



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117042794 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 10

(21) 申请号 202280022874.X

(22) 申请日 2022.02.07

(30) 优先权数据

63/147,221 2021.02.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/015496 2022.02.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/170193 EN 2022.08.11

(71) 申请人 因特利亚治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 D·R·库克

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 陈迎春 黄革生

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书18页 说明书131页

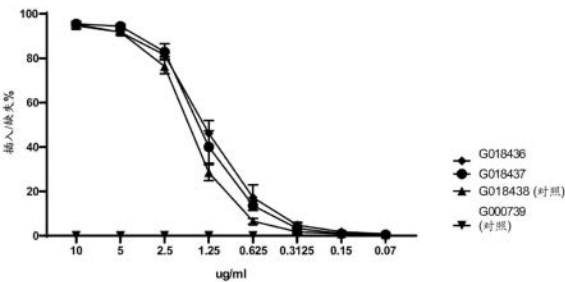
序列表138页 附图14页

(54) 发明名称

用于免疫疗法的T细胞免疫球蛋白和粘蛋白
结构域3 (TIM3) 组合物和方法

(57) 摘要

提供了在TIM3基因内进行编辑 (例如改变
DNA序列) 的组合物和方法。提供了用于免疫疗法的
组合物和方法。



1. 一种工程化细胞, 所述工程化细胞包含在人类TIM3序列中在chr5:157085832-157109044的基因组坐标内的基因修饰。

2. 如权利要求1所述的工程化细胞, 其中所述基因修饰选自插入、缺失和取代。

3. 如权利要求1或2所述的工程化细胞, 其中所述基因修饰抑制所述TIM3基因的表达。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的工程化细胞, 其中所述基因修饰包括以下内的至少一个核苷酸的修饰: 选自以下的基因组坐标:

TIM 3 NO	基因组坐标(hg38)
TIM3 - 1	chr5:157106867-157106887
TIM3 - 2	chr5:157106862-157106882
TIM3 - 3	chr5:157106803-157106823
TIM3 - 4	chr5:157106850-157106870
TIM3 - 5	chr5:157104726-157104746
TIM3 - 6	chr5:157106668-157106688
TIM3 - 7	chr5:157104681-157104701
TIM3 - 8	chr5:157104681-157104701
TIM3 - 9	chr5:157104680-157104700
TIM3 - 10	chr5:157106676-157106696
TIM3 - 11	chr5:157087271-157087291
TIM3 - 12	chr5:157095432-157095452
TIM3 - 13	chr5:157095361-157095381
TIM3 - 14	chr5:157095360-157095380
TIM3 - 15	chr5:157108945-157108965
TIM3 - 18	chr5:157106751-157106771
TIM3 - 19	chr5:157095419-157095439
TIM3 - 22	chr5:157104679-157104699
TIM3 - 23	chr5:157106824-157106844
TIM3 - 26	chr5:157087117-157087137
TIM3 - 29	chr5:157095379-157095399
TIM3 - 32	chr5:157106864-157106884

TIM 3 NO	基因组坐标(hg38)
TIM3 - 42	chr5:157095405-157095425
TIM3 - 44	chr5:157095404-157095424
TIM3 - 56	chr5:157106888-157106908
TIM3 - 58	chr5:157087126-157087146
TIM3 - 59	chr5:157087253-157087273
TIM3 - 62	chr5:157106889-157106909
TIM3 - 63	chr5:157106935-157106955
TIM3 - 66	chr5:157106641-157106661
TIM3 - 69	chr5:157087084-157087104
TIM3 - 75	chr5:157104663-157104683
TIM3 - 82	chr5:157106875-157106895
TIM3 - 86	chr5:157087184-157087204
TIM3 - 87	chr5:157106936-157106956
TIM3 - 88	chr5:157104696-157104716

或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:TIM3-1至TIM3-4、TIM3-6至TIM3-15、TIM3-18、TIM3-19、TIM3-22、TIM3-29、TIM3-42、TIM3-44、TIM3-58、TIM3-62、TIM3-69、TIM3-82、TIM3-86和TIM3-88:chr5:157106867-157106887、chr5:157106862-157106882、chr5:157106803-157106823、chr5:157106850-157106870、chr5:157106668-157106688、chr5:157104681-157104701、chr5:157104681-157104701、chr5:157104680-157104700、chr5:157106676-157106696、chr5:157087271-157087291、chr5:157095432-157095452、chr5:157095361-157095381、chr5:157095360-157095380、chr5:157108945-157108965、chr5:157106751-157106771、chr5:157095419-157095439、chr5:157104679-157104699、chr5:157095379-157095399、chr5:157095405-157095425、chr5:157095404-157095424、chr5:157087126-157087146、chr5:157106889-157106909、chr5:157087084-157087104、chr5:157106875-157106895、chr5:157087184-157087204和chr5:157104696-157104716;或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:TIM3-1至TIM3-5、TIM3-7、TIM3-8、TIM3-12至TIM3-15、TIM3-23、TIM3-26、TIM3-32、TIM3-56、TIM3-59、TIM3-63、TIM3-66、TIM3-75和TIM3-87:chr5:157106867-157106887、chr5:157106862-157106882、chr5:157106803-157106823、chr5:157106850-157106870、chr5:157106668-157106688、chr5:157104681-157104701、chr5:157104681-157104701、chr5:157095432-157095452、chr5:157095361-157095381、chr5:157095360-157095380、chr5:157108945-157108965、chr5:157106824-157106844、chr5:157087117-157087137、chr5:157106864-157106884、chr5:157106888-157106908、chr5:157087253-157087273、chr5:157106935-157106955、chr5:157106641-157106661、chr5:157104663-157104683和chr5:157106936-157106956;或

分别选自由以下靶向的那些的基因组坐标:TIM3-2、TIM3-4、TIM3-15、TIM3-23、TIM3-56、TIM3-59、TIM3-63、TIM3-75和TIM3-87:chr5:157106862-157106882、chr5:157106850-157106870、chr5:157108945-157108965、chr5:157106824-157106844、chr5:157106888-157106908、chr5:157087253-157087273、chr5:157106935-157106955、chr5:157104663-157104683和chr5:157106936-157106956;或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:TIM3-1至TIM3-4:chr5:157106867-157106887、chr5:157106862-157106882、chr5:157106803-157106823和chr5:157106850-157106870;或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:TIM3-2、TIM-4和TIM3-15:chr5:157106862-157106882、chr5:157106850-157106870和chr5:157108945-157108965;或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:TIM3-2、TIM-4、TIM3-15、TIM3-63和TIM3-87:chr5:157106862-157106882、chr5:157106850-157106870、chr5:157108945-157108965、chr5:157106935-157106955和chr5:157106936-157106956y;或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:TIM3-2和TIM3-15:chr5:157106862-157106882和chr5:157108945-157108965;或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:TIM3-63和TIM3-87:chr5:157106935-157106955和chr5:157106936-157106956;或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:TIM3-15:chr5:157108945-157108965。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞包含在内源T细胞受体 (TCR) 序列的基因组坐标内的基因修饰,其中所述基因修饰抑制所述TCR基因的表达,任选地其中所述TCR基因是TRAC或TRBC。

6. 如权利要求5所述的工程化细胞,所述工程化细胞包含TRBC在选自以下的基因组坐标内的基因修饰:

TRBC NO:	基因组坐标(hg38)
TRBC-1	chr7:142791996-142792016
TRBC-2	chr7:142792047-142792067
TRBC-3	chr7:142792008-142792028
TRBC-4	chr7:142791931-142791951
TRBC-5	chr7:142791930-142791950
TRBC-6	chr7:142791748-142791768
TRBC-7	chr7:142791720-142791740
TRBC-8	chr7:142792041-142792061
TRBC-9	chr7:142802114-142802134
TRBC-10	chr7:142792009-142792029
TRBC-11	chr7:142792697-142792717
TRBC-12	chr7:142791963-142791983
TRBC-13	chr7:142791976-142791996
TRBC-14	chr7:142791974-142791994
TRBC-15	chr7:142791970-142791990
TRBC-16	chr7:142791948-142791968
TRBC-17	chr7:142791913-142791933
TRBC-18	chr7:142791961-142791981
TRBC-19	chr7:142792068-142792088
TRBC-20	chr7:142791975-142791995

TRBC NO:	基因组坐标(hg38)
TRBC-21	chr7:142791773-142791793
TRBC-22	chr7:142791919-142791939
TRBC-23	chr7:142791834-142791854
TRBC-24	chr7:142791878-142791898
TRBC-25	chr7:142802141-142802161
TRBC-26	chr7:142791844-142791864
TRBC-27	chr7:142801154-142801174
TRBC-28	chr7:142791961-142791981
TRBC-29	chr7:142792001-142792021
TRBC-30	chr7:142791979-142791999
TRBC-31	chr7:142792041-142792061
TRBC-32	chr7:142792003-142792023
TRBC-33	chr7:142791984-142792004
TRBC-34	chr7:142792002-142792022
TRBC-35	chr7:142791966-142791986
TRBC-36	chr7:142792007-142792027
TRBC-37	chr7:142791993-142792013
TRBC-38	chr7:142791902-142791922
TRBC-39	chr7:142791724-142791744
TRBC-40	chr7:142791973-142791993
TRBC-41	chr7:142791920-142791940
TRBC-42	chr7:142791994-142792014
TRBC-43	chr7:142791887-142791907
TRBC-44	chr7:142791907-142791927
TRBC-45	chr7:142791952-142791972
TRBC-46	chr7:142791721-142791741
TRBC-47	chr7:142792718-142792738
TRBC-48	chr7:142791729-142791749
TRBC-49	chr7:142791911-142791931
TRBC-50	chr7:142791867-142791887
TRBC-51	chr7:142791899-142791919
TRBC-52	chr7:142791727-142791747
TRBC-53	chr7:142791949-142791969
TRBC-54	chr7:142791933-142791953
TRBC-55	chr7:142791932-142791952
TRBC-56	chr7:142792057-142792077
TRBC-57	chr7:142791940-142791960
TRBC-58	chr7:142791747-142791767
TRBC-59	chr7:142791881-142791901
TRBC-60	chr7:142791779-142791799

TRBC NO:	基因组坐标(hg38)
TRBC-61	chr7:142792054-142792074
TRBC-62	chr7:142792069-142792089
TRBC-63	chr7:142792712-142792732
TRBC-64	chr7:142791729-142791749
TRBC-65	chr7:142791821-142791841
TRBC-66	chr7:142792052-142792072
TRBC-67	chr7:142791916-142791936
TRBC-68	chr7:142791899-142791919
TRBC-69	chr7:142791772-142791792
TRBC-70	chr7:142792714-142792734
TRBC-71	chr7:142792042-142792062
TRBC-72	chr7:142791962-142791982
TRBC-73	chr7:142791988-142792008
TRBC-74	chr7:142791982-142792002
TRBC-75	chr7:142792049-142792069
TRBC-76	chr7:142791839-142791859
TRBC-77	chr7:142791893-142791913
TRBC-78	chr7:142791945-142791965
TRBC-79	chr7:142791964-142791984
TRBC-80	chr7:142791757-142791777
TRBC-81	chr7:142792048-142792068
TRBC-82	chr7:142791774-142791794
TRBC-83	chr7:142792048-142792068
TRBC-84	chr7:142791830-142791850
TRBC-85	chr7:142791909-142791929
TRBC-86	chr7:142791912-142791932
TRBC-87	chr7:142791766-142791786
TRBC-88	chr7:142791880-142791900
TRBC-89	chr7:142791919-142791939

7. 如权利要求4-6中任一项所述的工程化细胞,所述工程化细胞包含TRAC在选自以下的基因组坐标内的基因修饰:

TRAC NO:	基因组坐标(hg38)
TRAC-90	chr14:22547524-22547544
TRAC-91	chr14:22550581-22550601
TRAC-92	chr14:22550608-22550628
TRAC-93	chr14:22550611-22550631
TRAC-94	chr14:22550622-22550642
TRAC-95	chr14:22547529-22547549

TRAC NO:	基因组坐标(hg38)
TRAC-96	chr14:22547512-22547532
TRAC-97	chr14:22547525-22547545
TRAC-98	chr14:22547536-22547556
TRAC-99	chr14:22547575-22547595
TRAC-100	chr14:22547640-22547660
TRAC-101	chr14:22547647-22547667
TRAC-102	chr14:22547777-22547797
TRAC-103	chr14:22549638-22549658
TRAC-104	chr14:22549646-22549666
TRAC-105	chr14:22550600-22550620
TRAC-106	chr14:22550605-22550625
TRAC-107	chr14:22550625-22550645
TRAC-108	chr14:22539116-22539136
TRAC-109	chr14:22539120-22539140
TRAC-110	chr14:22547518-22547538
TRAC-111	chr14:22539082-22539102
TRAC-112	chr14:22539061-22539081
TRAC-113	chr14:22539097-22539117
TRAC-114	chr14:22547697-22547717
TRAC-115	chr14:22550571-22550591
TRAC-116	chr14:22550631-22550651
TRAC-117	chr14:22550658-22550678
TRAC-118	chr14:22547712-22547732
TRAC-119	chr14:22550636-22550656
TRAC-120	chr14:22550636-22550656
TRAC-121	chr14:22550582-22550602
TRAC-122	chr14:22550606-22550626
TRAC-123	chr14:22550609-22550629
TRAC-124	chr14:22547691-22547711
TRAC-125	chr14:22547576-22547596
TRAC-126	chr14:22549648-22549668
TRAC-127	chr14:22549660-22549680
TRAC-128	chr14:22547716-22547736
TRAC-129	chr14:22547514-22547534
TRAC-130	chr14:22550662-22550682
TRAC-131	chr14:22550593-22550613
TRAC-132	chr14:22550612-22550632
TRAC-133	chr14:22547521-22547541
TRAC-134	chr14:22547540-22547560
TRAC-135	chr14:22539121-22539141

TRAC NO:	基因组坐标(hg38)
TRAC-136	chr14:22547632-22547652
TRAC-137	chr14:22547674-22547694
TRAC-138	chr14:22549643-22549663
TRAC-139	chr14:22547655-22547675
TRAC-140	chr14:22547667-22547687
TRAC-141	chr14:22539085-22539105
TRAC-142	chr14:22549634-22549654
TRAC-143	chr14:22539064-22539084
TRAC-144	chr14:22547639-22547659
TRAC-145	chr14:22547731-22547751
TRAC-146	chr14:22547734-22547754
TRAC-147	chr14:22547591-22547611
TRAC-148	chr14:22547657-22547677
TRAC-149	chr14:22547519-22547539
TRAC-150	chr14:22549674-22549694
TRAC-151	chr14:22547678-22547698
TRAC-152	chr14:22539087-22539107
TRAC-153	chr14:22547595-22547615
TRAC-154	chr14:22547633-22547653
TRAC-155	chr14:22547732-22547752
TRAC-156	chr14:22547656-22547676
TRAC-157	chr14:22539086-22539106
TRAC-158	chr14:22547491-22547511
TRAC-159	chr14:22547618-22547638
TRAC-160	chr14:22549644-22549664
TRAC-161	chr14:22547522-22547542
TRAC-162	chr14:22539089-22539109
TRAC-163	chr14:22539062-22539082
TRAC-164	chr14:22547597-22547617
TRAC-165	chr14:22547677-22547697
TRAC-166	chr14:22549645-22549665
TRAC-167	chr14:22550610-22550630
TRAC-168	chr14:22547511-22547531
TRAC-169	chr14:22550607-22550627
TRAC-170	chr14:22550657-22550677
TRAC-171	chr14:22550604-22550624
TRAC-172	chr14:22539132-22539152
TRAC-173	chr14:22550632-22550652
TRAC-174	chr14:22547571-22547591
TRAC-175	chr14:22547711-22547731

TRAC NO:	基因组坐标(hg38)
TRAC-176	chr14:22547666-22547686
TRAC-177	chr14:22547567-22547587
TRAC-178	chr14:22547624-22547644
TRAC-185	chr14:22547501-22547521
TRAC-213	chr14:22547519-22547539
TRAC-214	chr14:22547556-22547576
TRAC-215	chr14:22547486-22547506
TRAC-216	chr14:22547487-22547507
TRAC-217	chr14:22547493-22547513
TRAC-218	chr14:22547502-22547522

或所述基因修饰在选自chr14:22547524-22547544、chr14:22547529-22547549、chr14:22547525-22547545、chr14:22547536-22547556、chr14:22547501-22547521、chr14:22547556-22547576和chr14:22547502-22547522的基因组坐标内。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的工程化细胞,其中所述细胞包含基因修饰,其中所述基因修饰抑制一种或多种MHC I类蛋白质的表达。

