝炎(A型、B型及C型)、自體免疫肝炎、原發性膽汁性膽管炎、原發性硬化性膽管炎、非酒精性脂肪肝病、肝硬化、血色素沈著症、高草酸鹽尿症、

α-1抗胰蛋白酶缺乏症、肝衰竭、威爾森氏病(Wilson's disease)、肝性腦病、黃疸、急性肝性卟啉症、阿拉吉歐症候群(Alagille syndrome)、膽道閉鎖、佈-加二氏症候群(Budd-Chiari syndrome)、高膽紅素血症、克-納二氏症候群(Crigler-Najjar syndrome)、吉-梅二氏症候群(Gilbert-Meulengracht syndrome)、杜-強二氏症候群(Dubin-Johnson syndrome)、羅托症候群(Rotor syndrome)、半乳糖血症、1型肝糖儲積症、肝腎症候群、妊娠期肝內膽汁淤積症、進行性家族性肝內膽汁淤積症、雷氏症候群(Reye's syndrome)、溶酶體酸性脂肪酶缺乏症、酒精相關之胰臟炎、膽石性胰臟炎、糖尿病(1型及2型)、糖尿病前期、妊娠性糖尿病、胰臟外分泌性糖尿病、胰臟外分泌不足、急性胰臟炎、慢性胰臟炎、遺傳性胰臟炎、高胰島素血症、胰囊腫、左-艾二氏症候群(Zollinger-Ellison syndrome)、舒-戴二氏症候群(Shwachman-Diamond syndrome)、遺傳性血色素沈著症、地中海性貧血、胰臟鐵沈積、囊性纖維化、胰臟分裂及胰臟切除、黃斑變性或具有受損RPE細胞之患者、年齡相關之黃斑變性(AMD)、早期AMD、中期AMD、晚期AMD、非新生血管性年齡相關之黃斑變性、乾式黃斑變性(乾式年齡相關之黃斑變性)、濕式黃斑變性(濕式年齡相關之黃斑變性)、成人發作型卵黃囊狀黃斑失養症(AVMD)、百斯特卵黃囊狀黃斑失養症(Best vitelliform macular dystrophy)、斯達加特樣黃斑失養症(Stargardt-like macular dystrophy，STGD3)、索斯比眼底

失養症(Sorby's fundus dystrophy，SFD)、ABCA4相關之疾病、IB型厄捨病(Senear-Usher)、常染色體隱性卵黃樣變、常染色體顯性玻璃體視網膜脈絡膜病變、幼年型黃斑變性(JMD)、萊伯氏先天性黑矇症(Leber's Congenital Amaurosis)或色素性視網膜炎、視網膜脫落、視網膜撕裂、重度合併免疫缺乏(SCID)、歐門氏症候群(Omenn syndrome)、軟骨-毛髮發育不全、網狀組織發育不良、偉-爾二氏症候群(Wiskott-Aldrich syndrome)、毛細血管擴張性共濟失調、迪喬治症候群(DiGeorge syndrome)、免疫性骨發育不良、先天性角化不良、慢性黏膜皮膚念珠菌病、血液惡性病、濾泡性淋巴瘤(FL)、骨髓性贅瘤、成熟T/NK贅瘤、組織細胞贅瘤、多發性骨髓瘤(MM)、骨髓發育不良症候群(MDS)、淋巴漿細胞性淋巴瘤(LPL)、瓦登斯特隆巨球蛋白血症(Waldenström macroglobulinemia)、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt lymphoma，BL)、原發性縱膈大B細胞淋巴瘤(PMBL)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、外套細胞淋巴瘤(MCL)、毛細胞白血病(HCL)、骨髓增生性/骨髓發育不良症候群(MDS)、急性淋巴性白血病(ALL)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、B細胞急性淋巴性白血病(B-ALL)、T細胞急性淋巴性白血病(T-ALL)、T細胞淋巴瘤、B細胞淋巴瘤、自體免疫疾病，包括例如狼瘡、全身性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎、牛皮癬、牛皮癬關節炎、多發性硬化、克隆氏病

(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、艾迪生病(Addison's disease)、格雷氏病、休格倫氏症候群(Sjögren's syndrome)、橋本氏甲狀腺炎、1型糖尿病、原發性膽汁性肝硬化、自體免疫肝炎、乳糜瀉、癌症，包括(但不限於)B細胞急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤、肝癌、胰臟癌、乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、急性骨髓性淋巴性白血病、多發性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰臟腺癌、神經膠母細胞瘤、神經母細胞瘤、肺鱗狀細胞癌、肝細胞癌、膀胱癌、全身性紅斑狼瘡(SLE)、1型糖尿病、自體免疫肝病、休格倫氏症候群、類風濕性關節炎、全身性硬化(硬皮症)、器官特異性自體免疫疾病(自體免疫肝炎、原發性硬化性膽管炎)、酒精相關之肝病、多發性硬化、NK細胞缺乏(NKD) (功能性(FNKD)或經典(CNKD))、免疫缺乏-多內分泌病-腸病-X連鎖(IPEX)樣症候群、布魯姆症候群(Bloom syndrome)、范康尼氏貧血(Fanconi's anemia)、先天性角化不良、闕東二氏症候群(Chediak-Higashi syndrome)、家族性嗜血細胞性淋巴組織細胞增多症(FHL)、2型格里切利症候群(Griscelli syndrome type 2)、赫普二氏症候群(Hermansky Pudliak syndrome)、帕-雷二氏症候群(Papillon-Lefevre syndrome)、偉-爾二氏症候群(Wiskott-Aldrich syndrome)、常染色體隱性高IgE症候群、梅-黑二氏異常(May Hegglin anomaly)及I型或III型白血球黏附缺乏症。

【請求項239】如請求項234至238之方法，其中該分

化細胞選自由以下組成之群：間質幹細胞(MSC)、造血幹細胞(HSC)、胰島細胞、β胰島細胞、免疫細胞、B細胞、T細胞、自然殺手(NK)細胞、自然殺手T (NKT)細胞、巨噬細胞、免疫特權細胞、視覺細胞、視網膜色素上皮細胞(RPE)、肝細胞、甲狀腺細胞、內皮細胞、皮膚細胞、神經膠質祖細胞、神經細胞、肌肉細胞、心臟細胞及血球。

【請求項240】如請求項234至239中任一項之方法，其中免疫阻抑及/或免疫調節劑並未在投與該細胞群體之前投與該患者。

【請求項241】如請求項234至240中任一項之方法，其進一步包括向該患者投與一或多種免疫阻抑劑。

【請求項242】如請求項234至241中任一項之方法，其中已向該患者投與一或多種免疫阻抑劑。

【請求項243】如請求項241或242之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑係小分子或抗體。

【請求項244】如請求項241至243中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑選自由以下組成之群：環孢素、硫唑嘌呤、黴酚酸、麥考酚酸嗎乙酯、皮質類固醇、普賴鬆(prednisone)、胺甲喋呤(methotrexate)、金鹽、柳氮磺吡啶(sulfasalazine)、抗瘧疾藥、佈喹那(brequinar)、來氟米特(leflunomide)、咪唑立賓(mizoribine)、15-去氧精胍菌素(15-deoxyspergualine)、6-巰基嘌呤、環磷醯胺、雷帕黴素、他克莫司(tacrolimus，FK-506)、OKT3、抗胸腺細胞球蛋白、胸腺噴丁(thymopentin，胸腺素-α)及

免疫阻抑抗體。

【請求項245】如請求項241至244中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑包含環孢素。

【請求項246】如請求項241至245中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑包含麥考酚酸嗎乙酯。

【請求項247】如請求項241至246中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑包含皮質類固醇。

【請求項248】如請求項241至247中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑包含環磷醯胺。

【請求項249】如請求項241至248中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑包含雷帕黴素。

【請求項250】如請求項241至249中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑包含他克莫司(FK-506)。

【請求項251】如請求項241至250中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑包含抗胸腺細胞球蛋白。

【請求項252】如請求項241至251中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑係一或多種免疫調節劑。

【請求項253】如請求項252之方法，其中該一或多種免疫調節劑係小分子或抗體。

【請求項254】如請求項243或253之方法，其中該抗體結合至選自由以下組成之群之受體或配位體中之一或多者：IL-2受體之p75、MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD28、B7、CD40、CD45、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6R、IL-6、IGF、IGFR1、IL-7、IL-8、IL-10、

CD11a、CD58及結合至其配位體中之任一者之抗體。

【請求項255】如請求項241至254中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑係或已在投與該等經改造細胞之前投與該患者。

【請求項256】如請求項241至255中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑係或已在投與該等經改造細胞之前至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天投與該患者。

【請求項257】如請求項241至256中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑係或已在投與該等經改造細胞之前至少1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間投與該患者。

【請求項258】如請求項241至257中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑係或已在投與該等經改造細胞之後至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天投與該患者。

【請求項259】如請求項241至258中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑係或已在投與該等經改造細胞之後至少1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間投與該患者。

【請求項260】如請求項241至259中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑係或已在與第一次投與該等經改造細胞同一天投與該患者。

【請求項261】如請求項241至260中任一項之方法，

其中該一或多種免疫阻抑劑係或已在投與該等經改造細胞之後投與該患者。

【請求項262】如請求項241至261中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑係或已在投與該等經改造細胞之第一次及/或第二次投與之後投與該患者。

【請求項263】如請求項241至262中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑係或已在投與該等經改造細胞之第一次及/或第二次投與之前投與該患者。

【請求項264】如請求項241至263中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑係或已在投與該等經改造細胞之第一次及/或第二次投與之前至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天投與該患者。

【請求項265】如請求項241至264中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑係或已在投與該等經改造細胞之第一次及/或第二次投與之前至少1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間投與該患者。

【請求項266】如請求項241至265中任一項之方法，其中該一或多種免疫阻抑劑係或已在投與該等經改造細胞之第一次及/或第二次投與之後至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天投與該患者。

【請求項267】如請求項241至266中任一項之方法，

其中該一或多種免疫阻抑劑係或已在投與該等經改造細胞之第一次及/或第二次投與之後至少1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間投與該患者。

【請求項268】如請求項241至267中任一項之方法，其中與經投與以減少不包含該等經改造細胞之該等修飾之免疫原性細胞之免疫排斥的一或多種免疫阻抑劑之劑量相比，該一或多種免疫阻抑劑係以較低劑量投與。