9. 如权利要求8所述的工程化细胞,其中所述抑制一种或多种MHC I类蛋白质表达的基因修饰是B2M序列中的基因修饰,其中所述基因修饰在选自以下的基因组坐标内:

B2M NO:	基因组位置(hg38)
B2M-1	chr15:44711469-44711494
B2M-2	chr15:44711472-44711497
B2M-3	chr15:44711483-4471 1508
B2M-4	chr15:44711486-44711511
B2M-5	chr15:44711487-44711512
B2M-6	chr15:44711512-44711537
B2M-7	chr15:44711513-44711538
B2M-8	chr15:44711534-44711559
B2M-9	chr15:44711568-44711593
B2M-10	chr15:44711573-44711598
B2M-11	chr15:44711576-44711601
B2M-12	chr15:44711466-44711491

B2M NO:	基因组位置(hg38)
B2M-13	chr15:44711522-44711547
B2M-14	chr15:44711544-44711569
B2M-15	chr15:44711559-44711584
B2M-16	chr15:44711565-44711590
B2M-17	chr15:44711599-44711624
B2M-18	chr15:44711611-44711636
B2M-19	chr15:44715412-44715437
B2M-20	chr15:44715440-44715465
B2M-21	chr15:44715473-44715498
B2M-22	chr15:44715474-44715499
B2M-23	chr15:44715515-44715540
B2M-24	chr15:44715535-44715560
B2M-25	chr15:44715562-44715587
B2M-26	chr15:44715567-44715592
B2M-27	chr15:44715672-44715697
B2M-28	chr15:44715673-44715698
B2M-29	chr15:44715674-44715699
B2M-30	chr15:44715410-44715435
B2M-31	chr15:44715411-44715436
B2M-32	chr15:44715419-44715444
B2M-33	chr15:44715430-44715455
B2M-34	chr15:44715457-44715482
B2M-35	chr15:44715483-44715508
B2M-36	chr15:44715511-44715536
B2M-37	chr15:44715515-44715540
B2M-38	chr15:44715629-44715654
B2M-39	chr15:44715630-44715655
B2M-40	chr15:44715631-44715656
B2M-41	chr15:44715632-44715657
B2M-42	chr15:44715653-44715678
B2M-43	chr15:44715657-44715682
B2M-44	chr15:44715666-44715691
B2M-45	chr15:44715685-44715710
B2M-46	chr15:44715686-44715711
B2M-47	chr15:44716326-44716351
B2M-48	chr15:44716329-44716354
B2M-49	chr15:44716313-44716338
B2M-50	chr15:44717599-44717624
B2M-51	chr15:44717604-44717629
B2M-52	chr15:44717681-44717706

B2M NO:	基因组位置(hg38)
B2M-53	chr15:44717682-44717707
B2M-54	chr15:44717702-44717727
B2M-55	chr15:44717764-44717789
B2M-56	chr15:44717776-44717801
B2M-57	chr15:44717786-44717811
B2M-58	chr15:44717789-44717814
B2M-59	chr15:44717790-44717815
B2M-60	chr15:44717794-44717819
B2M-61	chr15:44717805-44717830
B2M-62	chr15:44717808-44717833
B2M-63	chr15:44717809-44717834
B2M-64	chr15:44717810-44717835
B2M-65	chr15:44717846-44717871
B2M-66	chr15:44717945-44717970
B2M-67	chr15:44717946-44717971
B2M-68	chr15:44717947-44717972
B2M-69	chr15:44717948-44717973
B2M-70	chr15:44717973-44717998
B2M-71	chr15:44717981-44718006
B2M-72	chr15:44718056-44718081
B2M-73	chr15:44718061-44718086
B2M-74	chr15:44718067-44718092
B2M-75	chr15:44718076-44718101
B2M-76	chr15:44717589-44717614
B2M-77	chr15:44717620-44717645
B2M-78	chr15:44717642-44717667
B2M-79	chr15:44717771-44717796
B2M-80	chr15:44717800-44717825
B2M-81	chr15:44717859-44717884
B2M-82	chr15:44717947-44717972
B2M-83	chr15:44718119-44718144

10. 如权利要求8所述的工程化细胞,其中所述抑制一种或多种MHC I类蛋白质表达的基因修饰是HLA-A序列中的基因修饰,并且任选地其中所述基因修饰在选自以下的基因组坐标内:chr6:29942854至chr6:29942913和chr6:29943518至chr6:29943619,任选地选自以下的基因组坐标:chr6:29942864-29942884;chr6:29942868-29942888;chr6:29942876-29942896;chr6:29942877-29942897;chr6:29942883-29942903;chr6:29943126-29943146;chr6:29943528-29943548;chr6:29943529-29943549;chr6:29943530-29943550;chr6:29943537-29943557;chr6:29943549-29943569;chr6:29943589-29943609;和chr6:29944026-29944046。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的工程化细胞,其中所述细胞包含基因修饰,其中所述基因修饰抑制一种或多种MHC II类蛋白质的表达。

12. 如权利要求11所述的工程化细胞,其中所述抑制一种或多种MHC II类蛋白质表达的基因修饰是CIITA序列中的基因修饰,其中所述基因修饰在选自以下的基因组坐标内:

chr:16:10902171-10923242,任选地,chr16:10902662-10923285、chr16:10906542-10923285或chr16:10906542-10908121,任选地chr16:10908132-10908152、chr16:10908131-10908151、chr16:10916456-10916476、chr16:10918504-10918524、chr16:10909022-10909042、chr16:10918512-10918532、chr16:10918511-10918531、chr16:10895742-10895762、chr16:10916362-10916382、chr16:10916455-10916475、chr16:10909172-10909192、chr16:10906492-10906512、chr16:10909006-10909026、chr16:10922478-10922498、chr16:10895747-10895767、chr16:10916348-10916368、chr16:10910186-10910206、chr16:10906481-10906501、chr16:10909007-10909027、chr16:10895410-10895430和chr16:10908130-10908150;任选地chr16:10918504-10918524、chr16:10923218-10923238、chr16:10923219-10923239、chr16:10923221-10923241、chr16:10906486-10906506、chr16:10906485-10906505、chr16:10903873-10903893、chr16:10909172-10909192、chr16:10918423-10918443、chr16:10916362-10916382、chr16:10916450-10916470、chr16:10922153-10922173、chr16:10923222-10923242、chr16:10910176-10910196、chr16:10895742-10895762、chr16:10916449-10916469、chr16:10923214-10923234、chr16:10906492-10906512和chr16:10906487-1090650;或任选地chr16:10916432-10916452、chr16:10922444-10922464、chr16:10907924-10907944、chr16:10906985-10907005、chr16:10908073-10908093、chr16:10907433-10907453、chr16:10907979-10907999、chr16:10907139-10907159、chr16:10922435-10922455、chr16:10907384-10907404、chr16:10907434-10907454、chr16:10907119-10907139、chr16:10907539-10907559、chr16:10907810-10907830、chr16:10907315-10907335、chr16:10916426-10916446、chr16:10909138-10909158、chr16:10908101-10908121、chr16:10907790-10907810、chr16:10907787-10907807、chr16:10907454-10907474、chr16:10895702-10895722、chr16:10902729-10902749、chr16:10918492-10918512、chr16:10907932-10907952、chr16:10907623-10907643、chr16:10907461-10907481、chr16:10902723-10902743、chr16:10907622-10907642、chr16:10922441-10922461、chr16:10902662-10902682、chr16:10915626-10915646、chr16:10915592-10915612、chr16:10907385-10907405、chr16:10907030-10907050、chr16:10907935-10907955、chr16:10906853-10906873、chr16:10906757-10906777、chr16:10907730-10907750和chr16:10895302-10895322。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的工程化细胞,其中所述细胞的TIM3蛋白的细胞表面表达减少,或者其中所述细胞的TIM3蛋白的细胞表面表达减少并且TRAC蛋白或TRBC蛋白的细胞表面表达减少。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的工程化细胞,所述工程化细胞包含在人类2B4/CD244序列中在chr1:160830160-160862887的基因组坐标内的基因修饰。

15. 如权利要求14所述的工程化细胞,其中所述2B4/CD244中的基因修饰在选自以下的基因组坐标内:

2B4 NO	基因组坐标(hg38)
2B4-1	chr1:160841611-160841631
2B4-2	chr1:160841865-160841885
2B4-3	chr1:160862624-160862644
2B4-4	chr1:160862671-160862691

2B4 NO	基因组坐标(hg38)
2B4-5	chr1:160841622-160841642
2B4-6	chr1:160841819-160841839
2B4-7	chr1:160841823-160841843
2B4-8	chr1:160841717-160841737
2B4-9	chr1:160841859-160841879
2B4-10	chr1:160841806-160841826
2B4-11	chr1:160841834-160841854
2B4-12	chr1:160841780-160841800
2B4-13	chr1:160841713-160841733
2B4-14	chr1:160841631-160841651
2B4-15	chr1:160841704-160841724
2B4-16	chr1:160841584-160841604
2B4-17	chr1:160841679-160841699
2B4-18	chr1:160841874-160841894
2B4-19	chr1:160841750-160841770
2B4-20	chr1:160841577-160841597
2B4-21	chr1:160841459-160841479
2B4-22	chr1:160841466-160841486
2B4-23	chr1:160841461-160841481
2B4-24	chr1:160841460-160841480
2B4-25	chr1:160841360-160841380
2B4-26	chr1:160841304-160841324
2B4-27	chr1:160841195-160841215
2B4-28	chr1:160841305-160841325

或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:2B4-1至2B4-5:chr1:160841611-160841631、chr1:160841865-160841885、chr1:160862624-160862644、chr1:160862671-160862691和chr1:160841622-160841642;或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:2B4-1和2B4-2:chr1:160841611-160841631和chr1:160841865-160841885;或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:2B4-3、2B4-4、2B4-10和2B4-17:chr1:160862624-160862644、chr1:160862671-160862691、chr1:160841806-160841826和chr1:160841679-160841699。

16.如权利要求1-15中任一项所述的工程化细胞,所述工程化细胞包含在人类LAG3序列中在chr12:6772483-6778455的基因组坐标内的基因修饰。

17.如权利要求16所述的工程化细胞,其中所述LAG3中的基因修饰在选自以下的基因组坐标内:

LAG 3 NO	基因组坐标(hg38)
LAG3-1	chr12:6773938-6773958
LAG3-2	chr12:6774678-6774698
LAG3-3	chr12:6772894-6772914
LAG3-4	chr12:6774816-6774836
LAG3-5	chr12:6774742-6774762
LAG3-6	chr12:6775380-6775400
LAG3-7	chr12:6774727-6774747
LAG3-8	chr12:6774732-6774752
LAG3-9	chr12:6777435-6777455
LAG3-10	chr12:6774771-6774791
LAG3-11	chr12:6772909-6772929
LAG3-12	chr12:6774735-6774755
LAG3-13	chr12:6773783-6773803
LAG3-14	chr12:6775292-6775312
LAG3-15	chr12:6777433-6777453
LAG3-16	chr12:6778268-6778288
LAG3-17	chr12:6775444-6775464
LAG3-24	chr12:6777783-6777803
LAG3-26	chr12:6777784-6777804
LAG3-41	chr12:6778252-6778272
LAG3-59	chr12:6777325-6777345
LAG3-83	chr12:6777329-6777349

或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:LAG3-1至LAG3-15:chr12:6773938-6773958、chr12:6774678-6774698、chr12:6772894-6772914、chr12:6774816-6774836、chr12:6774742-6774762、chr12:6775380-6775400、chr12:6774727-6774747、chr12:6774732-6774752、chr12:6777435-6777455、chr12:6774771-6774791、chr12:6772909-6772929、chr12:6774735-6774755、chr12:6773783-6773803、chr12:6775292-6775312和chr12:6777433-6777453;或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:LAG3-1至LAG3-11:chr12:6773938-6773958、chr12:6774678-6774698、chr12:6772894-6772914、and chr12:6774816-6774836、chr12:6774742-6774762、chr12:6775380-6775400、chr12:6774727-6774747、chr12:6774732-6774752、chr12:6777435-6777455、chr12:6774771-6774791和chr12:6772909-6772929;或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:LAG3-1至LAG3-4:chr12:6773938-6773958、chr12:6774678-6774698、chr12:6772894-6772914和chr12:6774816-6774836;或

选自由以下靶向的那些的基因组坐标:LAG3-1、LAG3-4、LAG3-5和LAG3-9:chr12:6773938-6773958、chr12:6774816-6774836、chr12:6774742-6774762和chr12:6777435-6777455。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的工程化细胞,所述工程化细胞包含人类PD-1序列中在chr2:241849881-241858908的基因组坐标内的基因修饰。

19. 如权利要求18所述的工程化细胞,其中所述基因修饰包括以下内的至少一个核苷酸的修饰:选自以下的基因组坐标:

PD1 NO.	基因组坐标(hg38)
PD1-29	chr2:241852703-241852723
PD1-43	chr2:241858807-241858827
PD1-5	chr2:241858789-241858809
PD1-6	chr2:241858788-241858808
PD1-8	chr2:241858755-241858775
PD1-11	chr2:241852919-241852939

PD1 NO.	基因组坐标(hg38)
PD1-12	chr2:241852915-241852935
PD1-22	chr2:241852755-241852775
PD1-23	chr2:241852751-241852771
PD1-24	chr2:241852750-241852770
PD1-36	chr2:241852264-241852284
PD1-57	chr2:241852201-241852221
PD1-58	chr2:241852749-241852769
PD1-17	chr2:241852821-241852841
PD1-38	chr2:241852265-241852285
PD1-56	chr2:241851221-241851241
PD1-41	chr2:241852188-241852208

或

分别选自以下的基因组坐标:chr2:241852919-241852939、chr2:241852915-241852935、chr2:241852750-241852770、chr2:241852264-241852284、chr2:241852265-241852285、chr2:241858807-241858827、chr2:241852201-241852221、chr2:241858789-241858809、chr2:241858788-241858808、chr2:241858755-241858775、chr2:241852755-241852775、chr2:241852751-241852771和chr2:241852703-241852723;或

分别选自以下的基因组坐标:chr2:241858788-241858808、chr2:241858755-241858775、chr2:241852919-241852939、chr2:241852915-241852935、chr2:241852751-241852771、chr2:241858807-241858827和chr2:241852703-241852723;或

分别选自以下的基因组坐标:chr2:241858789-241858809、chr2:241852919-241852939、chr2:241852915-241852935、chr2:241852755-241852775、chr2:241852751-241852771和chr2:241858807-241858827;或

分别选自以下的基因组坐标:chr2:241858788-241858808、chr2:241858755-241858775、chr2:241852751-241852771和chr2:241852703-241852723;或

分别选自以下的基因组坐标:chr2:241858788-241858808和chr2:241852703-241852723;或

分别选自以下的基因组坐标:chr2:241858788-241858808、chr2:241852751-241852771、chr2:241852703-241852723、chr2:241852188-241852208和chr2:241852201-

241852221;或

分别选自以下的基因组坐标:chr2:241858788-241858808、chr2:241852703-241852723和chr2:241852201-241852221;或

chr2:241858807-241858827的基因组坐标。

20.如权利要求1-19中任一项所述的工程化细胞,其中所述基因修饰包括插入/缺失。

21.如权利要求1-20中任一项所述的工程化细胞,其中所述基因修饰包括插入异源编码序列。

22.如权利要求1-19和21中任一项所述的工程化细胞,其中所述基因修饰包括取代,任选地其中所述取代包括C至T取代或A至G取代。

23.如权利要求1-22中任一项所述的工程化细胞,其中所述基因修饰导致核酸序列的改变,其阻止具有全长蛋白质的氨基酸序列的全长蛋白质在基因修饰前的翻译,任选地其中所述基因修饰导致所述核酸序列的改变,其在所述全长蛋白质的编码序列中产生过早终止密码子,或导致来自基因组基因座的前mRNA的剪接改变。