【請求項269】一種如請求項1至231中任一項之經改造細胞之群體的用途，其用於治療將受益於基於細胞之療法之接受患者之病症或疾患。

【請求項270】一種產生如請求項1至231中任一項之經改造細胞或包含如請求項1至231中任一項之經改造細胞之細胞群體的方法，該方法包括

a. 獲得經分離細胞；及

b. 使該經分離細胞與一或多種試劑及/或組分接觸以修飾該經分離細胞中之基因表現，由此產生該經改造細胞或包含該經改造細胞之該細胞群體。

【請求項271】如請求項270之方法，其中該方法進一步包括測定該等經改造細胞或該細胞群體之CD47表現水準。

【請求項272】如請求項270或271之方法，其中該方法進一步包括，若確定該經改造細胞或該細胞群體以臨限值水準或更高水準表現CD47，則選擇該經改造細胞或該

細胞群體用於生產治療產品。

【請求項273】如請求項270至272中任一項之方法，其中相對於該對照，該經改造細胞或該細胞群體表現至少約相同量之CD47。

【請求項274】如請求項270至273中任一項之方法，其中相對於該對照，該經改造細胞或該細胞群體表現至少高約10%之量之CD47。

【請求項275】如請求項270至274中任一項之方法，其中相對於該對照，該經改造細胞或該細胞群體表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之量之CD47。

【請求項276】如請求項270至275中任一項之方法，其中相對於該對照，該經改造細胞或該細胞群體表現至少高約100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%或900%之量之CD47。

【請求項277】如請求項270至276中任一項之方法，其中相對於該對照，該經改造細胞或該細胞群體表現至少高約1000%之量之CD47。

【請求項278】如請求項270至277中任一項之方法，其中該經改造細胞或該細胞群體表現該對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍。

【請求項279】如請求項270至273及278中任一項之方法，其中該經改造細胞或該細胞群體表現該對照中表現之CD47水準的至少約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍或約5

倍。

【請求項280】如請求項270至273、278及279中任一項之方法，其中該經改造細胞或該細胞群體表現該對照中表現之CD47水準的至少約4倍、約4.5倍、約5倍或約5.5倍。

【請求項281】如請求項270至273及278至280中任一項之方法，其中該經改造細胞或該細胞群體表現該對照中表現之CD47水準的至少約4倍。

【請求項282】如請求項270至273及278至281中任一項之方法，其中該經改造細胞或該細胞群體表現該對照中表現之CD47水準的至少約4.5倍。

【請求項283】如請求項270至273及278至282中任一項之方法，其中該經改造細胞或該細胞群體表現該對照中表現之CD47水準的至少約5倍。

【請求項284】如請求項270至273及278至283中任一項之方法，其中該經改造細胞或該細胞群體表現該對照中表現之CD47水準的至少約5.5倍。

【請求項285】如請求項270至273及278至284中任一項之方法，其中該經改造細胞或該細胞群體表現該對照中表現之CD47水準的至少約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍。

【請求項286】如請求項270至285中任一項之方法，其中該對照係野生型細胞或野生型細胞群體、對照細胞或對照細胞群體、或基線參考。

【請求項287】如請求項286之方法，其中該對照細胞或該對照細胞群體包含未經修飾或未經改變之細胞，視情況地其中該未經修飾或未經改變之細胞具有與該經改造細胞相同之細胞類型。

【請求項288】如請求項286或287之方法，其中該對照細胞或該對照細胞群體係來自供體之起始材料或來自供體集合之起始細胞集合。

【請求項289】如請求項286之方法，其中該基線參考係同型對照或背景信號水準。

【請求項290】如請求項270至289中任一項之方法，其中該經改造細胞係β胰島細胞且該細胞群體包含β胰島細胞及其他胰島細胞。

【請求項291】如請求項270至289中任一項之方法，其中該經改造細胞包含相對於對照改變該經改造細胞中一或多個靶之表現的可調控修飾。

【請求項292】如請求項291之方法，其中相對於野生型細胞、野生型細胞群體、對照細胞或對照細胞群體，該等可調控修飾減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現。

【請求項293】如請求項291或292之方法，其中相對於野生型細胞、野生型細胞群體、對照細胞或對照細胞群體，該等可調控修飾增加一或多種耐受原性因子之表現。

【請求項294】如請求項293至294中任一項之方法，其中修飾該經分離細胞中之基因表現之該一或多種試劑包

含i)用於改變該一或多個靶之表現的基於RNA之條件或可誘導組分，ii)用於改變該一或多個靶之表現的基於DNA之條件或可誘導組分，或iii)用於改變該一或多個靶之表現的基於蛋白質之條件或可誘導組分。

【請求項295】如請求項294之方法，其中該方法進一步包括使該經分離細胞與外源因子接觸或將該經分離細胞暴露於活化該條件或可誘導啟動子之條件，由此表現該一或多個靶，由此產生該經改造細胞。

【請求項296】一種產生經改造細胞之方法，該經改造細胞包含相對於對照，i)減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現，及ii)增加一或多種耐受原性因子之表現的可調控修飾，該方法包括：

(a) 獲得經分離細胞；

(b) 將以下引入該細胞中：用於該等MHC I類及/或MHC II類人類白血球分子之可調控減少的表現之基於RNA之條件或可誘導組分、用於該等MHC I類及/或MHC II類人類白血球分子之可調控減少的表現之基於DNA之條件或可誘導組分、或用於該等MHC I類及/或MHC II類人類白血球分子之可調控減少的表現之基於蛋白質之條件或可誘導組分；

(c) 將該細胞暴露於活化該條件或可誘導組分之條件或外源因子，由此減少該等MHC I類及/或MHC類分子之表現；

(d) 將包含條件或可誘導啟動子之核酸引入該經分離

細胞中，該條件或可誘導啟動子可操作連接至編碼該一或多種耐受原性因子之外源多核苷酸，用於該一或多種耐受原性因子之可調控的增加的表現；及

(e) 將該經改造細胞暴露於活化該條件或可誘導啟動子之條件或外源因子，由此表現該一或多種外源耐受原性因子，且由此產生該經改造細胞。

【請求項297】如請求項296之方法，其中步驟(a)-(d)係以任一順序實施。

【請求項298】如請求項296之方法，其中步驟(a)-(d)中之一或多者係同時實施。

【請求項299】如請求項296之方法，其中步驟(b)及(c)係在步驟(d)及(e)之前實施。

【請求項300】如請求項296之方法，其中步驟(d)及(e)係在步驟(b)及(c)之前實施。

【請求項301】如請求項296之方法，其中步驟(c)及(e)係依序實施。

【請求項302】如請求項296之方法，其中步驟(c)及(e)係同時實施。

【請求項303】一種鑑別適於用作治療產品之細胞群體或包含如請求項1至231中任一項之經改造細胞之細胞群體的方法，該方法包括：

(a) 獲得經分離細胞；

(b) 將相對於對照減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現之一或多種修飾引入該等細胞中；

(c) 將相對於對照增加CD47之表現之一或多種修飾引入該等細胞中；

(d) 量測該等細胞之CD47表現水準；及

(e) 選擇相對於該對照表現至少高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47之細胞群體，且將該群體鑑別為適於用作治療產品。

【請求項304】一種鑑別適於用作治療產品之細胞群體或包含如請求項1至231中任一項之經改造細胞之細胞群體的方法，該方法包括：

(a) 獲得經分離細胞；

(b) 將相對於對照減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現的一或多種修飾引入該等細胞中；

(c) 將相對於對照增加CD47之表現之一或多種修飾引入該等細胞中；

(d) 量測該等細胞之CD47表現水準；及

(e) 選擇表現該對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍、約1.5倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約11倍、約12倍、約13倍、約14倍、約15倍、約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍之細胞群體，且將該群體鑑別為適於用作治療產品。

【請求項305】如請求項303或304之方法，其中步驟

(b)係在步驟(c)之前實施。

【請求項306】如請求項303或304之方法，其中步驟(c)係在步驟(b)之前實施。

【請求項307】如請求項303或304之方法，其中步驟(b)及(c)係同時實施。

【請求項308】一種確定細胞群體是否適於用作治療產品之方法，該方法包括：

(a) 產生包含編碼CD47之第一外源多核苷酸之經改造細胞，視情況地如請求項1至231中任一項之經改造細胞；

(b) 量測該等細胞之CD47表現水準；及

(c) 若相對於對照，該等細胞表現高約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47，則確定該細胞群體適於用作治療產品。

【請求項309】一種確定細胞群體是否適於用作治療產品之方法，該方法包括：

(a) 產生包含編碼CD47之第一外源多核苷酸之經改造細胞，視情況地如請求項1至231中任一項之經改造細胞；

(b) 量測該等細胞之CD47表現水準；及

(c) 若該等細胞表現該對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍、約1.5倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約11倍、約12倍、約13倍、約14倍、約15

倍、約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍，則確定該細胞群體適於用作治療產品。

【請求項310】如請求項296至309中任一項之方法，其中該對照係野生型細胞、對照細胞或基線參考。

【請求項311】如請求項310之方法，其中該對照細胞係未經修飾或未經改變之細胞，視情況地其中該未經修飾或未經改變之細胞具有與該經改造細胞相同之細胞類型。

【請求項312】如請求項310或311之方法，其中該對照細胞係來自供體之起始材料或來自供體集合之起始細胞集合。

【請求項313】如請求項310之方法，其中該基線參考係同型對照或背景信號水準。

【請求項314】如請求項296至313中任一項之方法，其中該CD47水準係使用基於抗體之量化方法、視情況選用之Quantibrite™分析來測定。

【請求項315】一種確定免疫逃避低免疫原性細胞所需之CD47表現水準之臨限值的方法，該方法包括：

(a) 產生包含編碼CD47之第一外源多核苷酸之經改造細胞；

(b) 基於CD47表現水準分選該等經改造細胞，以生成具有相似CD47表現水準之細胞之集合；

(c) 評價由該等細胞集合誘導之免疫反應；及

(d) 確定免疫逃避所需之CD47表現水準之臨限值。

【請求項316】如請求項315之方法，其中該CD47水

準係使用基於抗體之量化方法、視情況選用之Quantibrite™分析來測定。

【請求項317】如請求項315之方法，其中該方法之步驟(a)進一步包括改造該等細胞以包含相對於野生型細胞或對照細胞減少的一或多種Y染色體基因及I類及/或II類主要組織相容性複合物(MHC)人類白血球抗原表現。

【請求項318】如請求項315或317之方法，其中該免疫反應之該評價係使用活體外分析或活體內分析來實施。

【請求項319】如請求項318之方法，其中該免疫反應之該評價係藉由量測NK細胞介導之細胞毒性、成熟NK細胞之溶解、巨噬細胞吞噬、針對該等細胞之基於抗體之免疫反應或藉由量測在投與接受患者後之某一時間段後仍存在於該接受者中之該等細胞之百分比來實施。

【請求項320】一種鑑別適於用作治療產品之細胞群體或包含如請求項1至231中任一項之經改造細胞之細胞群體的方法，該方法包括：

(a) 將相對於對照減少一或多種MHC I類及/或MHC II類分子之表現之一或多種修飾引入經分離細胞中，及

(b) 將相對於對照增加CD47之表現之一或多種修飾引入該等細胞中。

【請求項321】如請求項320之方法，其進一步包括步驟(c)量測該等細胞之CD47表現水準。

【請求項322】如請求項321之方法，其進一步包括步驟(d)選擇相對於該對照表現至少高約10%、20%、30%、

40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%之量之CD47之細胞群體，且將該群體鑑別為適於用作治療產品。

【請求項323】如請求項321之方法，其進一步包括步驟(d)選擇表現該對照中表現之CD47水準的至少約1.1倍、約1.5倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約11倍、約12倍、約13倍、約14倍、約15倍、約16倍、約17倍、約18倍、約19倍或約20倍之細胞群體，且將該群體鑑別為適於用作治療產品。

【請求項324】如請求項320至323中任一項之方法，其中步驟(a)係在步驟(b)之前實施。

【請求項325】如請求項320至323中任一項之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之前實施。

【請求項326】如請求項320至323中任一項之方法，其中步驟(a)及(b)係同時實施。

【發明圖式】

圖 C47

82 秒
MOI 0 (dKO)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260
280
300
320
340
360
380
400
420
440
460
480
500
520
540
560
580
600
620
640
660
680
700
720
740
760
780

圖 C47
感應
15 30 45 60 75 90
15 30 45 60 75 90
15 30 45 60 75 90
15 30 45 60 75 90
15 30 45 60 75 90

圖 3
0.00
0.03
0.06
0.09
0.12
0.15
0.18
0
2
4
6
8
10
MOI
CFU

圖57
90
75
60
45
30
15
0
(公分)
高度
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
(公斤)
重量
高度與重量關係圖

圖三C47

MOI 5
30K
20K
10K
0
0、01、02、03、04、05、06
時間(s)
TTT302/9
表單編號 A0202
TTT331683-0

圖 C7
熱源
15
30
45
60
75
90
15
30
45
60
75
90
15
30
45
60
75
90
15
30
45
60
75
90
15
30
45
60
75
90

圖 CN7
1,536 奈米
90、70、50、30、20、10、0
CN7
MOI 10
30、8、8、8、2、0

圖 3C67 為習知的非線性轉換曲線圖

圖 C47
MOI 15
0 02 67 38 88 30,
90,750,703,205,010,000,

圖 5 踏板

圖 7C1
384 nm
MOI 20
0
2
3
4
5
6
CV7
圖 7C2

試驗
試驗
15
30
45
60
75
90
15
15
15
15
15

圖 5C17
725 nm
MOI 40
0
2
4
8
16
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
5C17 [μM]

圖 C47
無效版
15 30 45 60 75 90
入版
15 30 45 60 75 90

大阪 CAT 53,178
N1 線 最終改札
0 10 20 30 40 50
人数
図 2A1
相関散布図
2,315 3,315 4,315 5,315 6,315

圖2B7
人數
0
10
20
30
40
50
60
2015
2016
2017
2018
2019
2020
年份
某縣近六年登記人數

第3圖
人數
10
20
30
40
50
VR體驗教學
未來6G/IoT/AI/5G
組織效率
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5

10
20
30
40
50
(公分)
測試結果
2.5
3.5
4.5
5.5
6.5

CO/Z = 1/3, 5/4
X軸：時效小時
Y軸：人數（個）
0
10
20
30
40
50
2:00
3:00
4:00
5:00
6:00
7:00
煙斑期間

橫軸：數量
縱軸：類別
0
20
30
40
50
人數
2
3
5
6
5

CA7-95.863
VK 號碼放射
10 20 30 40 50
公尺
圖 2-5
細胞發展
2:50 2:55 3:00 3:05 3:10 3:15 3:20

10
20
30
40
50
公分
量測
請將此線對齊
2022
2023
2024
2025
2026
2027
2028
2029
2030
2031
2032
2033
2034
2035
2036
2037
2038
2039
2040
2041
2042
2043
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2060
2061

CDN：35,284
NX 特效膠
0
10
20
30
40
50
人數
圖 23
2,035
2,035
2,035

10
20
30
40
50
(公斤)
重量
111
數量(支)
2023/01/05
2023/02/05
2023/03/05
2023/04/05
2023/05/05
2023/06/05
2023/07/05
組成件數

CD47：68.75%
NK细胞数量
10
20
30
40
50
个/视野
Fig.2
细胞数量
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

圖式
10
20
30
40
50
60
(公分)
圖式說明
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0

C347,79,236
M14 基礎
10 20 30 40 50
(mm)
2015 2015 2015 2015 2015
組織強度

10
20
30
40
50
60
人數
年齡
111
2015
2016
2017
2018
2019
2020

CD47 222,777
VX 最適效率
圖 2B1
10 20 30 40 50
2.0 1.5 1.0 0.5 0.3 0.2

細胞生物教師
人數
0
10
20
30
40
50
60
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
細胞生物

CD47 290 942
NK 細胞殺傷
10 20 30 40 50
時間 (秒)
2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
細胞計數

次數（人）
50
40
30
20
10
0
123
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

CD47 369 67
NK細胞殺傷
10
20
30
40
50
人數（單位）
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
細胞毒素

圖3
人數
0
10
20
30
40
50
三峽各里人數
新開公園
2015/05
2015/04
2015/03
2015/02
2015/01
2014/12

圖 23
入指
10
20
30
40
50
開始
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
VK 線性曲
CDE 4568

10
20
30
40
50
人數
[N2V]
累積次數
[111]
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
組成特徵

細胞密度
0
1
2
3
4
0
10
20
30
40
50
人數
圖 2
X 染色體
CD47 439,889

圖三
某校生病人數
人數
0
10
20
30
40
50
0
1
2
3
4
星期

CD47-SIRPα 抗体
人血小板
0
10
20
30
40
50
1
2
3
4

図1

細胞毒性
0
1
2
3
4
10
20
30
40
50
60
人体
肺
NK 活性減少
CD47 686,168

細胞密度
0
1
2
3
4
0
10
20
30
40
50
時間（分）
図2A3
累積自殺数

江湖仁義明快強
55
60
65
70
75
10
20
30
40
50
人情
[0.54]
義理
CD47 53.174

CD47= 60.410
數量
人數
0
20
30
40
50
60
血漿細胞計數
5,000
4,000
3,000
2,000

CD47-6'558-6'558
標準
0
10
20
30
40
50
60
公分
30
公分
30
公分
30
公分
15
公分

CD47：109-366
殺傷
10
20
30
40
50
(%)
比率
5
6
7
8
9
腫瘤細胞/巨噬細胞

15
30
45
60
75
90
人數
成績
CD47，52,476
2.0
5.0
3.5
3.0
5.0
5.0

CDA=84.773
液滴
15 30 45 60 75 90
人群
[剛]
2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5
[圖片]

CD47-203.853
無效
15 30 45 60 75 90
公分
圖3C

CD47 = 226,566
無效期
15 30 45 60 75 90
人數
圖 3-5
預計細胞株數
15 30 45 60 75 90

江淮細胞計數
15
30
45
60
75
80
人數
圖一
無效藥
CD47=27.96

圖3
人群
0
10
20
30
40
50
60
CD47=297.154
無效應
圖片編輯器

CD47: 572.920
癌症病患
健康人
(mg/dL)
0
10
20
30
40
50
60
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0
8.5
9.0
9.5
10.0
血漿細胞濃度

圖 5
人數
60
50
40
30
20
10
0
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
相對細胞生存率
無殺傷
CD47+ 802,429

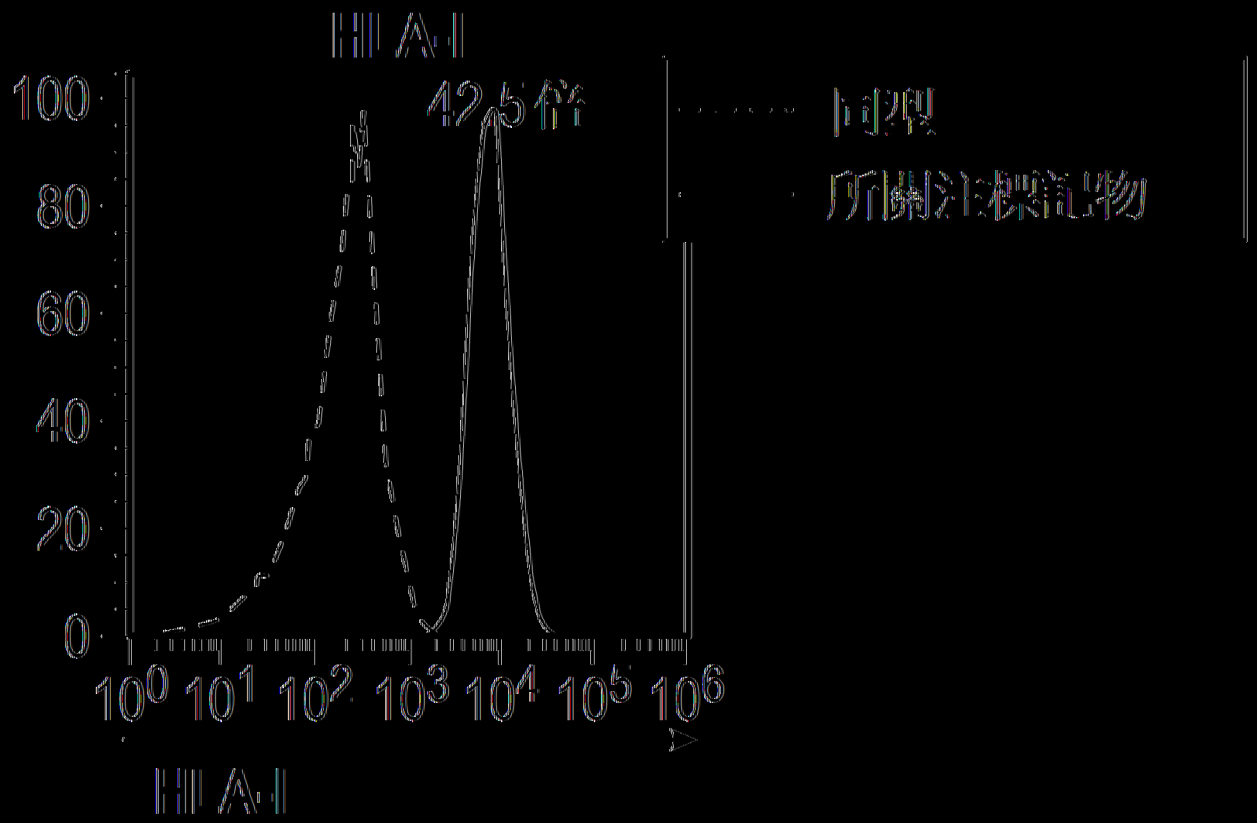

HII A-II
425倍
同型
所關注標記物
100
80
60
40
20
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
HII A-II