24.如权利要求1-23中任一项所述的工程化细胞,其中所述细胞包含编码在所述工程化细胞的表面上表达的靶向受体的外源核酸,任选地其中所述靶向受体是CAR或TCR。

25.如权利要求1-24中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是T细胞。

26.一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1-25中任一项所述的工程化细胞。

27.一种细胞群体,所述细胞群体包含权利要求1-25中任一项所述的工程化细胞。

28.一种将权利要求1-27中任一项所述的工程化细胞、细胞群体或药物组合物施用于有需要的受试者的方法。

29.一种将权利要求1-27中任一项所述的工程化细胞、细胞群体或药物组合物作为过继性细胞转移(ACT)疗法施用于受试者的方法。

30.一种如权利要求1-27中任一项所述的工程化细胞、细胞群体或药物组合物,其用作ACT疗法。

31.一种与TIM3序列特异性杂交的TIM3引导RNA,所述TIM3序列包含选自以下的核苷酸序列:

a.包含选自SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88的核苷酸序列的引导序列;

b.包含选自SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88的序列的核苷酸序列的至少17、18、19或20个连续核苷酸的核苷酸序列的引导序列;

c.包含与选自SEQ ID No:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88的核苷酸序列至少95%同一或至少90%同一的核苷酸序列的引导序列;

d.包含选自SEQ ID NO:1-4、6-15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86和88的核苷酸序列的引导序列;

e.包含选自SEQ ID No:1-5、7、8、12-15、23、26、32、56、59、63、66、75和87的核苷酸序列的引导序列;

f.包含选自SEQ ID NO:2、4、15、23、56、59、63、75和87的核苷酸序列的引导序列;

- g. 包含选自SEQ ID NO:1-4的核苷酸序列的引导序列;
- h. 包含选自SEQ ID NO:2、4和15的核苷酸序列的引导序列;
- i. 包含选自SEQ ID NO:2、4、15、63和87的核苷酸序列的引导序列;
- j. 包含选自SEQ ID NO:2和15的核苷酸序列的引导序列;
- k. 包含选自SEQ ID NO:63和87的核苷酸序列的引导序列;和
- l. 包含核苷酸序列SEQ ID NO:15的引导序列。

32. 一种TIM3引导RNA, 所述TIM3引导RNA包含将经RNA引导的DNA结合剂导引至以下基因组坐标内的染色体位置的引导序列: 选自由SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88所靶向的基因组坐标; 或选自由SEQ ID NO:1-4、6-15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86和88所靶向的基因组坐标; 或选自由SEQ ID NO:1-5、7、8、12-15、23、26、32、56、59、63、66、75和87所靶向的基因组坐标; 或选自由SEQ ID NO:2、4、15、23、56、59、63、75和87所靶向的基因组坐标; 或选自由SEQ ID NO:1-4所靶向的基因组坐标; 或选自由SEQ ID NO:2、4和15所靶向的基因组坐标; 或选自由SEQ ID NO:2、4、15、63和87所靶向的基因组坐标; 或选自由SEQ ID NO:2和15所靶向的基因组坐标; 或由SEQ ID NO:63和87所靶向的基因组坐标; 或由SEQ ID NO:15所靶向的基因组坐标。

33. 如权利要求31或32所述的引导RNA, 其中所述引导RNA是单引导RNA(sgRNA)。

34. 如权利要求33所述的引导RNA, 所述引导RNA还包含所述引导序列的3'的核苷酸序列SEQ ID NO:201, 其中所述引导RNA包含5'端修饰或3'端修饰。

35. 如权利要求33所述的引导RNA, 所述引导RNA还包含5'端修饰或3'端修饰和gRNA的保守部分, 所述保守部分包含以下中的一者或多者:

- A. 缩短的发夹1区或相对于SEQ ID NO:201经取代且任选地缩短的发夹1区, 其中
 - 1. 以下核苷酸对中的至少一者在所述经取代且任选地缩短的发夹1中被Watson-Crick配对对核苷酸取代: H1-1和H1-12、H1-2和H1-11、H1-3和H1-10、或H1-4和H1-9, 并且所述发夹1区任选地缺乏
 - a. H1-5至H1-8中的任一者或两者,
 - b. 以下核苷酸对中的一者、两者或三者: H1-1和H1-12、H1-2和H1-11、H1-3和H1-10、和H1-4和H1-9, 或
 - c. 发夹1区的1-8个核苷酸; 或
 - 2. 所述缩短的发夹1区缺乏4-8个核苷酸, 优选4-6个核苷酸; 并且
 - a. 位置H1-1、H1-2或H1-3中的一者或多者缺失或相对于SEQ ID NO:201被取代; 或
 - b. 位置H1-6至H1-10中的一者或多者相对于SEQ ID NO:201被取代; 或
 - 3. 所述缩短的发夹1区缺乏5-10个核苷酸, 优选5-6个核苷酸, 并且位置N18、H1-12或n中的一者或多者相对于SEQ ID NO:201被取代; 或
- B. 缩短的上茎区, 其中所述缩短的上茎区缺乏1-6个核苷酸并且其中所述缩短的上茎区的6、7、8、9、10或11个核苷酸相对于SEQ ID NO:201包括少于或等于4个取代; 或
- C. 在LS6、LS7、US3、US10、B3、N7、N15、N17、H2-2和H2-14中的任一者或多者处相对于SEQ ID NO:201的取代, 其中取代基核苷酸既不是嘧啶后接腺嘌呤, 也不是腺嘌呤前接嘧啶; 或
- D. 上茎区, 其中上茎修饰包含所述上茎区中US1-US12中的任一者或多者相对于SEQ ID NO:201的修饰。

36. 如权利要求33或34所述的引导RNA,其中所述引导RNA根据mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO:300)的模式进行修饰,其中“N”可以是任何天然或非天然核苷酸,m是2'-O-甲基修饰的核苷酸,并且*是核苷酸残基之间的硫代磷酸酯键联;并且其中N统称为任何前述权利要求所述的引导序列的核苷酸序列,任选地其中每个N独立地是任何天然或非天然核苷酸并且所述引导序列将Cas9靶向所述TIM3基因。

37. 如权利要求33-36中任一项所述的引导RNA,其中所述引导RNA包含修饰。

38. 如权利要求37所述的引导RNA,其中所述修饰包括(i) 2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰核苷酸;(ii) 2'-F修饰核苷酸,(iii) 核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键,(iv) 在所述引导RNA的5'端的前五个核苷酸中的一者或多者处的修饰,(v) 在所述引导RNA的3'端的后五个核苷酸中的一者或多者处的修饰,(vi) 在所述引导RNA的前四个核苷酸各自之间的PS键,(vii) 在所述引导RNA的后四个核苷酸各自之间的PS键,(viii) 在所述引导RNA的5'端的前三个核苷酸中的每一者处的2'-O-Me修饰核苷酸,(ix) 在所述引导RNA的3'端的后三个核苷酸中的每一者处的2'-O-Me修饰核苷酸,或(i)-(ix)中的一者或多者的组合。

39. 一种组合物,所述组合物包含权利要求31-38中任一项所述的引导RNA和经RNA引导的DNA结合剂,其中所述经RNA引导的DNA结合剂是多肽RNA引导的DNA结合剂或编码经RNA引导的DNA结合剂多肽的核酸,任选地所述经RNA引导的DNA结合剂是Cas9核酸酶。

40. 如权利要求31-38中任一项所述的引导RNA或如权利要求39所述的组合物,其中所述组合物还包含药学上可接受的赋形剂。

41. 如权利要求31-40中任一项所述的引导RNA或组合物,其中所述引导RNA与脂质纳米粒子(LNP)相缔合。

42. 一种在细胞内对TIM3序列进行基因修饰的方法,所述方法包括使所述细胞与权利要求31-41中任一项所述的引导RNA或组合物接触。

43. 如权利要求42所述的方法,所述方法还包括在TCR序列中进行基因修饰以抑制TCR基因的表达。

44. 一种制备用于免疫疗法的细胞群体的方法,所述方法包括:

a. 用权利要求31-41中任一项所述的TIM3引导RNA或组合物对所述群体细胞中的TIM3序列进行基因修饰;

b. 对所述群体细胞中的TCR序列进行基因修饰,以减少所述群体细胞的表面上TCR蛋白的表达;

c. 扩增培养中的所述细胞群体。

45. 一种通过如权利要求42-44中任一项所述的方法制得的细胞群体。

46. 如权利要求45所述的细胞群体,其中所述细胞群体是离体改变的。

47. 一种将如权利要求45或46所述的细胞群体施用于有需要的受试者的方法。

48. 一种将如权利要求45或46所述的细胞群体作为过继性细胞转移(ACT)疗法施用于受试者的方法。

49. 一种如权利要求45或46所述的细胞群体,所述细胞群体用作ACT疗法。

50. 一种包含TIM3基因的基因修饰的细胞群体,其中所述群体中至少40%、45%、50%、

55%、60%、65%，优选至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。

51. 如权利要求50所述的细胞群体，其中TIM3的表达与例如其中所述TIM3基因未经修饰的合适对照相比降低至少40%、45%、50%、55%、60%、65%，优选至少70%、75%、80%、85%、90%、95%，或降至低于测定法的检测限。

52. 如权利要求50或51所述的细胞群体，其中所述群体中至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的细胞包含选自所述内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。

用于免疫疗法的T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域3 (TIM3) 组合物和方法

[0001] 本申请根据35U.S.C.119(e) 要求2021年2月8日提交的美国临时申请第63/147, 221号的权益,所述临时申请的内容通过引用整体并入本文。

[0002] 本申请与电子格式的序列列表一起提交。所述序列列表以命名为“01155-0041-00PCT_Seq_List_ST25.txt”的文件提供,所述文件创建于2022年2月3日,大小为133,120字节。所述序列列表的电子格式的信息通过引用整体并入本文。

[0003] 引言和发明内容

[0004] T细胞耗竭是一个广义的术语,用于描述T细胞对慢性抗原刺激的反应。这种情况最早是在慢性病毒感染的情形下观察到的,但也在对肿瘤的免疫反应中进行过研究。T细胞耗竭机制的特征和特性可能对检查点阻断和过继性T细胞转移疗法成功具有至关重要的影响。

[0005] T细胞耗竭是由于长期抗原刺激导致的效应功能逐渐丧失,是慢性感染和癌症的特性。除了持续的抗原刺激外,微环境中的抗原呈递细胞和细胞因子也会导致这种耗竭表型。因此,T细胞耗竭是T细胞功能失调的一种状态,在这种状态下,T细胞的效应功能不良并持续表达抑制性受体。这阻止了对感染或肿瘤的最佳控制。此外,耗竭T细胞的转录状态不同于功能性效应细胞或记忆T细胞的转录状态。治疗性治疗有可能挽救耗竭的T细胞 (Goldberg, M.V. 和 Drake, C.G. 2011; Wherry, E.J. 和 Kurachi M., 2015)。

[0006] 耗竭的T细胞通常表达协同抑制受体如程序性细胞死亡1 (PDCD1或PD-1)。基因产物作为免疫检查点系统的一个组成部分。通过阻断这些受体可逆转T细胞耗竭。

[0007] TIM-3 (T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域3) 是一种I型跨膜蛋白并且充当T细胞中的免疫检查点。在慢性感染期间,T细胞表达TIM-3以及其他免疫检查点基因,所述免疫检查点基因下调T细胞的免疫反应。TIM-3与癌发生有关。在胃癌、结直肠癌、肝癌和胰腺癌患者中,TIM-3肿瘤表达与肿瘤侵袭、存活率降低和转移相关。在许多免疫细胞类型中都观察到了TIM-3蛋白的表达,包括Th1、Th17、自然杀伤(NK) 和自然杀伤T(NKT) 细胞以及调控性T细胞(Treg)。TIM-3可在抗原呈递细胞(APC) 上表达,在此其与PD-1共同表达。TIM-3已表明可与半乳糖凝集素-9结合,所述半乳糖凝集素-9通过钙-钙蛋白酶-半胱天冬酶-1途径导致CD4⁺和CD8⁺细胞凋亡。TIM-3与半乳糖凝集素-9结合使Y265细胞内TIM-3结构域磷酸化。此外,在小鼠的肿瘤浸润T细胞中也观察到表达TIM-3的细胞。TIM-3可直接抑制Th1介导的自身免疫,并且已证明它可通过诱导髓源性抑制细胞(MDSC) 的扩增而间接促进免疫抑制,其机制不明。阻断TIM-3可增加淋巴细胞产生IFN γ ,但这种作用的分子基础未知。

[0008] 本文提供了例如用于制备细胞的方法中的化合物和组合物,所述细胞在TIM3序列(例如基因组基因座)中具有例如使用CRISPR/Cas系统产生的基因修饰(例如插入、缺失、取代);以及在TIM3序列中具有基因修饰的细胞及其在各种方法中的用途,例如以促进免疫反应,例如在免疫肿瘤学和感染性疾病中。具有可降低TIM3表达的TIM3基因修饰的细胞可包括对其他基因组序列的基因修饰,所述基因组序列包括T细胞受体(TCR) 基因座,例如TRAC或TRBC基因座,以减少TCR表达;减少MHC I类分子表达的基因组基因座,例如B2M和HLA-A基

因座;减少MHC II类分子表达的基因组基因座,例如CIITA基因座;以及检查点抑制剂基因座,例如CD244(2B4)基因座、LAG3基因座和PD-1基因座。本公开涉及包括具有TIM3序列和任选地如本文所提供的其他基因组基因座的基因修饰的细胞的细胞群体。所述细胞可用于过继性T细胞转移疗法。本公开涉及具有TIM3序列的基因修饰的细胞用于疗法(例如癌症疗法和免疫疗法)的组合物和用途。本公开涉及并提供可用于细胞基因组编辑的gRNA分子、CRISPR系统、细胞和方法。

[0009] 本文提供了一种工程化细胞,所述工程化细胞包含在人类TIM3序列中在chr5:157085832-157109044基因组坐标内的基因修饰。其他实施方案通篇提供并在权利要求书和附图中描述。

[0010] 还公开了前述实施方案中任一项的细胞的组合物或制剂用于制备用以治疗受试者的药物的用途。所述受试者可以是人类或动物(例如人类或非人类动物,例如食蟹猴)。优选地所述受试者是人类。

[0011] 还公开了用于产生TIM3基因序列基因修饰(例如插入、取代或缺失)的任何前述组合物或制剂。在某些实施方案中,所述序列内的基因修饰导致核酸序列的改变,其阻止全长蛋白质在基因组基因座的基因修饰之前的翻译,例如,通过形成移码或无义突变,使得翻译过早终止。所述基因修饰可包括剪接位点(即剪接受体位点或剪接供体位点)的插入、取代或缺失,因而异常剪接导致移码突变、无义突变或截短mRNA,使得翻译过早终止。基因修饰也可破坏编码蛋白质的翻译或折叠,导致翻译过早终止。

[0012] 本文提供了用于在序列内产生基因修饰的组合物,所述基因修饰优选导致所述序列的蛋白质表达,例如蛋白质的细胞表面表达的减少。

[0013] 在另一方面,本发明提供了一种向受试者提供免疫疗法的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如本文所述的细胞,例如,前述细胞方面和实施方案中任一者的细胞。

[0014] 在所述方法的实施方案中,所述方法包括在施用如本文所述的细胞或细胞群体之前进行淋巴清除。在所述方法的实施方案中,所述方法包括在向受试者施用有效量的如本文所述的细胞,例如,前述细胞方面和实施方案中任一者的细胞之前,施用淋巴清除剂或免疫抑制剂。在另一方面,本发明提供了一种制备细胞(例如细胞群体)的方法。

[0015] 免疫疗法是通过激活或抑制免疫系统来治疗疾病。旨在激发或扩大免疫反应的免疫疗法被归类为激活免疫疗法。基于细胞的免疫疗法已被证明可有效治疗一些癌症。免疫效应细胞如淋巴细胞、巨噬细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)可经编程以对肿瘤细胞表面上表达的异常抗原做出反应。因此,癌症免疫疗法允许免疫系统的组成部分摧毁肿瘤或其他癌细胞。

[0016] 免疫疗法也可用于治疗慢性感染性疾病,例如乙型和丙型肝炎病毒感染、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染、结核病感染和疟疾感染。包含靶向受体如转基因TCR或CAR的免疫效应细胞可用于免疫疗法,例如本文所述的免疫疗法。

[0017] 在另一方面,本发明提供了一种制备用于免疫疗法的细胞(例如细胞群体)的方法,所述方法包括:(a)通过减少或消除T细胞受体(TCR)的一个或多个或所有组分的表达来修饰细胞,例如,通过向所述细胞中引入gRNA分子(如本文所述),或多于一个如本文所公开的gRNA分子;以及(b)扩增所述细胞。本发明的细胞适合进一步工程化,例如通过引入编码

靶向受体的异源序列,例如介导TCR/CD3 ζ 链信号传导的多肽。在一些实施方案中,所述多肽是选自非内源TCR或CAR序列的靶向受体。在一些实施方案中,所述多肽是野生型或变异型TCR。本发明的细胞也可通过引入编码替代抗原结合部分的异源序列,例如通过引入编码替代(非内源性)T细胞受体(例如经设计以靶向特定蛋白质的嵌合抗原受体(CAR))的异源序列,而适合进行进一步工程化。CAR也称为嵌合免疫受体、嵌合T细胞受体或人工T细胞受体)。

[0018] 在另一方面,本发明提供了一种治疗受试者的方法,所述方法包括施用通过本文所述的制备细胞的方法,例如任何上述制备细胞的方法的方面和实施方案的方法而制备的细胞(例如,细胞群体)。

[0019] 附图简要说明

[0020] 图1显示了如通过下一代(NGS)测序测定的来自4个供体(“826”、“112”、“262”和“315”)中每个供体的样品的编辑程度。

[0021] 图2A和图2B显示了如通过流式细胞术测定的再刺激T细胞中TIM3蛋白表达的程度。y轴显示TIM3阳性细胞的百分比,其中误差条显示此测量结果的标准差(SD)。图2A显示了来自供体“262”和“315”的样品的结果。图2B显示了来自供体“112”和“826”的样品的结果。

[0022] 图3A显示了如通过NGS测序测定的T细胞编辑程度。图3B显示了如通过流式细胞术测定的再刺激TIM3+细胞百分比,其中误差条显示此测量结果的SEM。

[0023] 图4显示了在T细胞中用TIM3引导RNA进行编辑的剂量反应曲线。

[0024] 图5A显示了表达CD8+WT1 TCR的工程化细胞中的干细胞记忆T细胞(Tscm)。

[0025] 图5B显示了表达CD8+WT1 TCR的工程化细胞中的中心记忆T细胞(Tcm)。

[0026] 图5C显示了表达CD8+WT1 TCR的工程化细胞中的效应记忆T细胞(Tem)

[0027] 图6A显示了用第一组引物经由NGS测定的工程化T细胞中第三次连续编辑的插入/缺失频率。

[0028] 图6B显示了用不同的第二组引物经由NGS测定的工程化T细胞中第三次连续编辑的插入/缺失频率。

[0029] 图7A-7I显示了表达WT1的AML细胞暴露于工程化T细胞后发出红色和绿色荧光的平均图像面积。图7A、图7B和图7C分别显示了使用5:1的E:T用AML细胞系pAML1、pAML2或pAML3进行的测定。图7D、图7E和图7F分别显示了使用1:1的E:T用AML细胞系pAML1、pAML2或pAML3进行的测定。图7G、图7F和图7I分别显示了使用1:5的E:T用AML细胞系pAML1、pAML2或pAML3进行的测定。

具体实施方式

[0030] 现将详细参考本发明的某些实施方案,其实施例在附图中加以说明。尽管本教导内容结合各种实施方案加以描述,但无意将本教导内容局限于那些实施方案。相反,如本领域技术人员所理解,本教导内容涵盖各种替代方案、修改和等同方案。

[0031] 在详细描述本教导内容之前,应理解,本公开不限于特定组合物或方法步骤,因而可加以改变。应注意,除非上下文另外明确规定,否则如本说明书和所附权利要求中所用,单数形式“一(a/an)”和“所述(the)”包括多个参考物。因此,例如,提及“缀合物(a

conjugate)”包括多个缀合物并且提及“细胞(a cell)”包括多个细胞(例如细胞群体)等等。

[0032] 数值范围包括限定所述范围的数字。考虑到有效数字和与测量相关的误差,实测值和可测量值应理解为近似值。在一些实施方案中,细胞群体是指至少 10^3 、 10^4 、 10^5 或 10^6 个细胞,优选 10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 或 10^8 个细胞的群体。

[0033] “包含(comprise/comprises/comprising)”、“含有(contain/contains/containing)”和“包括(include/includes/including)”的使用不旨在具限制性。应理解,前述一般描述与详细描述仅为示例性和解释性的而并不限制教导内容。除非本说明书中明确指出,否则本说明书中叙述“包含”各种组分的实施方案也考虑为“由所叙述组分组成”或“基本上由所叙述组分组成”;本说明书中叙述“由各种组分组成”的实施方案也考虑为“包含”所叙述组分或“基本上由所叙述组分组成”;并且本说明书中叙述“基本上由各种组分组成”的实施方案也考虑为“由所叙述组分组成”或“包含”所叙述组分(这种互换性并不适用于这些术语在权利要求书中的使用)。

[0034] 除非上下文另外明确说明,否则术语“或”在本发明书中以包括性意义使用,即等于“和/或”。

[0035] 术语“约”当在列表前使用时,修饰列表中的每个成员。术语“约”应理解为涵盖技术范围内可容忍的变化或误差,例如,平均值的2个标准差,或用于进行测量的方法的灵敏度。当“约”出现在系列的第一个值之前时,其可以理解为对系列中每个值进行修饰。

[0036] 范围应理解为包括范围末端的数字以及两者之间的所有逻辑值。例如,5-10个核苷酸应理解为5、6、7、8、9或10个核苷酸,而5-10%应理解为包含5%至10%的所有可能值。

[0037] 20个核苷酸序列中的至少17个核苷酸应理解为包括所提供序列的17、18、19或20个核苷酸,从而提供了一个上限,即使没有具体提供上限,也可以清楚地理解。类似地,至多3个核苷酸应理解为涵盖0、1、2或3个核苷酸,从而提供了一个下限,即使没有具体提供下限。当“至少”、“至多”或其他类似语言修饰一个数字时,其可理解为修饰系列中的每个数字。

[0038] 如本文所用,“不大于”或“小于”应理解为与短语和逻辑下限值或整数相邻的值,根据上下文逻辑,至零。例如,“不超过2个核苷酸碱基对”的双链体区域具有2、1或0个核苷酸碱基对。当“不大于”或“小于”出现在一系列数字或一个范围之前时,应理解所述系列或范围中的每个数字都经修饰。

[0039] 如本文所用,范围包括上限和下限。

[0040] 如果本申请中的序列与所标示的登录号或登录号中的位置发生冲突,则以本申请中的序列为准。

[0041] 如果化学名称与结构发生冲突,则以结构为准。

[0042] 如本文所用,“检测分析物”等应理解为进行测定,其中如果分析物存在,则可被检测到,其中分析物的存在量高于测定法的检测水平。

[0043] 如本文所用,应理解,当某一数值的最大量由100%表示时(例如,100%抑制或100%包封),所述值受检测方法的限制。例如,100%抑制可理解为抑制水平低于测定法的检测水平,并且100%包封应理解为在囊泡外检测不到旨在用于包封的物质。

[0044] 本文所用的章节标题仅出于组织目的而不应解释为以任何方式限制所需主题。在

通过引用并入的任何材料与本说明书中所定义的任何术语或本说明书的任何其他表述内容相矛盾的情况下,以本说明书为准。

[0045] I. 定义

[0046] 除非另外说明,否则如本文所用的以下术语和短语旨在具有以下含义:

[0047] “多核苷酸(polynucleotide)”和“核酸(nucleic acid)”在本文中用于指包含含氮杂环碱基或碱基类似物沿主链连接在一起的核苷或核苷类似物的多聚化合物,其包括常规RNA、DNA、混合RNA-DNA和为其类似物的聚合物。核酸“主链(backbone)”可由多个键联构成,其包括糖-磷酸二酯键联、肽-核酸键(“肽核酸”或PNA;PCT第WO 95/32305号)、硫代磷酸酯键联、甲基磷酸酯键联或其组合中的一者或多者。核酸的糖部分可为核糖、脱氧核糖,或具有取代(例如2'甲氧基或2'卤基取代)的类似化合物。RNA可包含一个或多个脱氧核糖核苷酸,例如作为修饰,并且类似地DNA可包含一个或多个核糖核苷酸。含氮碱基可为常规碱基(A、G、C、T、U)、其类似物(例如经修饰的尿苷,例如5-甲氧基尿苷、假尿苷或N1-甲基假尿苷或其他经修饰的尿苷);肌苷;嘌呤或嘧啶的衍生物(例如N⁴-甲基脱氧鸟苷、去氮嘌呤或氮杂嘌呤、去氮嘧啶或氮杂嘧啶、在5位或6位处具有取代基的嘧啶碱基(例如5-甲基胞嘧啶)、在2位、6位或8位处具有取代基的嘌呤碱基、2-氨基-6-甲氨基嘌呤、0⁶-甲基鸟嘌呤、4-巯基-嘧啶、4-氨基-嘧啶、4--二甲基胍-嘧啶和0⁴-烷基-嘧啶;美国专利第5,378,825号和PCT第WO 93/13121号)。对于一般论述,参见The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36, Adams等人编,第11版,1992)。核酸可包括一个或多个“无碱基”残基,其中主链在聚合物位置不包括含氮碱基(美国专利第5,585,481号)。核酸可仅包含常规RNA或DNA糖、碱基和键联,或可包括常规组分与取代(例如具有2'甲氧基取代基的常规核苷,或含有常规核苷与一个或多个核苷类似物的聚合物)。核酸包括“锁核酸”(LNA)、含有一种或多种LNA核苷酸单体的类似物,所述单体具有模拟糖构象的锁定于RNA中的双环呋喃糖单元,其会增强对互补RNA和DNA序列的杂交亲和力(Vester和Wengel, 2004, Biochemistry 43 (42):13233-41)。RNA和DNA具有不同糖部分并且不同之处可为在RNA中存在尿嘧啶或其类似物和DNA中存在胸腺嘧啶或其类似物。

[0048] “引导RNA”、“gRNA”和简称“引导物”可在本文中互换地用于指例如单引导RNA、或crRNA与trRNA(也称为tracrRNA)的组合。crRNA和trRNA可以单一RNA分子(作为单引导RNA, sgRNA)或例如以两个独立RNA链(双引导RNA, dgRNA)形式缔合。“引导RNA”或“gRNA”是指每个类型。trRNA可为天然存在的序列,或具有修饰或变异的trRNA序列。

[0049] 如本文所用,“引导序列”是指引导RNA中与目标序列互补并且用以通过经RNA引导的DNA结合剂将引导RNA导引至目标序列以供结合或修饰(例如裂解)的序列。“引导序列”也可称为“靶向序列”或“间隔序列”。引导序列的长度可为20个碱基对,例如在酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) (即Spy Cas9)和相关Cas9同源物/异种同源物的情况下。较短或较长序列也可用作例如长度为15、16、17、18、19、21、22、23、24或25个核苷酸的引导物。例如,在一些实施方案中,引导序列包含选自SEQ ID NO:1-88的序列的至少17、18、19或20个连续核苷酸。在一些实施方案中,目标序列处于例如基因中或染色体上,并且与引导序列互补。在一些实施方案中,引导序列与其相应目标序列之间的互补性或同一性的程度为至少75%、80%、85%、90%或95%,或为100%。例如,在一些实施方案中,引导序列包含与选自SEQ ID NO:1-88的序列的至少17、18、19或20个连续核苷酸具有至少75%、80%、85%、90%

或95%或100%同一性的序列。在一些实施方案中,引导序列与目标区域可为100%互补或同一。在其他实施方案中,引导序列与目标区域可含有至少一个错配,即不同一或不互补的一个核苷酸,取决于参考序列。例如,引导序列和目标序列可含有1、2、3或4个错配,其中目标序列的总长度为17、18、19、20个核苷酸或更多个核苷酸。在一些实施方案中,引导序列和目标区域可含有1-4个错配,其中引导序列包含至少17、18、19、20个核苷酸或更多个核苷酸。在一些实施方案中,引导序列和目标区域可含有1、2、3或4个错配,其中引导序列包含20个核苷酸。也就是说,引导序列和目标序列可形成具有17、18、19、20个碱基对或更多个碱基对的双链体区域。在某些实施方案中,所述双链体区域可包括1、2、3或4个错配,使得引导链和目标序列不完全互补。例如,引导链和目标序列可在20个核苷酸区域上互补,包括2个错配,使得引导序列和目标序列为90%互补,提供20个碱基对中18个碱基对的双链体区域。

[0050] 经RNA引导的DNA结合剂的目标序列包括基因组DNA的正链与负链(即给定序列和序列的反向互补序列),因为经RNA引导的DNA结合剂的核酸底物为双链核酸。因此,在称引导序列“与目标序列互补”的情况下,应理解,引导序列可导引引导RNA结合至目标序列的有义或反义链(例如反向互补序列)。因此,在一些实施方案中,在引导序列结合目标序列的反向互补序列的情况下,引导序列与目标序列(例如不包括PAM的目标序列)的某些核苷酸具有同一性,不同之处在于在引导序列中U取代T。

[0051] 如本文所用,“经RNA引导的DNA结合剂(RNA-guided DNA-binding agent)”意指具有RNA和DNA结合活性的多肽或多肽复合物,或此类复合物的DNA结合亚基,其中DNA结合活性具有序列特异性并且取决于RNA的序列。示例性的经RNA引导的DNA结合剂包括Cas裂解酶/切口酶和其失活形式(“dCas DNA结合剂”)。如本文所用,“Cas核酸酶”涵盖Cas裂解酶、Cas切口酶和dCas DNA结合剂。dCas DNA结合剂可为包含非功能核苷酸结构域(RuvC或HNH结构域)的死核苷酸。在一些实施方案中,Cas裂解酶或Cas切口酶涵盖经修饰以允许DNA裂解(例如经由与FokI结构域融合)的dCas DNA结合剂。Cas裂解酶/切口酶和dCas DNA结合剂包括III型CRISPR系统的Csm或Cmr复合物、其Cas10、Csm1或Cmr2亚基、I型CRISPR系统的级联复合物、其Cas3亚基和2类Cas核酸酶。如本文所用,“2类Cas核酸酶”为具有经RNA引导的DNA结合活性的单链多肽。2类Cas核酸酶包括2类Cas裂解酶/切口酶(例如H840A、D10A或N863A变体),其进一步具有经RNA引导的DNA裂解酶或切口酶活性,和2类dCas DNA结合剂,其中裂解酶/切口酶活性未活化。2类Cas核酸酶包括例如Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、HF Cas9(例如N497A、R661A、Q695A、Q926A变体)、HypaCas9(例如N692A、M694A、Q695A、H698A变体)、eSPCas9(1.0)(例如K810A、K1003A、R1060A变体)和eSPCas9(1.1)(例如K848A、K1003A、R1060A变体)蛋白质和其修饰。Cpf1蛋白(Zetsche等人,Cell,163:1-13(2015))与Cas9同源并且含有RuvC样核酸酶结构域。Zetsche的Cpf1序列通过引用整体并入。参见例如Zetsche,表S1和表S3。参见例如Makarova等人,Nat Rev Microbiol,13(11):722-36(2015);Shmakov等人,Molecular Cell,60:385-397(2015)。

[0052] 下文提供了Cas9分子的示例核苷酸和多肽序列。用于鉴定编码Cas9多肽序列的替代核苷酸序列(包括替代的天然存在的变体)的方法是本领域已知的。与本文提供的任何Cas9核酸序列、氨基酸序列或编码氨基酸序列的核酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列也是可考虑的。

[0053] Cas9的示例性开放阅读框(SEQ ID NO:112)

[0054]

AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCACC
AACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGU
GCCCUGCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCA
CUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUC
CGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCCG
GCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGAUCUGCUACCUGCA
GGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCU
UCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGGUGGAGGAGGAC
AAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGAC
GAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCACCAUCUACCACCUG
CGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGG
CUGAUCUACCUGGCCCUUGGCCACAUGAUAAGUUCCGGGGC
CACUUCCUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGAC
GUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAG
CUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCC
AAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUG
GAGAACCUGAUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGC
CUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCUGUCCUGGGCCUGACCCCC
AACUUCAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUG
CAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUG
CUGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCC
GCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUG
CGGGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCUGUCCGCCUCC
AUGAUAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUG
CUGAAGGCCCUUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAG

[0055]

GAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUAC
AUCGACGGCGGCCUCCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUC
AAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCU
GGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGA
CCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCACCAGAUCCACCUGGGCG
AGCUGCACGCCAUCCUGCGGGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCU
UCCUGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCGAGAAGAUCUGACC
UUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCCCCUGGCCCGGGGCAAC
UCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUC
ACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCC
GCCAGUCCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAAC
CUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCCCUGCUGUAC
GAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUA
CGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUCCUGUCCGGCGA
GCAGAAGAAGGCCAUUCGUGGACCUGCUGUUAAGACCAACCG
GAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGA
AGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAG
GACCGGUUCAACGCCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUG
AAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAA
CGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUU
CGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACG
CCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGC
GGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUCA
ACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACU
UCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCAUGCAGC
UGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGA
AGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCUGCACGAGCACA
UCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCC
UGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUG
GGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGG

[0056]

GAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAG
CGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUC
CCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCA
GAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGG
ACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCG
ACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGG
ACGACUCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGA
ACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGA
AGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAG
CUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAG
CGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAG
CGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUACCAAGCACGUGGCC
CAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAAC
GACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUC
CAAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUCCAGUUCUACAA
GGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUA
CCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAGUACCC
CAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGU
ACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGAUC
GGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUG
AACUUCUUCAAGACCGAGAUACCCUGGCCAACGGCGAGAU
CGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAG
AUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAA
GGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAUUCGUGAAGAAGACCG
AGGUGCAGACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCA
AGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCCGGAAGAAGGACUGG
GACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCACCGUGGCC
UACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUC
CAAGAAGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCA
UCAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUCC

UGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUC
AUCAAGCUGCCCAAGUACUCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGC
CGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGC
AACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUCCUGUAC
CUGGCCUCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCGAGGAC
AACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAAGCACUA
CCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCCGAGUUCUCCAAGCG
[0057] GGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCUGUCCGC
CUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCGA
GAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCC
CGCCGCCUUAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAGCG
GUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCA
CCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCUGUC
CCAGCUGGGCGGCGACGGCGGGCUGCCCCAAGAAGAAGCG
GAAGGUGUGA

[0058] Cas9的示例性氨基酸序列 (SEQ ID NO:113)

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH
SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS
NEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKY
PTIYHLRKKLVSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDN
SDVDKLFQILVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLEN
LIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDT
[0059] YDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAG
YIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDN
GSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPL
ARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFD
KNLPNEKVLPHSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGE
QKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN

[0060]

ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIER
LKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI
LDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHI
ANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIAMARENQT
TQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY
YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT
RSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLT
KAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN
DKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
VVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAK
YFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFA
TVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDW
DPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMER
SSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA
GELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQ
HKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHHRDKPIREQAE
NIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSITE
LYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV

[0061] Cas9的示例性开放阅读框(SEQ ID NO:114)

[0062]

AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAAC
AAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGG
UCCCGAGCAAGAAGUUAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGA
CACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGAC
AGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGC
AAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACC
UGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGAC
AGCUUCUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGA
AGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCG
UCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACC

[0063]

ACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGAC
CUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUC
AGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAAC
AGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC
AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUC
GACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAG
AAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGA
AGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGA
CUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGAC
GCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUG
GACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG
UUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGC
GACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUG
AGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGAC
CUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAA
AAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUA
CGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCU
ACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACA
GAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAG
AAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAU
CCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAG
ACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAA
AAGAUCCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUG
GCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAG
CGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCG
ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA
AACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG
CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG
ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGC
AUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGC

[0064]

UGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAG
GAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGA
AAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAA
CAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCC
UGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUC
CUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGA
AAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCA
UGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGA
CUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAG
CGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCG
CAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGA
CAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAG
GGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGC
CCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGU
CGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGA
ACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAG
AAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCGA
AGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAAC
ACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACC
UGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAG
GAACUGGACAUAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCAC
AUCGUCCCCGAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAAC
AAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGA
CAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACU
ACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGA
AAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAG
CGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUAAGAGACAGCUGGUCG
AAACAAGACAGAUACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACA
GCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUC
AGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAG

[0065]

CGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAA
UCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAG
UCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAA
AGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAG
AAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA
CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCA
AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGA
CCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUG
GGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGA
GCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAG
ACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAA
CAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGA
AGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGC
GUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAA
GCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGG
AAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAA
GCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAA
GCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAA
AGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC
GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUG
GCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAA
CGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCU
GGACGAAAUCAUCGAACAGAUAGCGAAUUCAGCAAGAGAG
UCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAU
ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAA
AACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCG
GCAGCAUUAAGUACUUCGACACAACAUCGACAGAAAGAG
AUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCA
CCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGA
GCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAG
AGAAAGGUCUAG

[0066] 如本文所用,“核糖核蛋白”(ribonucleoprotein,RNP)或“RNP复合物(RNP complex)”是指引导RNA以及经RNA引导的DNA结合剂,例如Cas核酸酶,例如Cas裂解酶、Cas切口酶或dCas DNA结合剂(例如Cas9)。在一些实施方案中,引导RNA将经RNA引导的DNA结合剂如Cas9引导至目标序列,并且所述引导RNA与目标序列杂交并且所述结合剂结合至目标

序列;在结合剂为裂解酶或切口酶的情况下,结合之后进行裂解或切割。

[0067] 如本文所用,“目标序列”是指目标基因中与gRNA的引导序列具有互补性,即与引导序列充分互补以允许引导序列的特异性结合的核酸序列。目标序列与引导序列的相互作用引导经RNA引导的DNA结合剂在目标序列内结合,并且可能切口或裂解(取决于剂活性)。

[0068] 如本文所用,如果第一序列与第二序列的比对显示整个第二序列的所有位置都与第一序列匹配,则第一序列被视为与第二序列“同一”或具有“100%同一性”。例如,序列AAG与序列AAGA具有100%同一性,这是因为第一序列的全部三个位置均存在匹配(无空位),因此比对将得到100%同一性。小于100%同一性可使用常规方法计算。例如,ACG将与AAGA具有67%同一性,因为第一序列的三个位置中有两个与第二序列匹配($2/3=67\%$)。RNA与DNA之间的差异(通常,尿苷交换为胸苷或反之亦然)和核苷类似物(例如经修饰的尿苷)的存在不会造成多核苷酸之间同一性或互补性的差异,只要相关核苷酸(例如胸苷、尿苷或经修饰的尿苷)具有相同互补序列(例如对于胸苷、尿苷或经修饰的尿苷全体而言,为腺苷;另一实例为胞嘧啶和5-甲基胞嘧啶,两者都具有鸟苷或经修饰的鸟苷作为互补序列)。因此,例如,序列5'-AXG(其中X为任何经修饰的尿苷,例如假尿苷、N1-甲基假尿苷或5-甲氧基尿苷)被视为与AUG 100%同一,因为两者与同一序列(5'-CAU)完全互补。示例性比对算法是本领域中众所周知的史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)和尼德曼-翁施(Needleman-Wunsch)算法。本领域技术人员应理解对于待比对的给定序列对,选择何种算法和参数设置是适当的;对于具有通常类似长度和针对氨基酸的>50%预期同一性或针对核苷酸的>75%预期同一性的序列而言,由EBI在www.ebi.ac.uk网站服务器提供的尼德曼-翁施算法接口的具有默认设置的尼德曼-翁施算法通常是适当的。

[0069] 类似地,如本文所用,当第一序列的所有核苷酸与第二序列互补(无空位)时,第一序列被视为与第二序列“完全互补”或“100%互补”。例如,序列UCU将被视为与序列AAGA完全互补,因为来自第一序列的每个核碱基都与第二序列的核苷酸碱基配对(没有空位)。序列UGU将被视为与序列AAGA为67%互补,因为第一序列的三个核碱基中有两个与第二序列的核碱基进行碱基配对。本领域技术人员应理解,可使用具有各种参数设置的算法来确定任何一对序列的互补性百分比,例如使用NCBI BLAST界面(blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)或尼德曼-翁施算法。

[0070] “mRNA”在本文中用于指包含可翻译成多肽的开放阅读框(即可充当用于通过核糖体和氨基酰化tRNA进行的翻译的底物)的多核苷酸。mRNA可包含磷酸酯-糖主链,其包括核糖残基或其类似物,例如2'-甲氧基核糖残基。在一些实施方案中,mRNA磷酸酯-糖主链的糖基本上由核糖残基、2'-甲氧基核糖残基或其组合组成。

[0071] 表1和整个申请中都显示了在本文所述的引导RNA组合物和方法中有用的示例性引导序列。例如,当表1显示引导序列时,此引导序列可用于引导RNA以将经RNA引导的DNA结合剂(例如核酸酶,如Cas核酸酶,如Cas9)引导至目标序列。表1中以基因组坐标提供了目标序列,并且包括基因组DNA的正链和负链(即给出的序列和序列的反向互补序列。在一些实施方案中,当引导序列与目标序列的反向互补序列结合时,引导序列与目标序列(例如,不包括PAM的目标序列)的某些核苷酸同一,不同之处在于在引导序列中用U取代T。

[0072] 如本文所用,“插入/缺失”是指由多种核苷酸组成的插入/缺失突变,所述核苷酸在目标核酸中的双链断裂(DSB)位点处插入或缺失。

[0073] 如本文所用,“抑制表达”等是指特定基因产物(例如蛋白质、mRNA或两者)表达的减少。蛋白质(即基因产物)的表达可通过检测所关注的组织或细胞群体中蛋白质的细胞总量来测量,通过检测细胞群体中个别成员的蛋白质表达,例如通过细胞分选来确定表达蛋白质的细胞百分比,或例如通过ELISA或蛋白质印迹(western blot)来确定聚集体中的细胞中蛋白质的表达。基因序列(例如基因组序列)的基因修饰可引起表达抑制,从而使全长基因产物或任何基因产物不再表达,例如基因敲低。某些基因修饰可导致引入移码突变或无义突变,其阻止全长基因产物的翻译。剪接位点的基因修饰,例如在足够接近剪接受体位点或剪接供体位点的位置进行基因修饰,以破坏剪接,可阻止全长蛋白质的翻译。基因产物表达所需的基因组序列中的调控序列,例如启动子序列、3'UTR序列(例如封端序列)、5'UTR序列(例如聚A序列)的基因修饰可引起表达抑制。破坏基因产物翻译所需的调控因子的表达或活性(例如不产生基因产物)也可引起表达抑制。例如,对转录因子序列进行基因修饰,抑制全长转录因子的表达,可具有下游效应并抑制由转录因子控制的一种或多种基因产物的表达。因此,可通过基因组或mRNA序列的变化来预测表达的抑制。因此,预期会导致表达抑制的突变可通过已知方法检测,包括对从所关注的组织或细胞群体中分离的mRNA进行测序。表达抑制可确定为群体中具有预定蛋白质表达水平的细胞百分比,即群体中至少在一定水平上表达所关注的蛋白质的细胞百分比或数量的减少。表达抑制也可通过确定整体蛋白质水平的下降来评估,例如在细胞或组织样品(例如活检样品)中。在某些实施方案中,分泌蛋白的表达抑制可在液体样品(例如细胞培养基或体液)中进行评估。蛋白质可存在于体液(例如血液或尿液)中,以允许分析蛋白质水平。在某些实施方案中,蛋白质水平可通过例如尿液或血液中的蛋白质活性或代谢产物的水平来确定。在一些实施方案中,“表达抑制”可指特定基因产物表达的某些损失,例如转录的mRNA量减少或细胞群体表达的蛋白质量减少。在一些实施方案中,“抑制”可指特定基因产物(例如TIM3基因产物)在细胞表面的表达的某些损失。应理解,敲低水平是相对于相同类型的受试者样品中的起始水平而言的。例如,与组织样品(例如活检样品)相比,在受试者的液体样品(例如血液或尿液)中更容易进行蛋白质水平的常规监测。应理解,敲低水平是针对所测定的样品而言的。类似地,在可能会获得连续的组织样品(例如肝脏组织)的动物研究中,敲低靶标可能会在其他组织中表达。因此,敲低水平并不一定是全身性的敲低水平,而是在被取样的组织、细胞类型或液体中的敲低水平。

[0074] 如本文所用,“基因修饰”是DNA水平上的变化,例如由CRISPR/Cas9 gRNA和Cas9系统诱导的变化。基因修饰可包括插入、缺失或取代(即碱基序列取代,即突变),通常是在确定的序列或基因组基因座内。基因修饰会改变DNA的核酸序列。基因修饰可发生在单个核苷酸位置。基因修饰可以是多个核苷酸,例如2、3、4、5个或更多个核苷酸,通常是相互靠近的核苷酸,例如连续核苷酸。基因修饰可在编码序列(例如外显子序列)中。基因修饰可位于剪接位点,即足够靠近剪接受体位点或剪接供体位点以破坏剪接。基因修饰可包括插入基因组基因座非内源性的核苷酸序列,例如插入异源开放阅读框或基因的编码序列。如本文所用,优选地基因修饰阻止具有全长蛋白质的氨基酸序列的全长蛋白质在对基因组基因座进行基因修饰之前的翻译。阻止全长蛋白质或基因产物的翻译包括阻止任何长度的蛋白质或基因产物的翻译。例如,可通过产生过早终止密码子的移码突变或通过产生无义突变来阻止全长蛋白质的翻译。可通过剪接中断来阻止全长蛋白质的翻译。

[0075] 如本文所用,“异源编码序列”是指作为外源引入细胞内的编码序列(例如,插入在基因组基因座如安全港基因座,包括TCR基因座)。也就是说,所引入的编码序列至少就其插入位点而言是异源的。由此种异源编码序列基因表达的多肽被称为“异源多肽”。异源编码序列可以是天然存在的或工程化的,并且可以是野生型或变体。异源编码序列可包括除编码异源多肽的序列以外的核苷酸序列(例如内部核糖体进入位点)。异源编码序列可以是基因组中天然存在的编码序列,如野生型或变体(例如突变体)。例如,虽然细胞含有所关注的编码序列(作为野生型或作为变体),但可将相同的编码序列或其变体作为外源引入,例如在高表达的基因座上表达。异源基因编码序列也可以是基因组中不天然存在的编码序列,或表达基因组中不天然存在的异源多肽的编码序列。“异源编码序列”、“外源编码序列”和“转基因”可以互换使用。在一些实施方案中,异源编码序列或转基因包括外源核酸序列,例如,并非受体细胞内源的核酸序列。在一些实施方案中,异源编码序列或转基因包括外源核酸序列,例如,受体细胞中不天然存在的核酸序列。例如,异源编码序列就其插入位点和其受体细胞而言可能是异源的。

[0076] “安全港”基因座是基因组中的一个基因座,在所述基因座中可插入基因而不会对细胞产生明显的有害影响。本文使用的核酸酶所靶向的安全港基因座的非限制性实例包括AAVS1(PPP1R12C)、TCR、B2M。在一些实施方案中,在靶向用于敲低的一个或多个基因座(如TRC基因,例如TRAC基因)处插入对于细胞是有利的。本领域已知其他合适的安全港基因座。

[0077] 如本文所用,“靶向受体”是指存在于细胞(例如T细胞)表面上以允许细胞与靶位点(例如生物体内的特定细胞或组织)结合的受体。靶向受体包括但不限于嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体(TCR)和细胞表面分子受体,所述受体至少通过跨膜结构域在能够在结合蛋白质的胞外受体部分后激活T细胞的内部信号传导结构域中可操作地连接。

[0078] 如本文所用,“嵌合抗原受体”是指细胞外抗原识别结构域,例如scFv、VHH、纳米抗体;与细胞内信号传导结构域可操作地连接,当抗原结合时可激活T细胞。CAR由四个区域组成:抗原识别结构域、细胞外铰链区、跨膜结构域和细胞内T细胞信号传导结构域。此类受体在本领域是众所周知的(参见例如W02020092057、W02019191114、W02019147805、W02018208837,其中每种受体的内容的相应部分通过引用并入本文)。还考虑通过衔接分子促进免疫细胞与靶细胞结合的反向通用CAR(参见例如W02019238722,其内容整体并入本文)。CAR可靶向任何可开发抗体的抗原,并且通常针对在待靶向的细胞或组织表面展示分子。

[0079] 如本文所用,“治疗”是指对受试者的疾病或病症施用或施加治疗剂,并且包括抑制疾病、遏制疾病发展、减轻疾病的一种或多种症状、治愈疾病、预防疾病的一种或多种症状或预防疾病的一种或多种症状再次发生。治疗自身免疫性或炎症性反应或病症可包括减轻与特定病症相关的炎症,从而减轻疾病特异性症状。用本文所述工程化T细胞进行的治疗可在其他治疗剂(例如待治疗适应症的护理标准)之前、之后或与其组合使用。

[0080] 人类野生型TIM3序列可以NCBI基因ID:84868;Ensembl:ENSG00000135077 TIM33获得,T细胞免疫球蛋白粘蛋白3、肾损伤分子-3、CD366抗原、CD366、KIM-3、SPTCL、Tim-3、甲型肝炎病毒细胞受体、含T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域的蛋白、T细胞免疫球蛋白粘蛋白家族成员、T细胞免疫球蛋白粘蛋白受体、T细胞膜蛋白、HAVcr-2、TIMD-3和TIMD3是TIM-3的基因同义词。