圖 4A

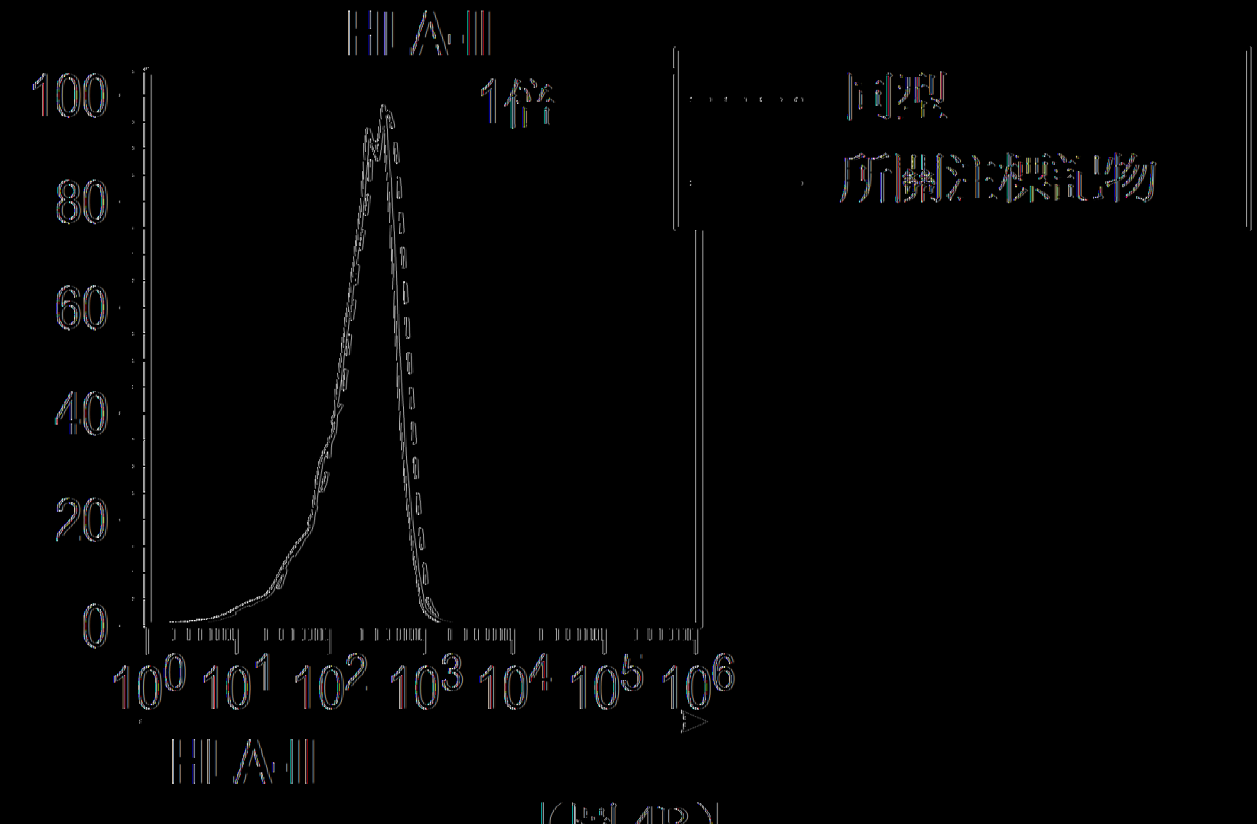
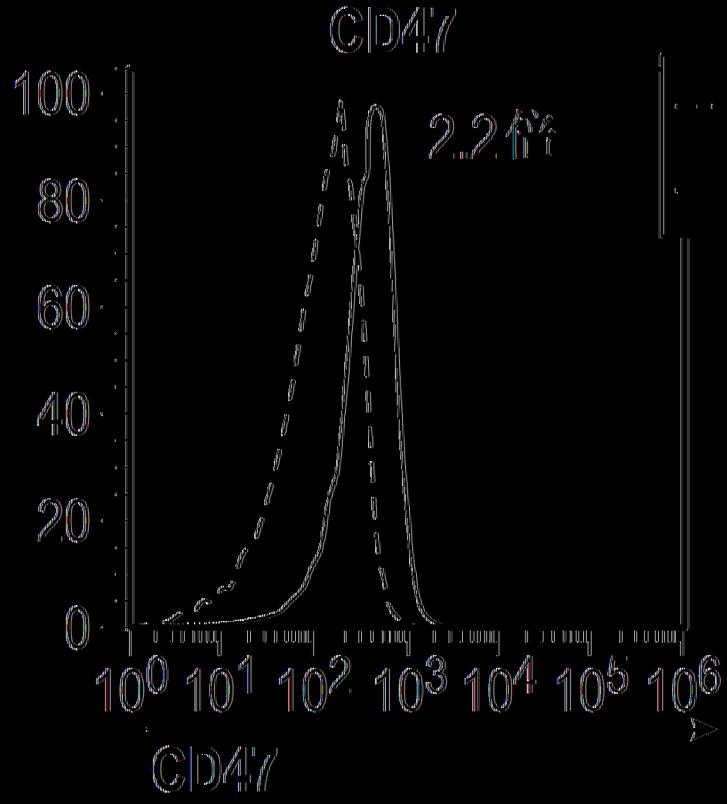
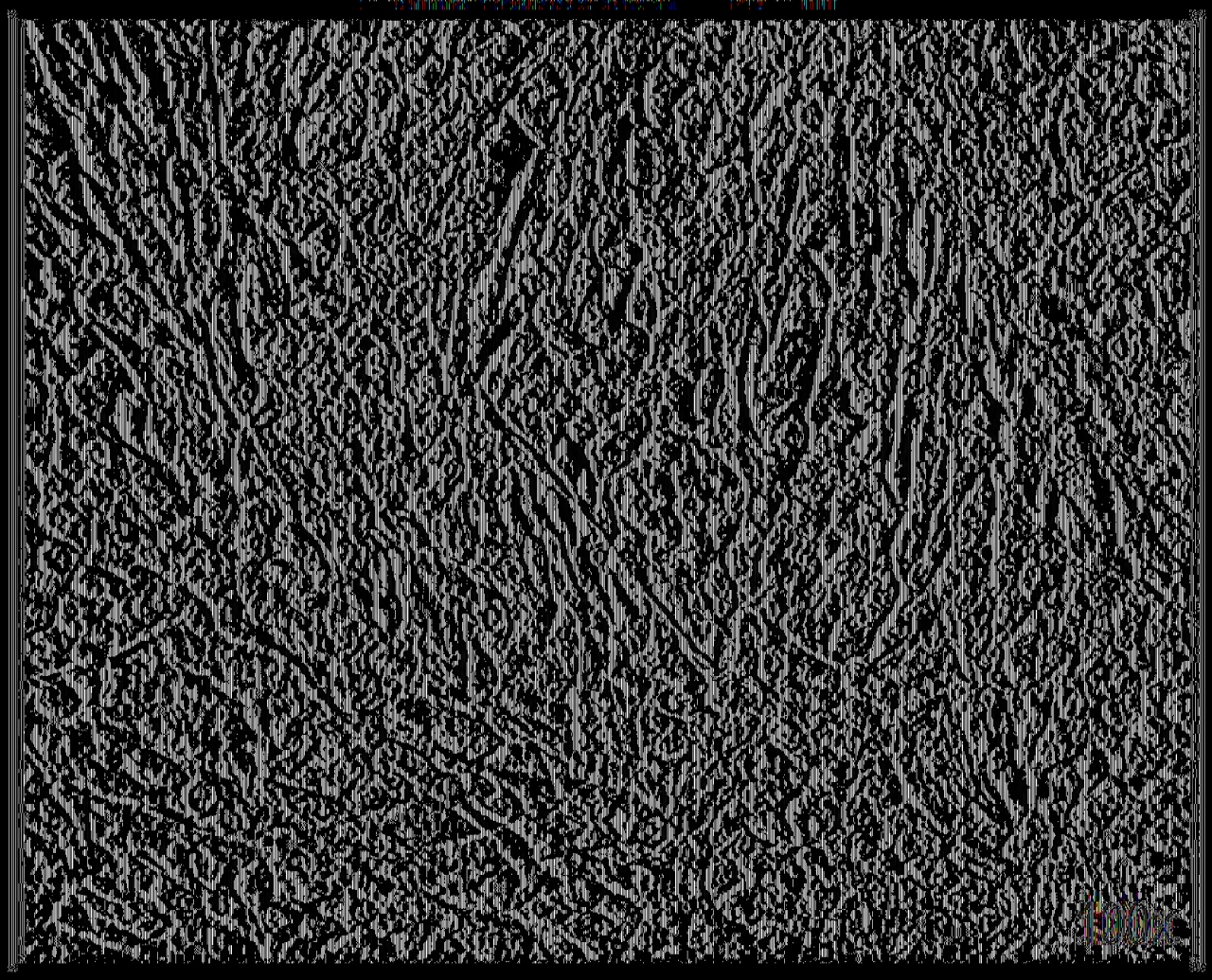