[0081] 如本文所用,“T细胞受体”或“TCR”是指T细胞中的受体。一般来说,TCR是一种异源二聚体受体分子,其包含两条TCR多肽链,即 α 和 β 。 α 和 β 链TCR多肽可与各种CD3分子复合,并在抗原结合后引起免疫反应,包括炎症和自身免疫。如本文所用,TCR基因敲低是指任何TCR基因的部分或全部敲低,例如TRBC1基因的部分缺失,单独或与其他TCR基因的部分或全部敲低组合。

[0082] “TRAC”用于指T细胞受体 α 链。人类野生型TRAC序列可在NCBI基因ID:28755;Ensembl:ENSG00000277734获得。T细胞受体 α 恒定、TCRA、IMD7、TRCA和TRA是TRAC的基因同义词。

[0083] “TRBC”用于指T细胞受体 β 链,例如TRBC1和TRBC2。“TRBC1”和“TRBC2”是指编码T细胞受体 β 链的两个同源基因,它们是TRBC1或TRBC2基因的基因产物。

[0084] 人类野生型TRBC1序列可在NCBI基因ID:28639;Ensembl:ENSG00000211751获得。T细胞受体 β 恒定、V_区段翻译产物、BV05S1J2.2、TCRBC1和TCRB是TRBC1的基因同义词。

[0085] 人类野生型TRBC2序列可在NCBI基因ID:28638;Ensembl:ENSG00000211772获得。T细胞受体 β 恒定、V_区段翻译产物和TCRBC2是TRBC2的基因同义词。

[0086] “T细胞”在暴露于抗原后的免疫反应中发挥核心作用。T细胞可以是天然存在的或非天然的,例如,当T细胞是通过工程化形成的,例如从干细胞,或通过转分化形成的,例如对体细胞进行重编程。T细胞与其他淋巴细胞的区别在于细胞表面是否存在T细胞受体。这一定义包括常规的适应性T细胞,其中包括辅助性CD4+T细胞、细胞毒性CD8+T细胞、记忆性T细胞和调节性CD4+T细胞,以及先天性T细胞,包括自然杀伤T细胞、粘膜相关不变性T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞为CD4+。在一些实施方案中,T细胞为CD3+/CD4+。

[0087] 如本文所用,“MHC”或“MHC蛋白”是指主要组织相容性复合体分子(或多个),并且包括例如MHC I类分子(例如人类中的HLA-A、HLA-B和HLA-C)和MHC II类分子(例如人类中的HLA-DP、HLA-DQ和HLA-DR)。

[0088] 如本文所用,“CIITA”或“CIITA”或“C2TA”是指“II类主要组织相容性复合体反式激活因子”的核酸序列或蛋白质序列;人类基因具有登录号NC_000016.10(范围10866208..10941562),参考GRCh38.p13。细胞核中的CIITA蛋白充当MHC II类基因转录的正调节剂并且为MHC II类蛋白质表达所需。

[0089] 如本文所用,“ β 2M”或“B2M”是指“ β -2微球蛋白”的核酸序列或蛋白质序列;人类基因具有登录号NC_000015(范围44711492..44718877),参考GRCh38.p13。B2M蛋白与MHC I类分子缔合为有核细胞表面上的异二聚体并且为MHC I类蛋白质表达所需。

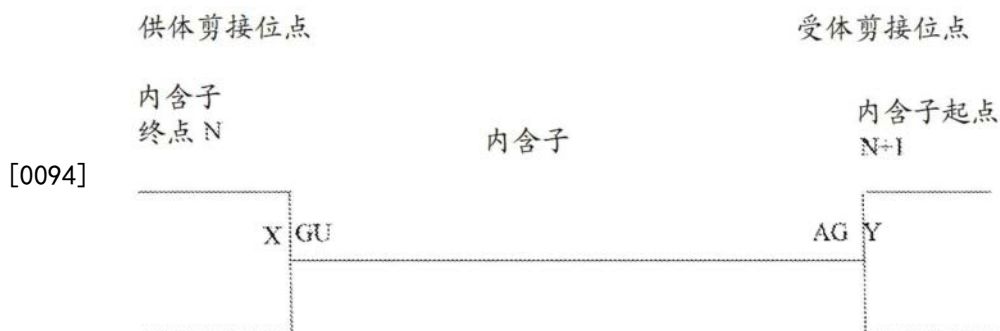
[0090] 如本文所用,HLA-A蛋白的上下文中的术语“HLA-A”是指MHC I类蛋白质分子,其为由重链(由HLA-A基因编码)和轻链(即 β -2微球蛋白)组成的异二聚体。如本文在核酸的上下文中所用的术语“HLA-A”或“HLA-A基因”是指编码HLA-A蛋白分子的重链的基因。HLA-A基因也称为“HLA I类组织相容性, $A\alpha$ 链”;人类基因具有登录号NC_000006.12(29942532..29945870)。已知HLA-A基因跨群体具有数千种不同型式(也称为“等位基因”) (并且个体可接受HLA-A基因的两种不同等位基因)。HLA-A等位基因的公共数据库(包括序列信息)可访问IPD-IMGT/HLA:www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/。HLA-A的所有等位基因均由术语“HLA-A”和“HLA-A基因”涵盖。

[0091] 如本文所用,术语“基因组坐标内”包括给定基因组坐标范围的边界。例如,如果给

出chr6:29942854-chr6:29942913,则涵盖坐标chr6:29942854-chr6:29942913。在整个本申请中,参考的基因组坐标是基于来自基因组参考联合会 (Genome Reference Consortium) 的人类基因组的GRCh38 (也称为hg38) 组装体中的基因组注释,可在国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 网站上获得。用于在一个组装体与另一组装体之间转化基因组坐标的工具和方法是本领域中已知的并且可用于将本文中提供的基因组坐标转化为人类基因组的另一组装体中的对应坐标,包括转化为由同一机构或使用相同算法产生的早期组装体 (例如从GRCh38至GRCh37), 和转化由不同机构或算法产生的组装体 (例如从GRCh38至NCBI33,通过国际人类基因组测序联合会 (International Human Genome Sequencing Consortium) 产生)。本领域中已知的可用方法和工具包括但不限于可在国家生物技术信息中心网站获得的NCBI Genome Remapping Service、可在UCSC Genome Browser网站获得的UCSC LiftOver和可在Ensembl.org网站获得的Assembly Converter。

[0092] 如本文所用,“剪接位点”是指构成受体剪接位点或供体剪接位点 (下文所定义) 或本领域中已知为剪接位点的一部分的任何其他核苷酸的三个核苷酸。参见例如Burset等人, Nucleic Acids Research 28(21):4364-4375 (2000) (描述哺乳动物基因组中的典型和非典型剪接位点)。构成“受体剪接位点”的三个核苷酸为内含子的3'处的两个保守残基 (例如,人类中的AG) 和边界核苷酸 (即,AG的外显子3'的第一个核苷酸)。受体剪接位点的“剪接位点边界核苷酸”在下图中被指定为“Y”并且在本文中也可称为“受体剪接位点边界核苷酸”或“剪接受体位点边界核苷酸”。术语“受体剪接位点”、“剪接受体位点”、“受体剪接序列”或“剪接受体序列”在本文中可以互换使用。

[0093] 构成“供体剪接位点”的三个核苷酸为内含子的5'端处的两个保守残基 (例如,人类中的GT (基因) 或GU (在RNA中,例如前mRNA)) 和边界核苷酸 (即,GT的外显子5'的第一个核苷酸)。供体剪接位点的“剪接位点边界核苷酸”在下图中被指定为“X”并且在本文中也可称为“供体剪接位点边界核苷酸”或“剪接供体位点边界核苷酸”。术语“供体剪接位点”、“剪接供体位点”、“供体剪接序列”或“剪接供体序列”在本文中可以互换使用。



[0095] II. 组合物

[0096] A. 包含引导RNA (gRNA) 的组合物

[0097] 本文提供了可用于改变TIM3基因内的DNA序列,例如诱导单链 (SSB) 或双链断裂 (DSB),例如使用具有经RNA引导的DNA结合剂 (例如,CRISPR/Cas系统) 的引导RNA的组合物。表1在SEQ ID NO:1-88显示了靶向TIM3基因的引导序列,以及此类引导RNA靶向的基因组坐标。

[0098] 表1在SEQ ID NO:1-88显示的每个引导序列还可包含额外的核苷酸以形成crRNA,

例如,在其3'端的引导序列之后具有以下示例性核苷酸序列:GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO:200),5'至3'方向。

[0099] 在sgRNA的情况下,上述引导序列还可包含额外的核苷酸以形成sgRNA,例如,在引导序列的3'端之后具有以下示例性核苷酸序列:GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO:201),5'至3'方向。

[0100] 在sgRNA的情况下,上述引导序列还可包含额外的核苷酸以形成sgRNA,例如,在引导序列的3'端之后具有以下示例性核苷酸序列:GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO:202),5'至3'方向。

[0101] 在sgRNA的情况下,引导序列可整合到以下修饰基序中。 $mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNN$ $NNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm$ $AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU$ (SEQ ID NO:300),其中“N”可以是任何天然或非天然核苷酸,优选RNA核苷酸;核苷酸的糖部分可为核糖、脱氧核糖或具有取代的类似化合物;m是2'-O-甲基修饰的核苷酸,并且*是核苷酸残基之间的硫代磷酸酯键联;并且其中N统称为引导序列的核苷酸序列。

[0102] 在sgRNA的情况下,引导序列还可包含SpyCas9 sgRNA序列。SpyCas9 sgRNA序列的一个实例如下表所示 (SEQ ID NO:201 GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-“示例性SpyCas9 sgRNA-1”),包含在引导序列的3'端,并具有下表所示的结构域。LS是下茎。B是隆凸。US是上茎。H1和H2分别是发夹1和发夹2。H1和H2合称为发夹区。WO2019237069中的图10A提供了所述结构的模型,所述文献通过引用并入本文。

[0103] 示例性SpyCas9 sgRNA-1的核苷酸序列可用作特定化学修饰、序列取代和截短的模板序列。

[0104] 在某些实施方案中,gRNA是例如sgRNA或dgRNA,并且其任选地包含化学修饰。在一些实施方案中,修饰的sgRNA包含引导序列和SpyCas9 sgRNA序列,例如示例性SpyCas9 sgRNA-1。gRNA如sgRNA可包括在引导序列的5'端或引导序列的3'端的修饰,例如示例性SpyCas9 sgRNA-1,在一个或多个末端核苷酸处,例如在3'端或5'端的1、2、3或4个核苷酸处。在某些实施方案中,修饰的核苷酸选自2'-O-甲基(2'-OMe)修饰的核苷酸、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-O-moe)修饰的核苷酸、2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸、核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键联、反向无碱基修饰的核苷酸或其组合。在某些实施方案中,修饰的核苷酸包括2'-OMe修饰的核苷酸。在某些实施方案中,修饰的核苷酸包括PS键联。在某些实施方案中,修饰的核苷酸包括2'-OMe修饰的核苷酸和PS键联。

[0105] 在某些实施方案中,使用(SEQ ID NO:201“示例性SpyCas9 sgRNA-1”)作为实例,示例性SpyCas9 sgRNA-1还包括以下中的一者或多者:

[0106] A. 缩短的发夹1区或经取代且任选地缩短的发夹1区,其中

[0107] 1. 以下核苷酸对中的至少一者在发夹1中被Watson-Crick配对核苷酸取代:H1-1和H1-12、H1-2和H1-11、H1-3和H1-10、或H1-4和H1-9,并且所述发夹1区任选地缺乏

[0108] a. H1-5至H1-8中的任一者或两者,

[0109] b. 以下核苷酸对中的一者、两者或三者:H1-1和H1-12、H1-2和H1-11、H1-3和H1-10、和H1-4和H1-9,或

[0110] c.发夹1区的1-8个核苷酸;或

[0111] 2.所述缩短的发夹1区缺乏4-8个核苷酸,优选4-6个核苷酸;并且

[0112] a.位置H1-1、H1-2或H1-3中的一者或多者缺失或相对于示例性SpyCas9 sgRNA-1被取代,或

[0113] b.位置H1-6至H1-10中的一者或多者相对于示例性SpyCas9 sgRNA-1被取代;或

[0114] 3.所述缩短的发夹1区缺乏5-10个核苷酸,优选5-6个核苷酸,并且位置N18、H1-12或n中的一者或多者相对于示例性SpyCas9 sgRNA-1被取代;或

[0115] B.缩短的上茎区,其中所述缩短的上茎区缺乏1-6个核苷酸并且其中所述缩短的上茎区的6、7、8、9、10或11个核苷酸相对于示例性SpyCas9 sgRNA-1包括少于或等于4个取代;或

[0116] C.在LS6、LS7、US3、US10、B3、N7、N15、N17、H2-2和H2-14中的任一者或多者处相对于示例性SpyCas9 sgRNA-1的取代,其中取代基核苷酸既不是嘧啶后接腺嘌呤,也不是腺嘌呤前接嘧啶;或

[0117] D.具有上茎区的示例性SpyCas9 sgRNA-1,其中上茎修饰包含对上茎区中的US1-US12中的任一者或多者的修饰,其中

[0118] 1.所述修饰的核苷酸任选地选自2'-O-甲基(2'-OMe)修饰核苷酸、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-O-moe)修饰核苷酸、2'-氟(2'-F)修饰核苷酸、核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键联、反向无碱基修饰的核苷酸,或其组合;或

[0119] 2.所述修饰的核苷酸任选地包括2'-OMe修饰的核苷酸。

[0120] 在某些实施方案中,示例性SpyCas9 sgRNA-1(SEQ ID NO:201)或sgRNA(例如包含示例性SpyCas9 sgRNA-1的sgRNA)还包括3'尾,例如1、2、3、4或更多个核苷酸的3'尾。在某些实施方案中,尾部包括一个或多个修饰的核苷酸。在某些实施方案中,修饰的核苷酸选自2'-O-甲基(2'-OMe)修饰核苷酸、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-O-moe)修饰核苷酸、2'-氟(2'-F)修饰核苷酸、核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键联、反向无碱基修饰的核苷酸;或其组合。在某些实施方案中,修饰的核苷酸包括2'-OMe修饰的核苷酸。在某些实施方案中,修饰的核苷酸包括核苷酸之间的PS键联。在某些实施方案中,修饰的核苷酸包括2'-OMe修饰的核苷酸和核苷酸之间的PS键联。

[0121] 在某些实施方案中,发夹区包括一个或多个修饰的核苷酸。在某些实施方案中,修饰的核苷酸选自2'-O-甲基(2'-OMe)修饰的核苷酸、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-O-moe)修饰的核苷酸、2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸、核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键联、反向无碱基修饰的核苷酸;或其组合。在某些实施方案中,修饰的核苷酸包括2'-OMe修饰的核苷酸。

[0122] 在某些实施方案中,上茎区包括一个或多个修饰的核苷酸。在某些实施方案中,修饰的核苷酸选自2'-O-甲基(2'-OMe)修饰的核苷酸、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-O-moe)修饰的核苷酸、2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸、核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键联、反向无碱基修饰的核苷酸;或其组合。在某些实施方案中,修饰的核苷酸包括2'-OMe修饰的核苷酸。

[0123] 在某些实施方案中,示例性SpyCas9 sgRNA-1包含一个或多个YA二核苷酸,其中Y是嘧啶,其中YA二核苷酸包括修饰的核苷酸。在某些实施方案中,修饰的核苷酸选自2'-O-甲基(2'-OMe)修饰的核苷酸、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-O-moe)修饰的核苷酸、2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸、核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键联、反向无碱基修饰的核苷酸或其组合。在

某些实施方案中,修饰的核苷酸包括2'-OMe修饰的核苷酸。

[0124] 在某些实施方案中,示例性SpyCas9 sgRNA-1包含一个或多个YA二核苷酸,其中Y是嘧啶,其中YA二核苷酸包括被取代的核苷酸,即序列取代的核苷酸,其中嘧啶取代嘌呤。在某些实施方案中,当嘧啶在单引导物中形成Watson-Crick碱基对时,被取代嘧啶核苷酸的基于Watson-Crick的核苷酸被取代以保持Watson-Crick碱基配对。

[0127]