HII A-III
1倍
同型
所關注標記物
100
80
60
40
20
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
HII A-III

圖 4B

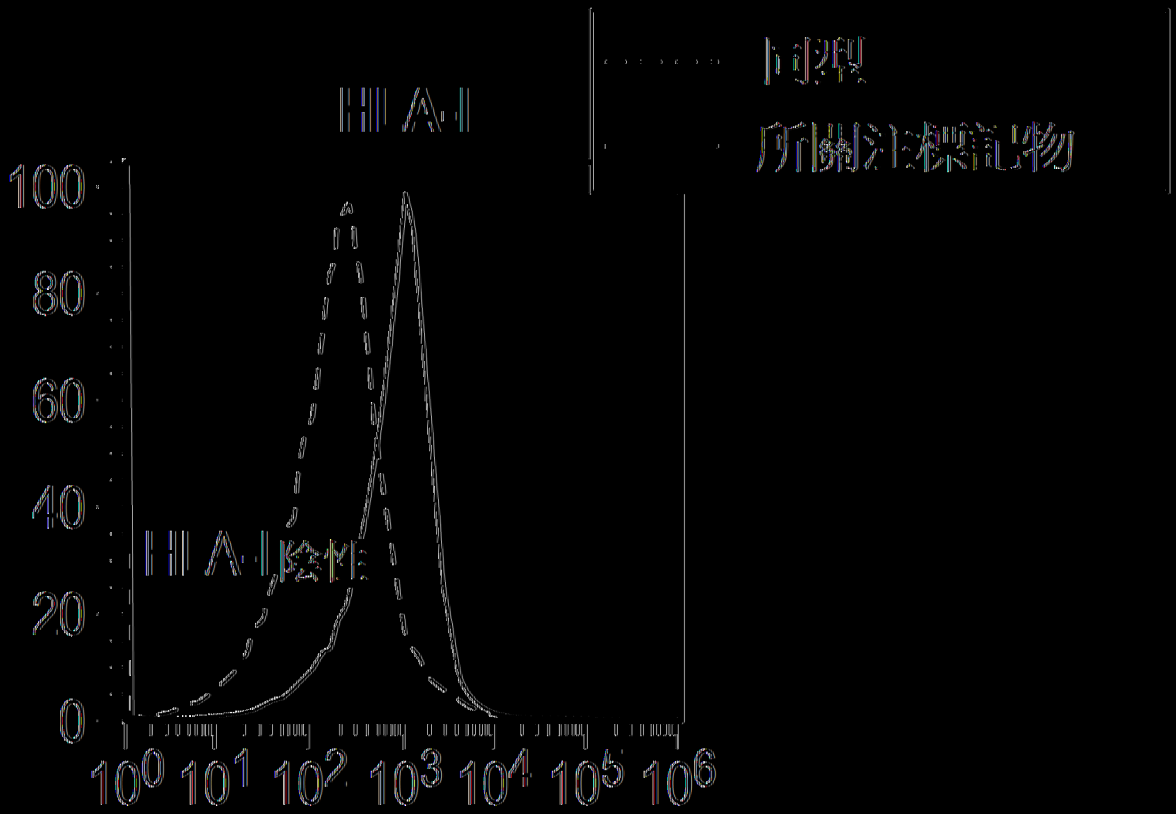

CD47
100
80
60
40
20
0
2.2倍
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
CD47
處理
所關注標記物

（圖 4C）

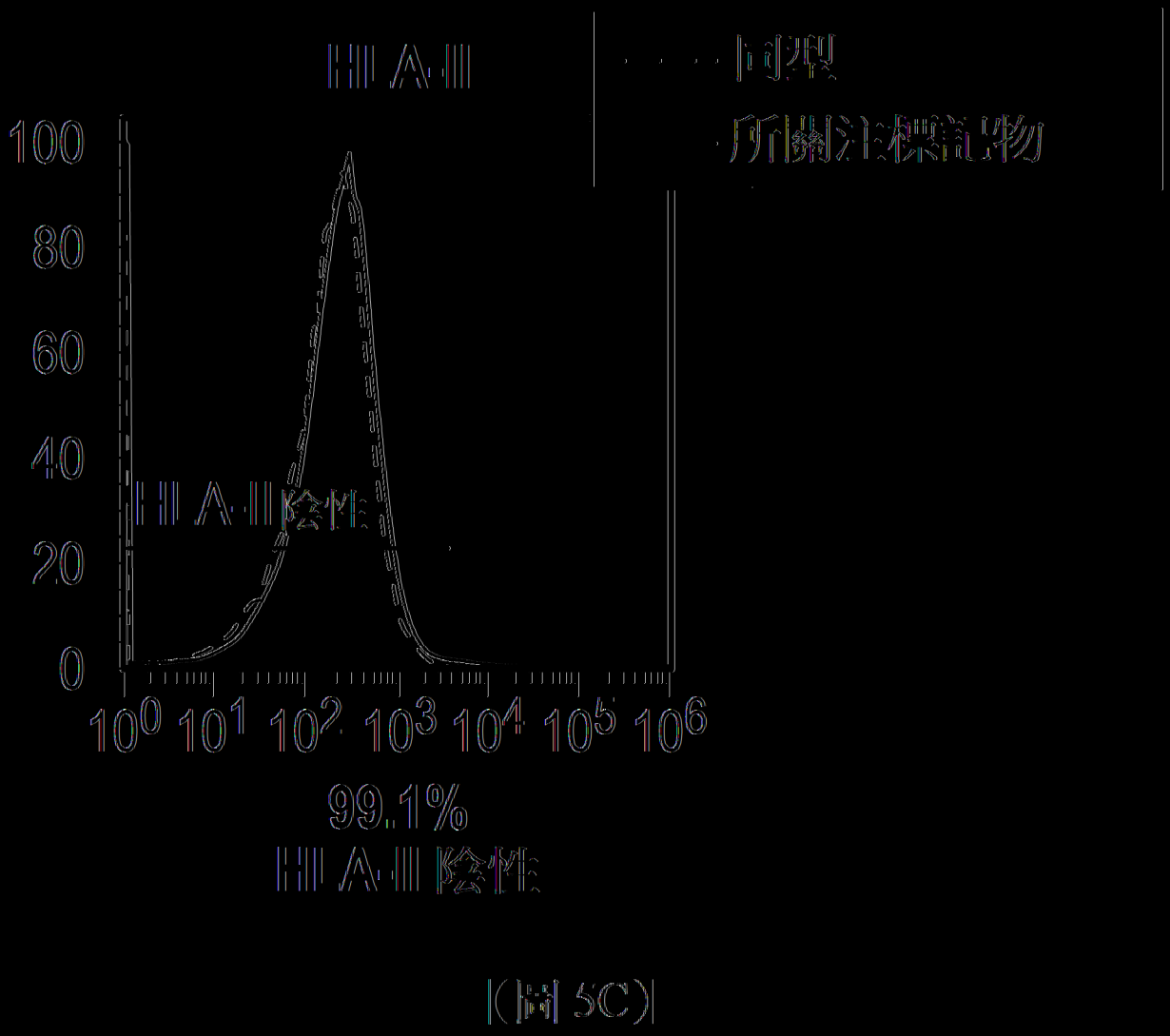
[illegible]



[illegible]


同型
所關注標記物
HIV-1
100
80
60
40
20
0
HIV-1陰性
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
40.2%
HIV-1陰性

（圖 5B）


HII A-III
同型
所關注標靶物
100
80
60
40
20
0
HII A-III陰性
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
99.1%
HII A-III陰性

(圖5C)