引导物 ID	SEQ ID NO:	TIM3 ID	引导序列	基因组坐标 (hg38)
CR0088 39	1	TIM3-1	GACGGGCACGAGGU UCCCUG	chr5:1571068 67-157106887
CR0089 10	2	TIM3-2	AACCUCGUGCCCGUC UGCUG	chr5:1571068 62-157106882
CR0088 98	3	TIM3-3	GGUGCUCAGGACUG AUGAAA	chr5:1571068 03-157106823
CR0089 06	4	TIM3-4	GCUCCUUUGCCCCAG CAGAC	chr5:1571068 50-157106870
CR0088 94	5	TIM3-5	AGUCGGUGCAGGGG UGACCU	chr5:1571047 26-157104746
CR0088 77	6	TIM3-6	UUAUGCCUGGGAUU UGGAUC	chr5:1571066 68-157106688
CR0088 83	7	TIM3-7	UUCCAAGGAUGCUU ACCACC	chr5:1571046 81-157104701
CR0088 62	8	TIM3-8	GGUGGUAAGCAUCC UUGGAA	chr5:1571046 81-157104701
CR0088 61	9	TIM3-9	UCCAAGGAUGCUUA CCACCA	chr5:1571046 80-157104700
CR0088 40	10	TIM3-1 0	UGCUGCCGGAUCCA AAUCCC	chr5:1571066 76-157106696
CR0089 15	11	TIM3-1 1	GGAGGUUGGCCAAA GAGAUG	chr5:1570872 71-157087291
CR0088 56	12	TIM3-1 2	CCACAUUGGCCAAU GAGUUA	chr5:1570954 32-157095452
CR0088 29	13	TIM3-1 3	AUAGGCAUCUACAU CGGAGC	chr5:1570953 61-157095381
CR0088 30	14	TIM3-1 4	UAGGCAUCUACAUC GGAGCA	chr5:1570953 60-157095380
CR0089 13	15	TIM3-1 5	AGCAGCAGGACACA GUCAAA	chr5:1571089 45-157108965
CR0088 31	16	TIM3-1 6	CCGUAACUCAUUGG CCAAUG	chr5:1570954 29-157095449
CR0088 32	17	TIM3-1 7	UCUAGAGUCCCGUA ACUCAU	chr5:1570954 20-157095440
CR0088 33	18	TIM3-1 8	CUAAAUAGGGGAUUU CCGCAA	chr5:1571067 51-157106771
CR0088	19	TIM3-1	UGAGUUACGGGACU	chr5:1570954

[0128]

引导物 ID	SEQ ID NO:	TIM3 ID	引导序列	基因组坐标 (hg38)
34		9	CUAGAU	19-157095439
CR0088 35	20	TIM3-2 0	UCCAGAGUCCCGUA AGUCAU	chr5:1570953 93-157095413
CR0088 36	21	TIM3-2 1	AGACGGGCACGAGG UUCCCU	chr5:1571068 66-157106886
CR0088 37	22	TIM3-2 2	CCAAGGAUGCUUAC CACCAG	chr5:1571046 79-157104699
CR0088 38	23	TIM3-2 3	UGUGUUUGAAUGUG GCAACG	chr5:1571068 24-157106844
CR0088 41	24	TIM3-2 4	CAUCCAGAUACUGG CUAAAU	chr5:1571067 65-157106785
CR0088 42	25	TIM3-2 5	GCCAAUGACUUACG GGACUC	chr5:1570953 97-157095417
CR0088 43	26	TIM3-2 6	CGACAACCCAAAGG UUGUGA	chr5:1570871 17-157087137
CR0088 44	27	TIM3-2 7	GUUGUUUCUGACAU UAGCCA	chr5:1571047 46-157104766
CR0088 45	28	TIM3-2 8	CUGCCCCAUGCAUA GUUACC	chr5:1571046 46-157104666
CR0088 46	29	TIM3-2 9	UCUGGAGCAACCAU CAGAAU	chr5:1570953 79-157095399
CR0088 47	30	TIM3-3 0	GAACCUCGUGCCCG UCUGCU	chr5:1571068 63-157106883
CR0088 48	31	TIM3-3 1	GCGACAACCCAAAG GUUGUG	chr5:1570871 16-157087136
CR0088 49	32	TIM3-3 2	GGAACCUCGUGCCC GUCUGC	chr5:1571068 64-157106884
CR0088 50	33	TIM3-3 3	CUGGUUUGAUGACC AACUUC	chr5:1571066 26-157106646
CR0088 51	34	TIM3-3 4	CAGACGGGCACGAG GUUCCC	chr5:1571068 65-157106885
CR0088 52	35	TIM3-3 5	GCAGCAACCCUCACA ACCUU	chr5:1570871 27-157087147
CR0088 53	36	TIM3-3 6	AAUGUGGCAACGUG GUGCUC	chr5:1571068 16-157106836
CR0088 54	37	TIM3-3 7	AUUGCAAAGCGACA ACCCAA	chr5:1570871 08-157087128
CR0088 55	38	TIM3-3 8	UUCUACACCCCAGCC GCCCC	chr5:1571068 86-157106906

[0129]

引导物 ID	SEQ ID NO:	TIM3 ID	引导序列	基因组坐标 (hg38)
CR0088 57	39	TIM3-3 9	AUCCCCAUUUAGCC AGUAUC	chr5:1571067 59-157106779
CR0088 58	40	TIM3-4 0	CUUACUGUUAGAUU UAUAUC	chr5:1570988 52-157098872
CR0088 59	41	TIM3-4 1	GAUGUAGAUGCCUA UUCUGA	chr5:1570953 66-157095386
CR0088 60	42	TIM3-4 2	CUAGAUUGGCCAAU GACUUA	chr5:1570954 05-157095425
CR0088 63	43	TIM3-4 3	CACAUUGGCCAAUG AGUUAC	chr5:1570954 31-157095451
CR0088 64	44	TIM3-4 4	UAGAUUGGCCAAUG ACUUAC	chr5:1570954 04-157095424
CR0088 65	45	TIM3-4 5	ACGUUGCCACAUUC AAACAC	chr5:1571068 23-157106843
CR0088 66	46	TIM3-4 6	AUGCUUACCACCAG GGGACA	chr5:1571046 73-157104693
CR0088 67	47	TIM3-4 7	GUGGAAUACAGAGC GGAGGU	chr5:1571069 31-157106951
CR0088 68	48	TIM3-4 8	UCUACACCCCAGCCG CCCCA	chr5:1571068 85-157106905
CR0088 69	49	TIM3-4 9	CUGUUAGAUUUUAUA UCAGGG	chr5:1570988 56-157098876
CR0088 70	50	TIM3-5 0	CCCCUGGUGGUAAG CAUCCU	chr5:1571046 76-157104696
CR0088 71	51	TIM3-5 1	AUCGGAGCAGGGAU CUGUGC	chr5:1570953 49-157095369
CR0088 72	52	TIM3-5 2	UGGUGCUCAGGACU GAUGAA	chr5:1571068 04-157106824
CR0088 73	53	TIM3-5 3	UCCAUAGCAAUAU CCACAU	chr5:1570954 46-157095466
CR0088 74	54	TIM3-5 4	CAUGCAA AUGUCCA CUCACC	chr5:1571066 07-157106627
CR0088 75	55	TIM3-5 5	CAACCUCUCCUCCUC AGGAU	chr5:1570872 59-157087279
CR0088 76	56	TIM3-5 6	GGCGGCUGGGGUGU AGAAGC	chr5:1571068 88-157106908
CR0088 78	57	TIM3-5 7	AUCAGAAUAGGCAU CUACAU	chr5:1570953 67-157095387
CR0088	58	TIM3-5	CAGCAACCCUCACAA	chr5:1570871

[0130]

引导物 ID	SEQ ID NO:	TIM3 ID	引导序列	基因组坐标 (hg38)
79		8	CCUUU	26-157087146
CR0088 80	59	TIM3-5 9	UUGCCAAUCCUGAG GGAGGG	chr5:1570872 53-157087273
CR0088 81	60	TIM3-6 0	AUUAUUGCUAUGUC AGCAGC	chr5:1570871 49-157087169
CR0088 82	61	TIM3-6 1	ACGAGGUUCCCUGG GGCGGC	chr5:1571068 74-157106894
CR0088 84	62	TIM3-6 2	GCGGCUGGGGUGUA GAAGCA	chr5:1571068 89-157106909
CR0088 85	63	TIM3-6 3	AGAAGUGGAAUACA GAGCGG	chr5:1571069 35-157106955
CR0088 86	64	TIM3-6 4	UCGGAGCAGGGAUC UGUGCU	chr5:1570953 48-157095368
CR0088 87	65	TIM3-6 5	ACAGUGGGAUCUAC UGCUGC	chr5:1571066 90-157106710
CR0088 88	66	TIM3-6 6	UGAAAAAUUUAACC UGAAGU	chr5:1571066 41-157106661
CR0088 89	67	TIM3-6 7	UGCCCCAGCAGACG GGCACG	chr5:1571068 57-157106877
CR0088 90	68	TIM3-6 8	CUAUGCAGGGUCCU CAGAAG	chr5:1571069 50-157106970
CR0088 91	69	TIM3-6 9	AAAUAAGGUGGUUG GAUCUA	chr5:1570870 84-157087104
CR0088 92	70	TIM3-7 0	CAUUUGCCAAUCCU GAGGGA	chr5:1570872 50-157087270
CR0088 93	71	TIM3-7 1	UCAGGGACACAUCU CCUUUG	chr5:1571067 34-157106754
CR0088 95	72	TIM3-7 2	UUGGCAAAUGCAGU AGCAGA	chr5:1570872 40-157087260
CR0088 96	73	TIM3-7 3	UUUUCAUCAUUCAU UAUGCC	chr5:1571066 55-157106675
CR0088 97	74	TIM3-7 4	AUCCAGAUACUGGC UAAAUG	chr5:1571067 64-157106784
CR0088 99	75	TIM3-7 5	ACCUGGGCCAUGUC CCCUGG	chr5:1571046 63-157104683
CR0089 00	76	TIM3-7 6	GCAUUUGCCAAUCC UGAGGG	chr5:1570872 49-157087269
CR0089 01	77	TIM3-7 7	CAGCAGCAGGACAC AGUCAA	chr5:1571089 44-157108964

[0131]

引导物 ID	SEQ ID NO:	TIM3 ID	引导序列	基因组坐标 (hg38)
CR008902	78	TIM3-78	GUUACCUGGGCCAUGUCCCC	chr5:157104660-157104680
CR008903	79	TIM3-79	GCCACAUUCAACAACAGGAC	chr5:157106828-157106848
CR008904	80	TIM3-80	ACAUCCAGAUACUGGCUAAA	chr5:157106766-157106786
CR008905	81	TIM3-81	GCCUGUCCUGUGUUUGAAUG	chr5:157106832-157106852
CR008907	82	TIM3-82	CGAGGUUCCCUGGGGCGGCU	chr5:157106875-157106895
CR008908	83	TIM3-83	UACUGCAUUUGCCA AUCCUG	chr5:157087245-157087265
CR008909	84	TIM3-84	GAGGUUCCCUGGGGCGGCUG	chr5:157106876-157106896
CR008911	85	TIM3-85	CAUUCAUUAUGCCUGGGAUU	chr5:157106662-157106682
CR008912	86	TIM3-86	AGAGAACGUAUAUGAAGUGG	chr5:157087184-157087204
CR008914	87	TIM3-87	CGCUCUGUAUUCACUUCUG	chr5:157106936-157106956
CR008916	88	TIM3-88	ACUUCACUGCAGCCUUUCCA	chr5:157104696-157104716

[0132] 表2:靶向TIM3的sgRNA

[0133]

引导物 ID	SEQ ID NO:	sgRNA 序列	基因组坐标 (hg38)
G015078	89	UGUGUUUGAAUGUGGCAACG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:157106824-157106844
G015079	90	CGACAACCCAAAGGUUGUGA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:157087117-157087137

[0134]

引导物 ID	SEQ ID NO:	sgRNA 序列	基因组坐标 (hg38)
G015080	91	GGAACCUUCGUGCCCGUCUGC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1571068 64-15710688 4
G015081	92	GGCGGCUGGGGUGUAGAAGC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1571068 88-15710690 8
G015082	93	UUGCCAAUCCUGAGGGAGGG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1570872 53-15708727 3
G015083	94	AGAAGUGGAAUACAGAGCGG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1571069 35-15710695 5
G015084	95	UGAAAAAUUUUAAACCUGAAGU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1571066 41-15710666 1
G015085	96	AGUCGGUGCAGGGGUGACCU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1571047 26-15710474 6
G015086	97	ACCUGGGCCAUGUCCCCUGG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1571046 63-15710468 3
G015087	98	CGCUCUGUAUCCACUUCUG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1571069 36-15710695 6

[0135]

引导物 ID	SEQ ID NO:	sgRNA 序列	基因组坐标 (hg38)
G015088	99	AUAGGCAUCUACAUCGGAGC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1570953 61-15709538 1
G015089	100	CCACAUUGGCCAAUGAGUUA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1570954 32-15709545 2
G015090	101	UAGGCAUCUACAUCGGAGCA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1570953 60-15709538 0
G015091	102	AGCAGCAGGACACAGUCAA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1571089 45-15710896 5
G015092	103	GCUCCUUGCCCCAGCAGAC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1571068 50-15710687 0
G015093	104	GGUGGUAAGCAUCCUUGGAA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1571046 81-15710470 1
G015094	105	UCCAAGGAUGCUCUACCACC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1571046 81-15710470 1
G016811	106	AACCUCGUGCCCGUCUGCUG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1571068 62-15710688 2

[0136]

引导物 ID	SEQ ID NO:	sgRNA 序列	基因组坐标 (hg38)
G016812	107	GACGGGCACGAGGUUCCCUG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1571068 67-15710688 7
G016813	108	GGUGCUCAGGACUGAUGAAA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:1571068 03-15710682 3
G018436, TIM3-1 5 的经 修饰 sgRNA	109	mA*mG*mC*AGCAGGACACAG UCAAAGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU*mU*mU	chr5:1571089 45-15710896 5
G018437, TIM3-4 的经修 饰 sgRNA	110	mG*mC*mU*CCUUUGCCCCAG CAGACGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU*mU*mU	chr5:1571068 50-15710687 0
G020845, TIM3-2 的经修 饰 sgRNA	111	mA*mA*mC*CUCGUGCCCGUC UGCUGGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU*mU*mU	chr5:1571068 62-15710688 2

[0137] *=PS键联;m=2'-O-Me核苷酸;N=任何天然或非天然核苷酸

[0138] 在一些实施方案中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含一种或多种引导RNA(gRNA),其包含将经RNA引导的DNA结合剂(可以是核酸酶(例如Cas9核酸酶如Cas9))引导至TIM3中的靶DNA序列的引导序列。在一些包含gRNA的实施方案中,所述gRNA包含表1所示的引导序列,例如作为sgRNA。在一些实施方案中,所述gRNA可包含选自以下的引导序列: SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和

88;SEQ ID NO:1-4、6-15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86和88;SEQ ID NO:1-5、7、8、12-15、23、26、32、56、59、63、66、75和87;SEQ ID NO:2、4、15、23、56、59、63、75和87;SEQ ID NO:1-4;SEQ ID NO:2、4和15;SEQ ID NO:2、4、15、63和87;SEQ ID NO:2和15;SEQ ID NO:63和87;或SEQ ID NO:15。gRNA可包含含有表1中所示引导序列的17、18、19或20个连续核苷酸的引导序列。在一些实施方案中,gRNA包含的引导序列包含与表1中所示引导序列的至少17、18、19或20个连续核苷酸具有至少75%、80%、85%、90%或95%或100%同一性的序列,任选地SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88;SEQ ID NO:1-4、6-15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86和88;SEQ ID NO:1-5、7、8、12-15、23、26、32、56、59、63、66、75和87;SEQ ID NO:2、4、15、23、56、59、63、75和87;SEQ ID NO:1-4;SEQ ID NO:2、4和15;SEQ ID NO:2、4、15、63和87;SEQ ID NO:2和15;SEQ ID NO:63和87;或SEQ ID NO:15。在一些实施方案中,gRNA包含与表1中所示的引导序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性的引导序列,任选地SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88;SEQ ID NO:1-4、6-15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86和88;SEQ ID NO:1-5、7、8、12-15、23、26、32、56、59、63、66、75和87;SEQ ID NO:2、4、15、23、56、59、63、75和87;SEQ ID NO:1-4;SEQ ID NO:2、4和15;SEQ ID NO:2、4、15、63和87;SEQ ID NO:2和15;SEQ ID NO:63和87;或SEQ ID NO:15。gRNA还可包含trRNA。在本文所述的每个实施方案中,gRNA可包含作为单个RNA (sgRNA)或在单独的RNA(dgRNA)上缔合的crRNA和trRNA。在sgRNA的情况下,crRNA和trRNA组分可例如经由磷酸二酯键或其他共价键共价连接。