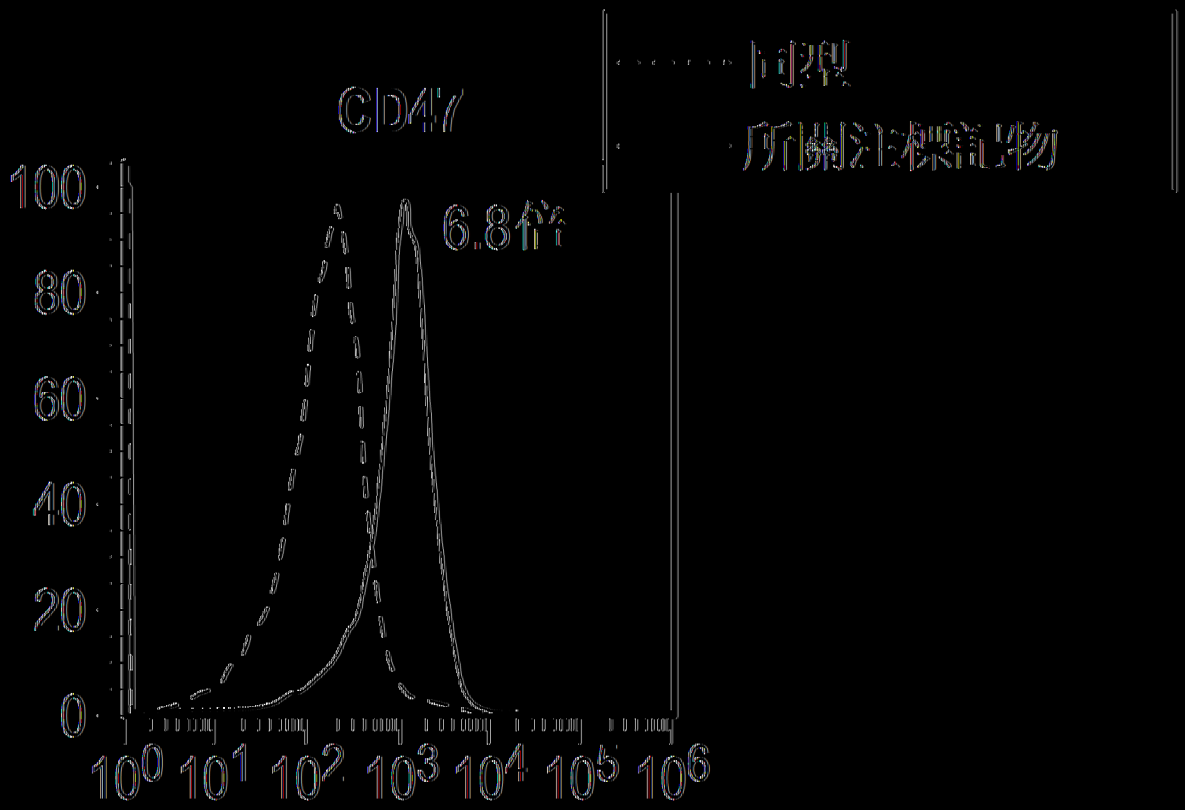
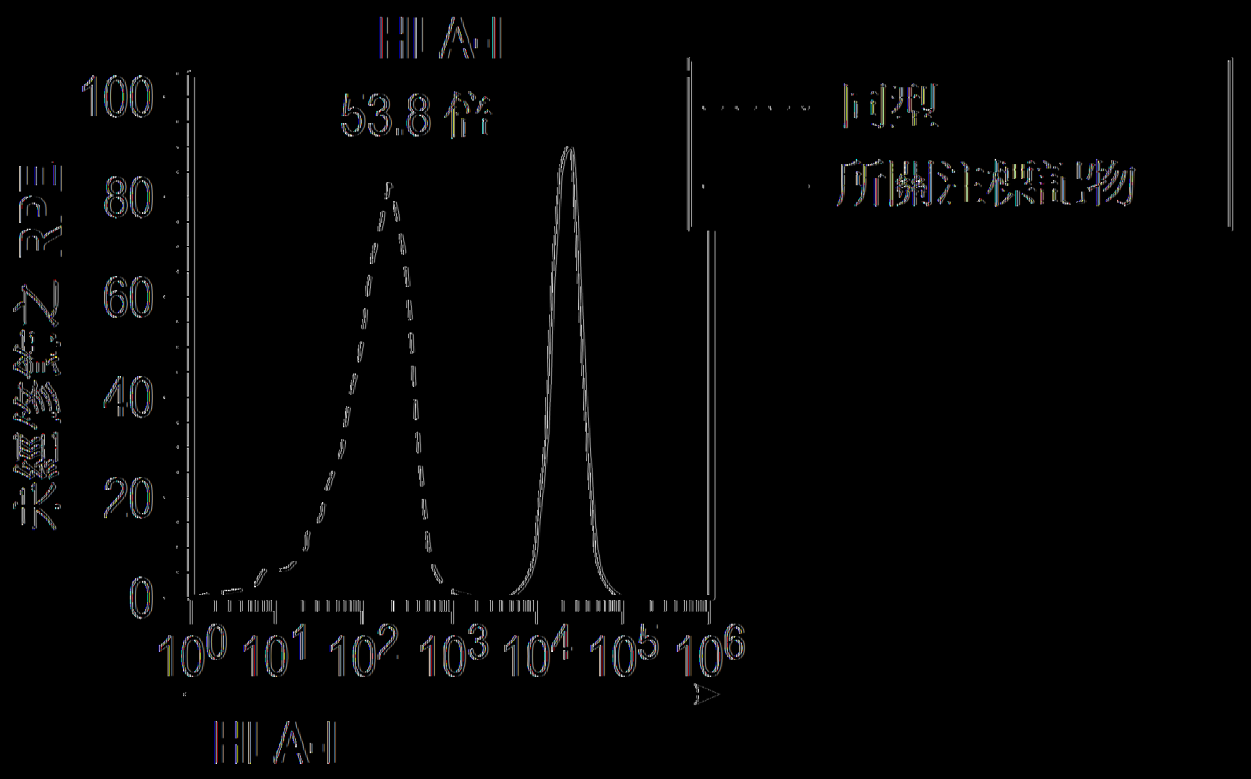
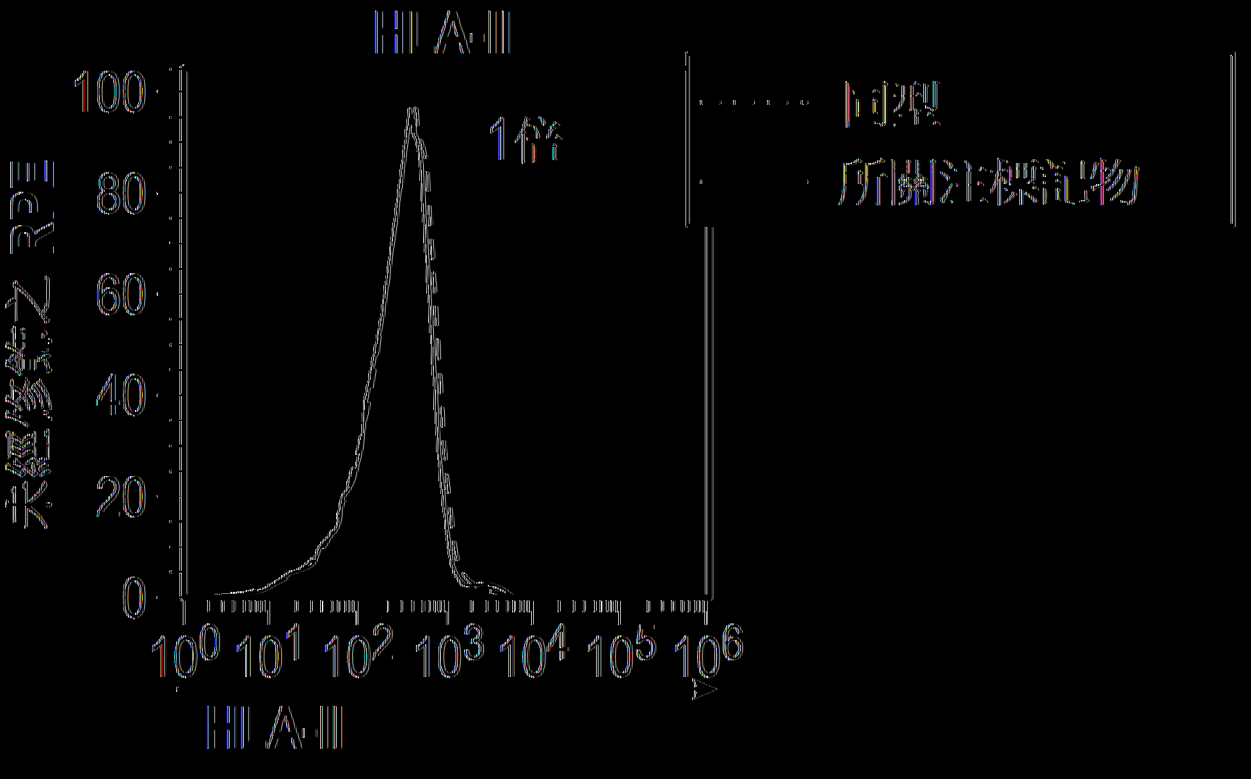


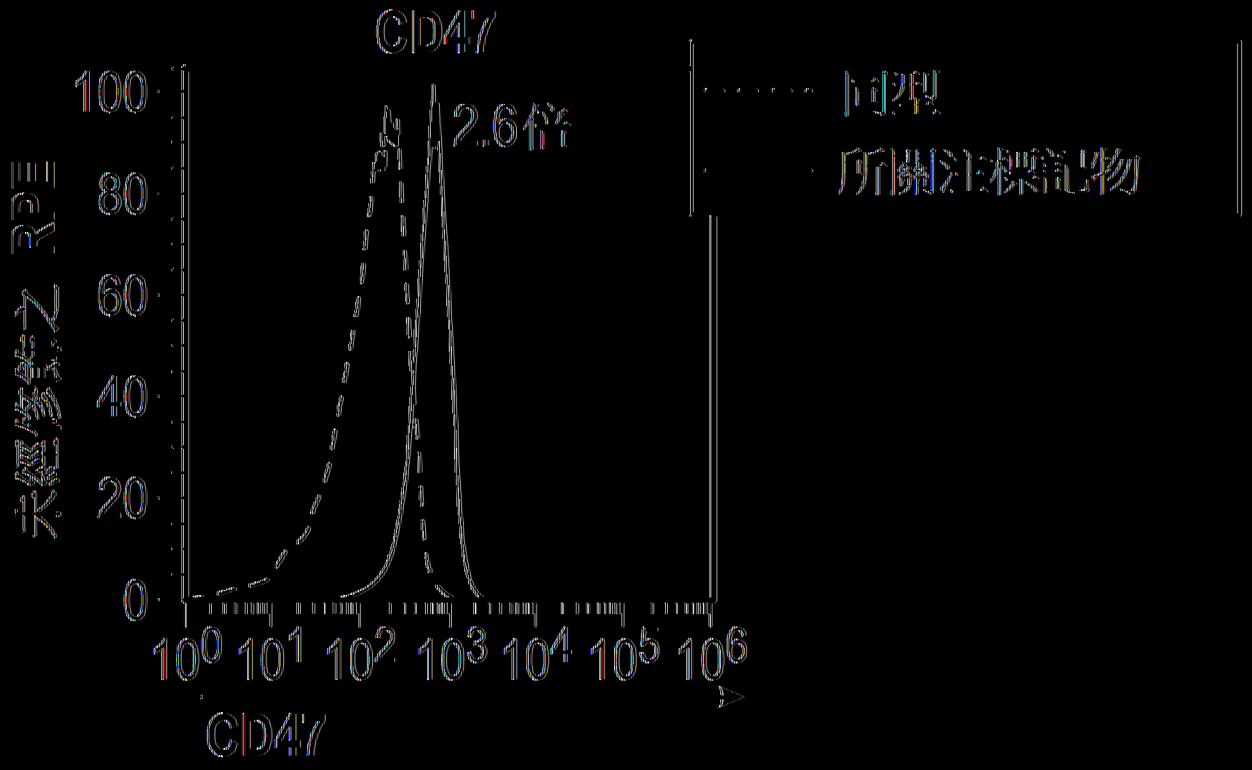
圖 5D


HI A-I
53.8倍
同型
所關注標靶物
100
80
60
40
20
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
HI A-I

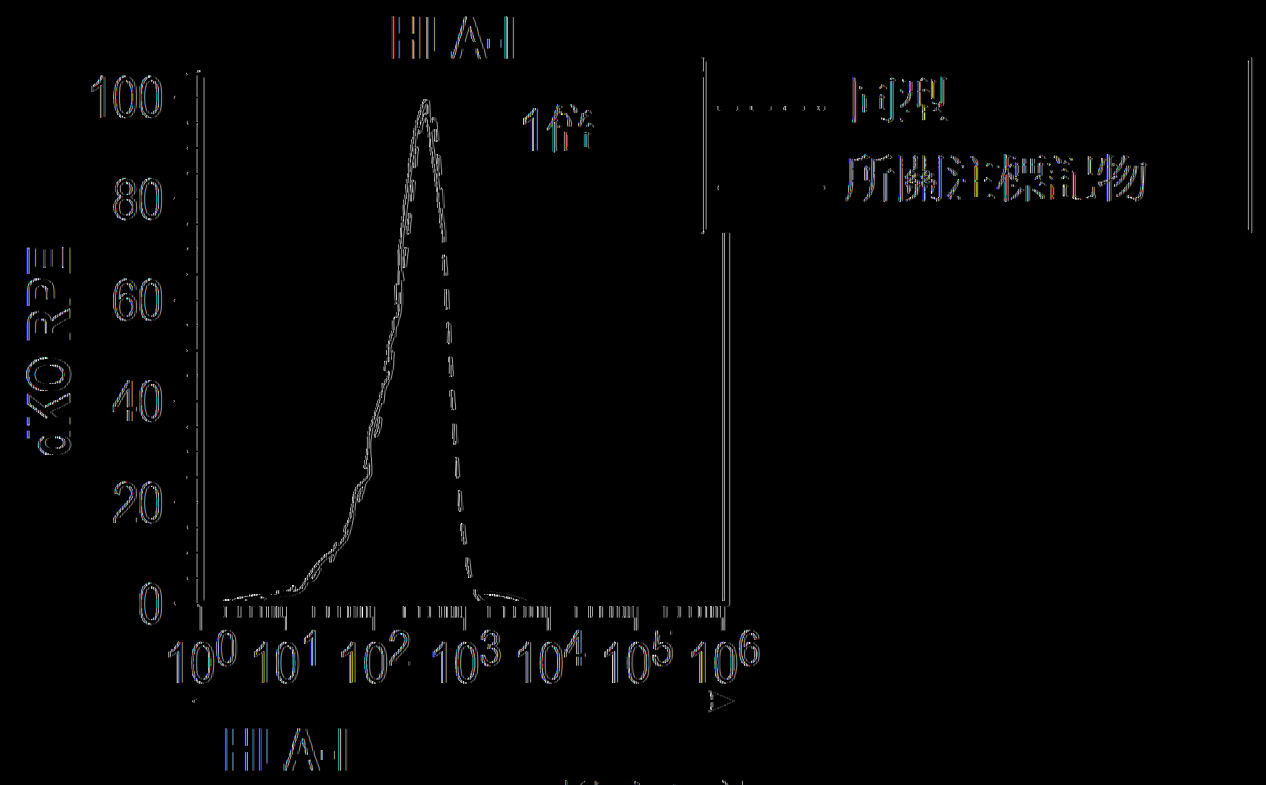
（圖 6A）


HI A-II
1倍
同型
所關注標靶物
100
80
60
40
20
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
HI A-II

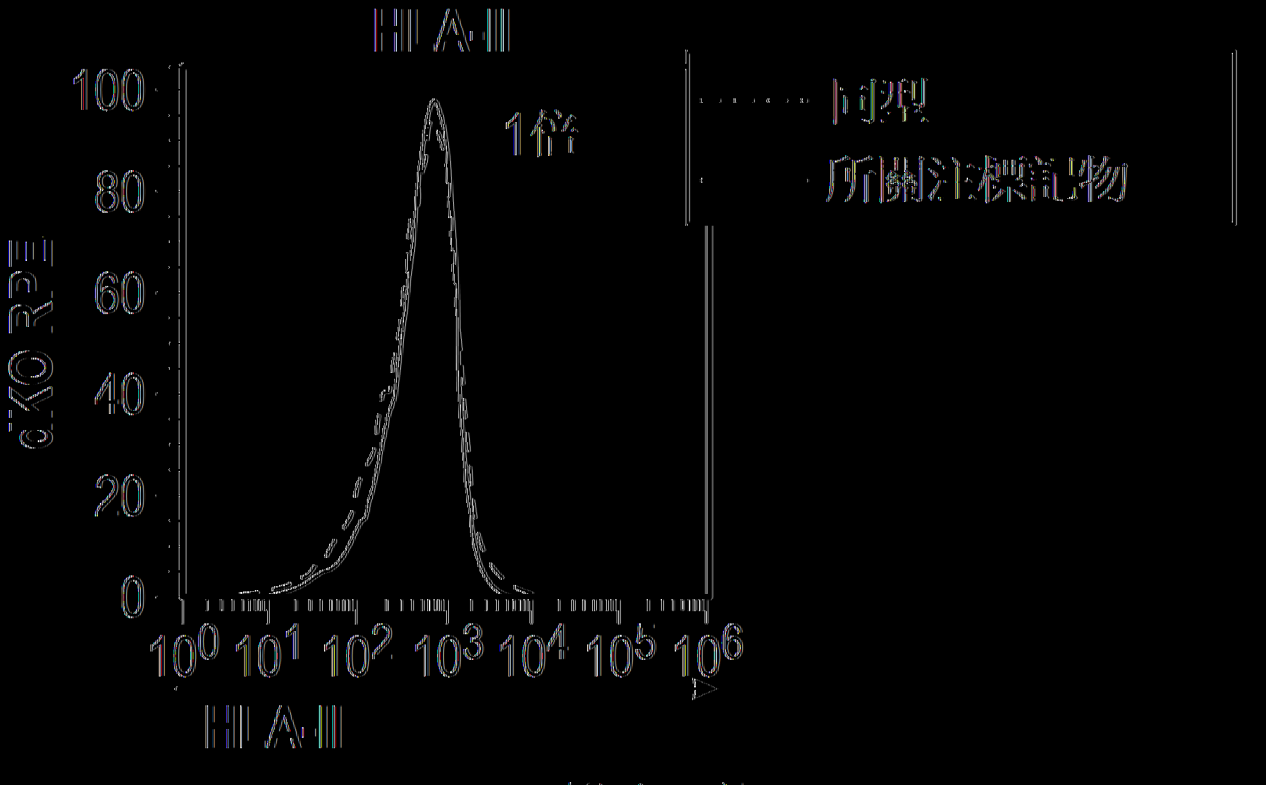
（圖 6B）


CD47
2.6倍
同型
所關注標記物
細胞數(%)
100
80
60
40
20
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
CD47

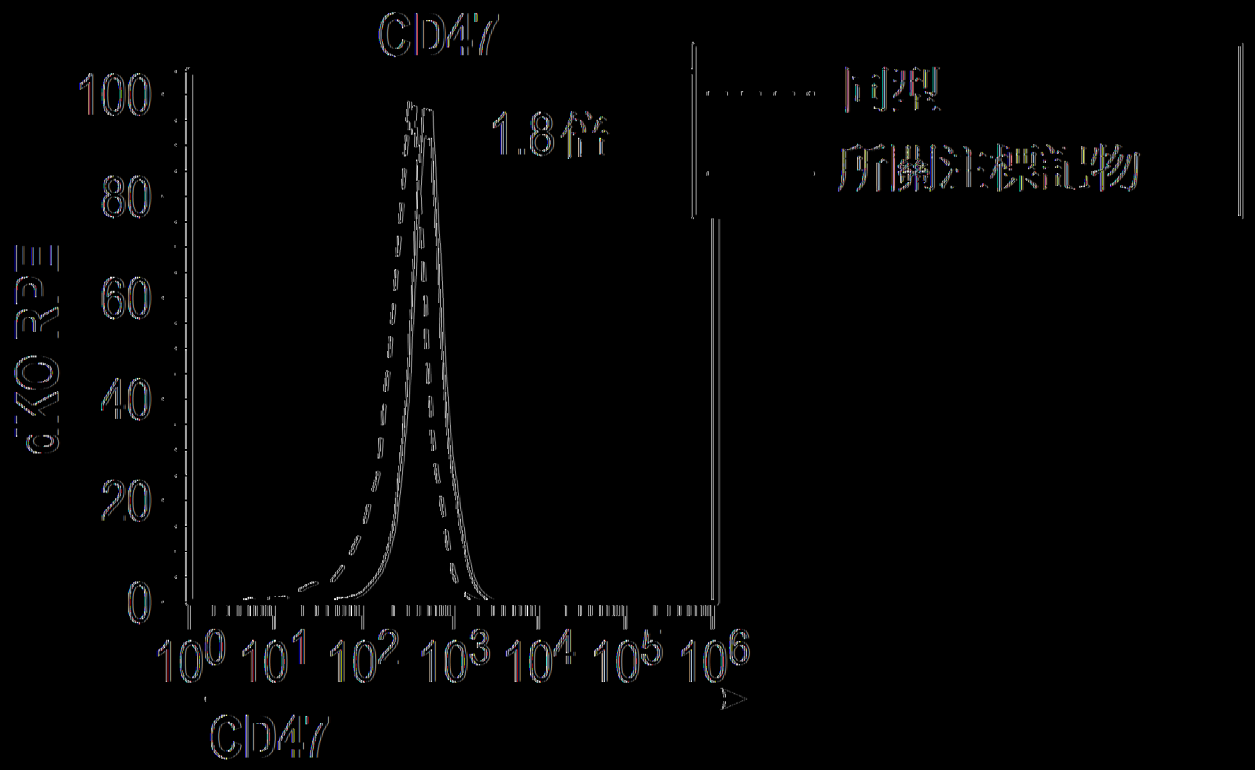
(圖 6C)


HI A-I
100
80
60
40
20
0
cyo ɐɔɐ
1倍
時裡
所關注標記物
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
HI A-I

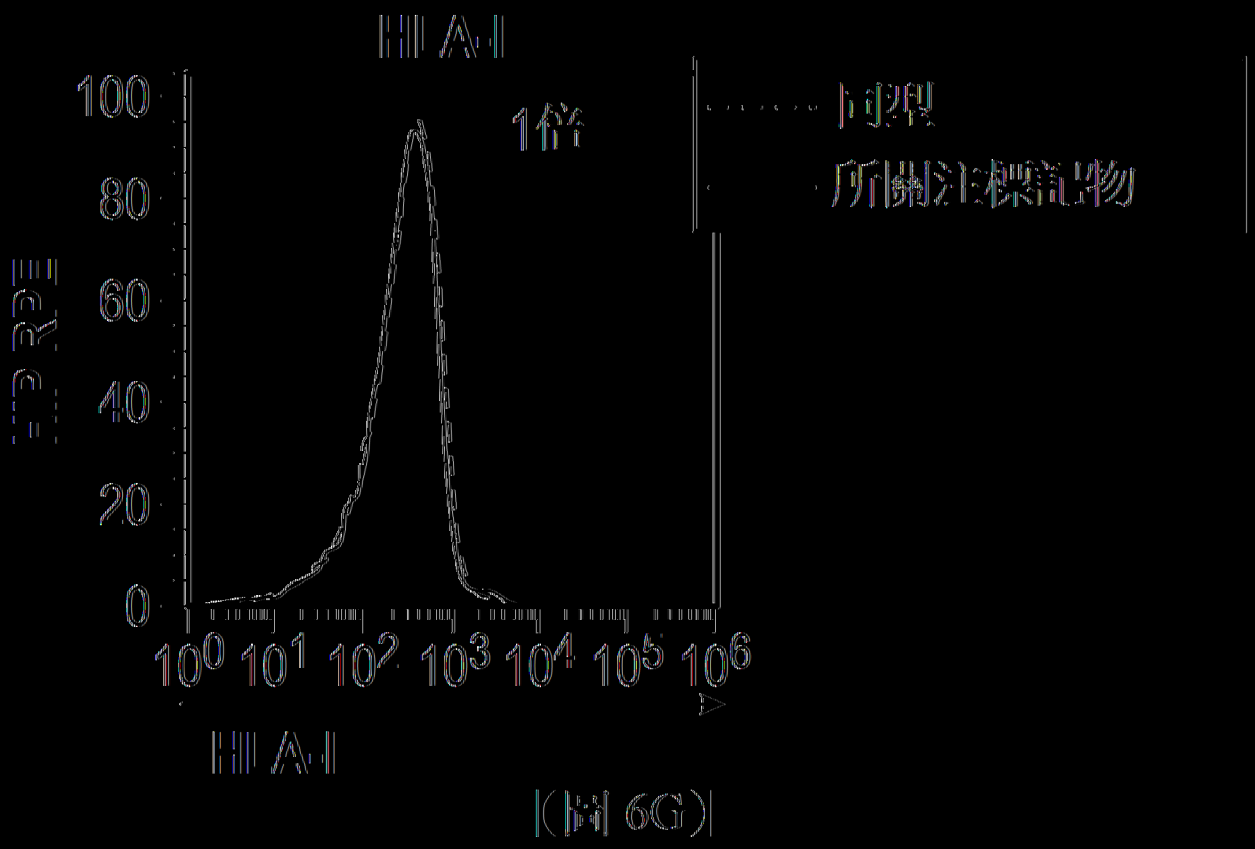
(圖 6D)


HI A-II
100
80
60
40
20
0
cyo ɐɔɐ
1倍
時裡
所關注標記物
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
HI A-II

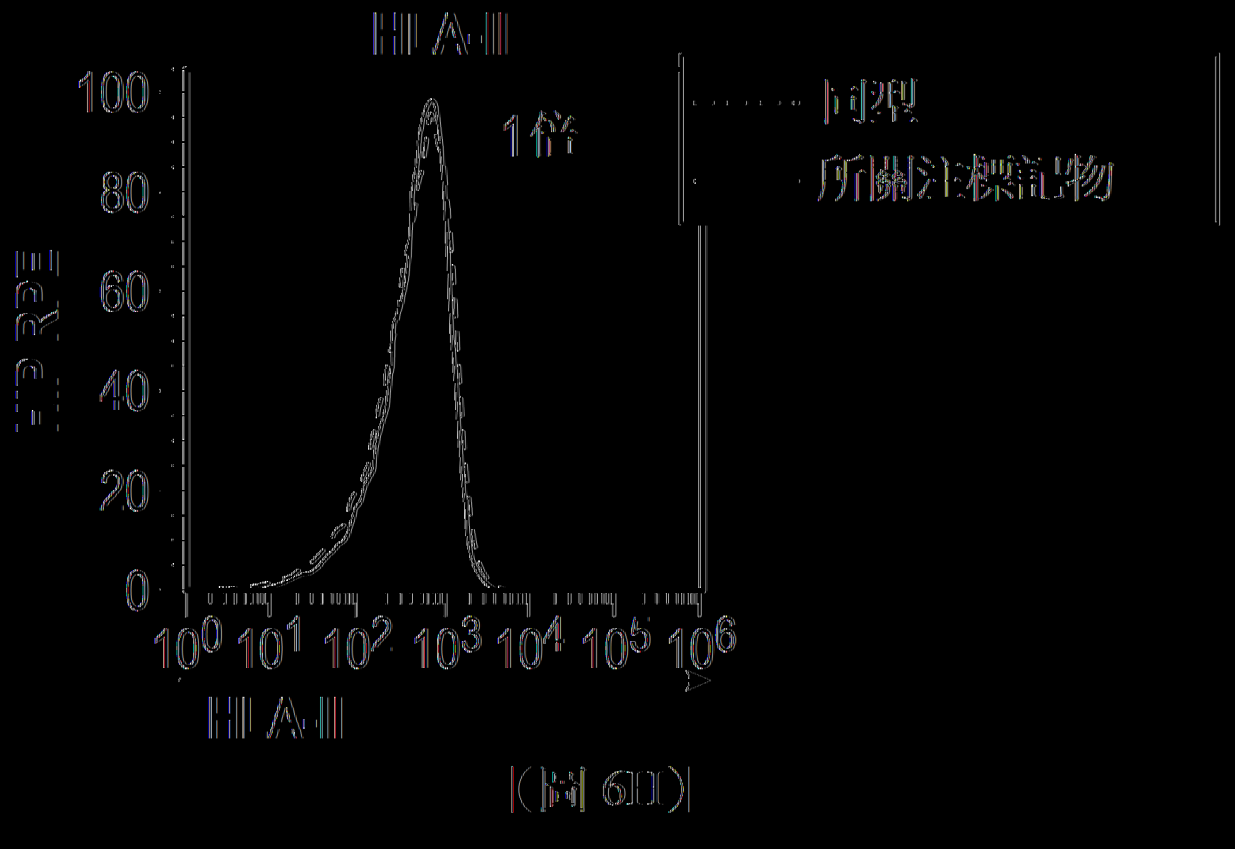
(圖 6E)


CD47
100
80
60
40
20
0
(40 RFU
1.8倍
同型
所關注標靶物
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
CD47

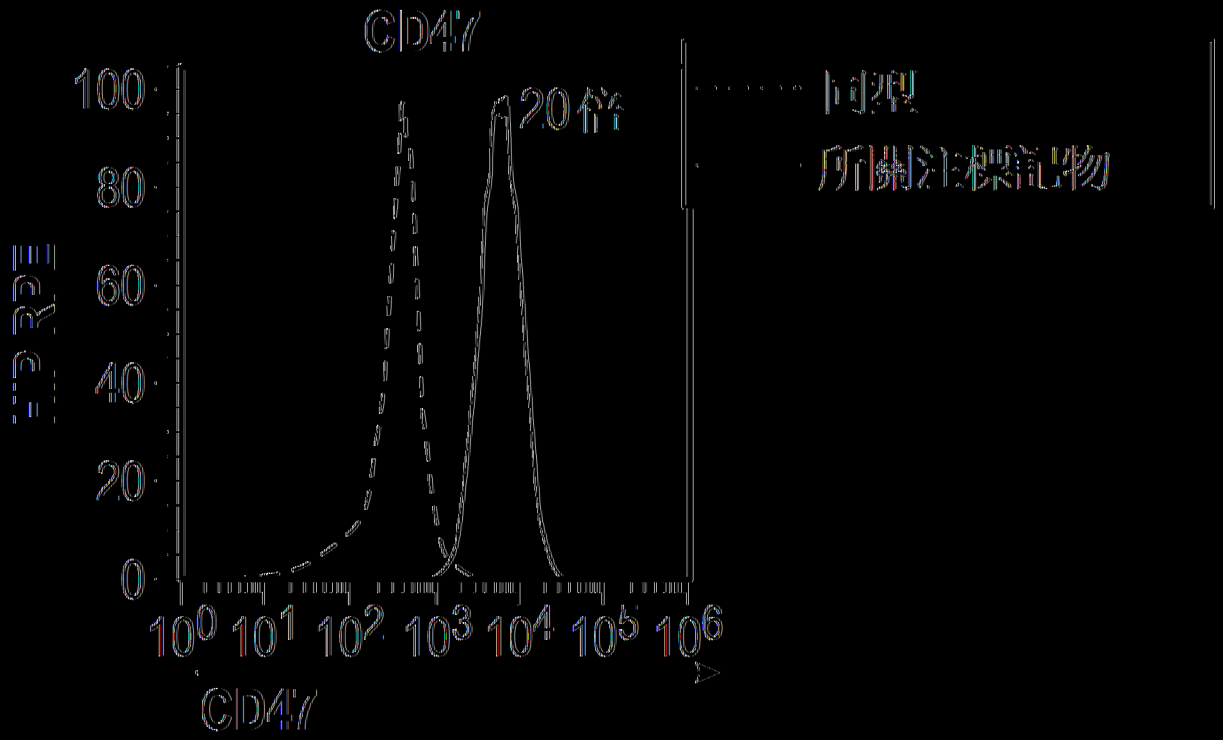
(圖 6F)


HH A-I
100
80
60
40
20
0
Events
1件
同型
所關注標靶物
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
HH A-I

(圖 6G)


HH A-III
100
80
60
40
20
0
Events
1件
同型
所關注標靶物
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
HH A-III

(圖 6H)


CD47
100
80
60
40
20
0
細胞數目
20倍
同型
所關注標靶物
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
CD47

（圖 6D）

圖式
15
30
45
60
75
80
(mA)
(V)

15
30
45
60
75
90
公尺
無效
無效

大發展節之 RPE：
已知細胞特徵

圖式
第六圖
90
75
60
45
30
15
0

發明說明書
發明人
(3)
98 97 96 95 94 93 92 91 90 89 88

0
15
30
45
60
75
90
入射角
反射率
dKO RP:
1.31
1.32
1.33
1.34
1.35

90
75
60
45
30
15
0
(cm)
高度
時間
(sec)

無效
無效
15
30
45
60
75
90
(秒)
時間
(公尺)
距離

RPM	時間
1500	30
2000	45
2500	60
3000	75
3500	90