[0139] 在本文所述的每个实施方案中,引导RNA可包含呈“双引导RNA”或“dgRNA”形式的两个RNA分子。dgRNA包含有包含crRNA的第一RNA分子,所述crRNA包含例如表1中所示的引导序列;和包含trRNA的第二RNA分子。第一RNA分子和第二RNA分子可不共价连接,但可经由crRNA与trRNA的部分之间的碱基配对形成RNA双链体。

[0140] 在本文所述的每个实施方案中,引导RNA可包含作为“单引导RNA”或“sgRNA”的单个RNA分子。sgRNA可包含有包含表1中所示的引导序列的crRNA(或其部分),或选自SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88;SEQ ID NO:1-4、6-15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86和88;SEQ ID NO:1-5、7、8、12-15、23、26、32、56、59、63、66、75和87;SEQ ID NO:2、4、15、23、56、59、63、75和87;SEQ ID NO:1-4;SEQ ID NO:2、4和15;SEQ ID NO:2、4、15、63和87;SEQ ID NO:2和15;SEQ ID NO:63和87;或SEQ ID NO:15的引导序列,与trRNA共价连接。sgRNA可包含表1中所示的引导序列的17、18、19或20个连续核苷酸,或选自SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88;SEQ ID NO:1-4、6-15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86和88;SEQ ID NO:1-5、7、8、12-15、23、26、32、56、59、63、66、75和87;SEQ ID NO:2、4、15、23、56、59、63、75和87;SEQ ID NO:1-4;SEQ ID NO:2、4和15;SEQ ID NO:2、4、15、63和87;SEQ ID NO:2和15;SEQ ID NO:63和87;或SEQ ID NO:15的引导序列。在一些实施方案中,crRNA和trRNA是经由接头共价连接。在一些实施方案中,sgRNA经由crRNA和trRNA的部分之间的碱基配对而形成茎环结构。在一些实施方案中,crRNA和trRNA经由一个或多个非磷酸二酯键的键共价连接。

[0141] 在一些实施方案中,trRNA可包含来源于天然存在的CRISPR/Cas系统的trRNA序列

的全部或一部分。在一些实施方案中，trRNA包含经截短或经修饰的野生型trRNA。trRNA的长度取决于所用CRISPR/Cas系统。在一些实施方案中，trRNA包含以下或由以下组成：5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100或超过100个核苷酸。在一些实施方案中，trRNA可包含某些二级结构，例如，一种或多种发夹或茎-环结构或一种或多种隆凸结构。

[0142] 在一些实施方案中，本发明提供了一种包含一种或多种引导RNA的组合物，所述引导RNA包含以下中任一者的引导序列：SEQ ID NO:1-88，优选SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88；SEQ ID NO:1-4、6-15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86和88；SEQ ID NO:1-5、7、8、12-15、23、26、32、56、59、63、66、75和87；SEQ ID NO:2、4、15、23、56、59、63、75和87；SEQ ID NO:1-4；SEQ ID NO:2、4和15；SEQ ID NO:2、4、15、63和87；SEQ ID NO:2和15；SEQ ID NO:63和87；或SEQ ID NO:15。

[0143] 在一些实施方案中，本发明提供了一种包含一种或多种sgRNA的组合物，所述sgRNA包含SEQ ID NO:89-111中的任一者。

[0144] 在一个方面，本发明提供了一种包含gRNA的组合物，所述gRNA包含与以下中的任一者具有100%或至少95%或90%同一性的引导序列：SEQ ID NO:1-88，优选SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88；SEQ ID NO:1-4、6-15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86和88；SEQ ID NO:1-5、7、8、12-15、23、26、32、56、59、63、66、75和87；SEQ ID NO:2、4、15、23、56、59、63、75和87；SEQ ID NO:1-4；SEQ ID NO:2、4和15；SEQ ID NO:2、4、15、63和87；SEQ ID NO:2和15；SEQ ID NO:63和87；或SEQ ID NO:15。

[0145] 在其他实施方案中，组合物包含至少一种，例如至少两种gRNA，所述gRNA包含选自以下的引导序列中的任何两者或更多者的引导序列：SEQ ID NO:1-88，优选SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88；SEQ ID NO:1-4、6-15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86和88；SEQ ID NO:1-5、7、8、12-15、23、26、32、56、59、63、66、75和87；SEQ ID NO:2、4、15、23、56、59、63、75和87；SEQ ID NO:1-4；SEQ ID NO:2、4和15；SEQ ID NO:2、4、15、63和87；SEQ ID NO:2和15；SEQ ID NO:63和87；或SEQ ID NO:15。在一些实施方案中，组合物包含至少两种gRNA，所述gRNA各自包含与以下的任何核酸100%或至少95%或90%同一的引导序列：SEQ ID NO:1-88，优选SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88；SEQ ID NO:1-4、6-15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86和88；SEQ ID NO:1-5、7、8、12-15、23、26、32、56、59、63、66、75和87；SEQ ID NO:2、4、15、23、56、59、63、75和87；SEQ ID NO:1-4；SEQ ID NO:2、4和15；SEQ ID NO:2、4、15、63和87；SEQ ID NO:2和15；SEQ ID NO:63和87；或SEQ ID NO:15。

[0146] 本发明的引导RNA组合物经设计以识别(例如杂交至)TIM3基因中的目标序列。例如，TIM3目标序列可通过包含引导RNA的所提供Cas裂解酶识别并裂解。在一些实施方案中，例如Cas裂解酶的经RNA引导的DNA结合剂可通过引导RNA导引至TIM3基因的目标序列，其中引导RNA的引导序列与目标序列杂交，并且例如Cas裂解酶的经RNA引导的DNA结合剂裂解目标序列。

[0147] 在一些实施方案中，一个或多个引导RNA的选择是基于TIM 3基因内的目标序列而

确定。

[0148] 不受任何特定理论束缚,基因的某些区域中的突变(例如,由插入/缺失(即由于核酸酶介导的DSB而发生的插入或缺失)引起的移码突变)可能比基因的其他区域中的突变更难以耐受,因此DSB的位置是可引起蛋白质的量或类型敲低的重要因素。在一些实施方案中,与TIM3内的目标序列互补或具有互补性的gRNA用于将经RNA引导的DNA结合剂导引至适当TIM3基因中的特定位置。在一些实施方案中,gRNA被设计成具有与TIM3的外显子1、外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6、外显子7或外显子8中的目标序列互补或具有互补性的引导序列。

[0149] 在一些实施方案中,引导序列与存在于人类TIM3基因中的目标序列或目标序列的反向互补序列100%或至少95%或90%同一。在一些实施方案中,目标序列可与引导RNA的引导序列互补。在一些实施方案中,引导RNA的引导序列与其对应目标序列之间的互补性或同一性程度可为至少80%、85%、90%或95%;或100%。在一些实施方案中,gRNA的目标序列和引导序列可为100%互补或同一。在其他实施方案中,gRNA的目标序列和引导序列可含有至少一个错配。例如,gRNA的目标序列和引导序列可含有1、2、3或4个错配,其中引导序列的总长度为20。在一些实施方案中,gRNA的目标序列和引导序列可含有1-4个错配,其中引导序列为20个核苷酸。

[0150] 在一些实施方案中,本文所公开的组合物或制剂包含mRNA,其包含编码经RNA引导的DNA结合剂,例如如本文所述的Cas核酸酶的开放阅读框(ORF)。在一些实施方案中,提供、使用或施用mRNA,其包含编码例如Cas核酸酶的经RNA引导的DNA结合剂的ORF。

[0151] B. 经修饰的gRNA和mRNA

[0152] 在一些实施方案中,gRNA经化学修饰。包含一个或多个经修饰的核苷或核苷酸的gRNA被称为“经修饰的”gRNA或“经化学修饰的”gRNA,用于描述代替或外加典型A、G、C和U残基使用的一种或多种非天然或天然存在的组分或构型的存在。在一些实施方案中,经修饰的gRNA经合成具有非典型核苷或核苷酸,在此处称为“经修饰的”。经修饰的核苷和核苷酸可包括以下中的一者或多者:(i) 磷酸二酯主链键联中的非键联磷酸氧中的一者或两者或键联磷酸氧中的一者或多者的改变,例如置换(示例性主链修饰);(ii) 例如核糖上的2'羟基的核糖组分的改变,例如置换(示例性糖修饰);(iii) 用“去磷”接头批量置换磷酸部分(示例性主链修饰);(iv) 天然存在的核碱基的修饰或置换,包括利用非典型核碱基(示例性碱基修饰);(v) 核糖-磷酸主链的置换或修饰(示例性主链修饰);(vi) 寡核苷酸的3'端或5'端的修饰,例如末端磷酸酯基的去除、修饰或置换,或部分、帽或接头的缀合(此类3'或5'帽修饰可包含糖或主链修饰);和(vii) 糖的修饰或置换(示例性糖修饰)。

[0153] 化学修饰(例如以上列出的那些)可经组合以提供经修饰的gRNA或mRNA,其包含可具有两个、三个、四个或更多个修饰的核苷和核苷酸(统称为“残基”)。例如,经修饰的残基可具有经修饰的糖和经修饰的核碱基。在一些实施方案中,gRNA的每一碱基经修饰,例如所有碱基都具有例如硫代磷酸酯基团的经修饰的磷酸酯基。在某些实施方案中,gRNA分子的所有或基本上所有磷酸酯基经硫代磷酸酯基团置换。在一些实施方案中,经修饰的gRNA在RNA的5'端或其附近包含至少一个经修饰的残基。在一些实施方案中,经修饰的gRNA在RNA的3'端或附近包含至少一个经修饰的残基。

[0154] 在一些实施方案中,gRNA包含一、二、三个或更多个经修饰的残基。在一些实施方

案中,经修饰的gRNA中至少5% (例如至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%)的位置为经修饰的核苷或核苷酸。

[0155] 未经修饰的核酸可易于被例如细胞内核酸酶或血清中存在的核酸酶降解。例如,核酸酶可水解核酸磷酸二酯键。因此,在一个方面,本文所述的gRNA可含有一种或多种经修饰的核苷或核苷酸,例如,以引入对细胞内或血清类核酸酶的稳定性。在一些实施方案中,本文所述的经修饰的gRNA分子当被引入体内和离体细胞群体时,可表现出降低的先天性免疫反应。术语“先天性免疫反应”包括对外源核酸(包括单链核酸)的细胞反应,其涉及诱导细胞因子(特别是干扰素)的表达和释放以及细胞死亡。

[0156] 在主链修饰的一些实施方案中,经修饰的残基的磷酸酯基可通过用不同取代基置换一个或多个氧而经修饰。此外,经修饰的残基,例如存在于经修饰的核酸中的经修饰的残基可包括用如本文所描述的经修饰的磷酸酯基批量置换未经修饰的磷酸酯部分。在一些实施方案中,磷酸酯主链的主链修饰可包括产生不带电接头或具有不对称电荷分布的带电接头的更改。

[0157] 经修饰的磷酸酯基的实例包括硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼烷磷酸酯(borano phosphate)、硼烷磷酸酯(borano phosphate ester)、氢膦酸酯、氨基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯和磷酸三酯。未经修饰的磷酸基团中的磷原子是非手性的。然而,用上述原子或原子团中的一者置换非桥氧原子,可使磷原子具有手性。立体异构源磷原子可具有“R”构型(此处为Rp)或“S”构型(此处为Sp)。主链也可通过用氮(桥接磷酰胺酸盐)、硫(桥接硫代磷酸盐)和碳(桥接亚甲基膦酸盐)置换桥接氧(即连接磷酸盐和核苷的氧)来修饰。置换可发生在任一个连接氧上或两个连接氧上。

[0158] 在某些主链修饰中,磷酸基团可被非含磷连接体置换。在一些实施方案中,带电荷的磷酸基团可被中性部分置换。可置换磷酸基的部分的实例可包括但不限于例如膦酸甲酯、羟基氨基、硅氧烷、碳酸盐、羧甲基、氨基甲酸酯、酰胺、硫醚、环氧乙烷接头、磺酸盐、磺酰胺、硫代甲缩醛、甲缩醛、肟、亚甲基亚氨基、亚甲基甲基亚氨基、亚甲基亚胍基、亚甲基二甲基亚胍基和亚甲氧基甲基亚氨基。

[0159] 也可构建可模拟核酸的支架,其中磷酸酯接头和核糖被核酸酶抗性核苷或核苷酸替代物置换。此类修饰可包含主链修饰和糖修饰。在一些实施方案中,核碱基可通过替代主链栓系。实例可包括(但不限于)N-吗啉基、环丁基、吡咯烷和肽核酸(PNA)核苷替代物。

[0160] 经修饰的核苷和经修饰的核苷酸可包括针对糖基的一个或多个修饰,即在糖修饰处。例如,2'羟基(OH)可经修饰,例如被多个不同“氧基”或“脱氧”取代基置换。在一些实施方案中,对2'羟基的修饰可增强核酸的稳定性,因为羟基可不再被去质子化以形成2'-烷氧离子。

[0161] 2'羟基修饰的实例可包括烷氧基或芳氧基(OR,其中“R”可为例如烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖);聚乙二醇(PEG)、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$,其中R可为例如H或任选地被取代的烷基,并且n可为0至20(例如0至4、0至8、0至10、0至16、1至4、1至8、1至10、1至16、1至20、2至4、2至8、2至10、2至16、2至20、4至8、4至10、4至16和4至20)的整数。在一些实施方案中,2'羟基修饰可为2'-O-Me。在一些实施方案中,2'羟基修饰可为2'-氟修饰,所述修饰

用氟置换2'羟基。在一些实施方案中,2'羟基修饰可包括“锁”核酸(LNA),其中2'羟基可例如通过 C_{1-6} 亚烷基或 C_{1-6} 亚杂烷基桥连接至同一核糖的4'碳,其中示例性桥可包括亚甲基、亚丙基、乙醚或氨基桥;O-氨基(其中氨基可以是例如 NH_2 ;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基或二杂芳基氨基、乙二胺或聚氨基)和氨基烷氧基、O $(CH_2)_n$ -氨基(其中氨基可以是例如 NH_2 ;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基或二杂芳基氨基、乙二胺或聚氨基)。在一些实施方案中,2'羟基修饰可包括“解锁”核酸(UNA),其中核糖环缺乏C2'-C3'键。在一些实施方案中,2'羟基修饰可包括甲氧基乙基(MOE)($OCH_2CH_2OCH_3$,例如PEG衍生物)。

[0162] “脱氧”2'修饰可包括氢(即,脱氧核糖,例如在部分dsRNA的突出部分处);卤基(例如溴基、氯基、氟基或碘基);氨基(其中氨基可为例如 NH_2 ;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基、二杂芳基氨基或氨基酸); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$ -氨基(其中氨基可例如如本文所描述)、 $-NHC(O)R$ (其中R可为例如烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖)、氰基;巯基;烷基-巯基-烷基;硫代烷氧基;和可任选地被例如如本文所描述的氨基取代的烷基、环烷基、芳基、烯基和炔基。

[0163] 糖修饰可包含也可含有一个或多个碳的糖基,所述一个或多个碳具有与核糖中的对应碳相反的立体化学构型。因此,经修饰的核酸可包括含有例如阿拉伯糖作为糖的核苷酸。经修饰的核酸也可包括无碱基糖。这些无碱基糖也可进一步在一个或多个组成性糖原子处经修饰。经修饰的核酸也可包括一种或多种呈L形式的糖,例如L-核昔。

[0164] 可并入至经修饰的核酸中的本文中所描述的经修饰的核苷和经修饰的核苷酸可包括经修饰的碱基,也称为核碱基。核碱基的实例包括(但不限于)腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。这些核碱基可经修饰或完全置换以得到可并入至经修饰的核酸中的经修饰的残基。核苷酸的核碱基可独立地选自嘌呤、嘧啶、嘌呤类似物或嘧啶类似物。在一些实施方案中,核碱基可包括例如碱基的天然存在衍生物和合成衍生物。

[0165] 在采用双引导RNA的实施方案中,crRNA和tracrRNA中的每一者可含有修饰。此类修饰可处于crRNA或tracrRNA的一端或两端。在包含sgRNA的实施方案中,sgRNA的一端或两端的一个或多个残基可经化学修饰,或内部核苷可经修饰,或整个sgRNA可经化学修饰。某些实施方案包含5'端修饰。某些实施方案包含3'端修饰。某些实施方案包含5'端修饰和3'端修饰。

[0166] 在一些实施方案中,本文公开的引导RNA包括2017年12月8日提交的名称为“化学修饰的引导RNA”的W02018/107028 A1中公开的修饰模式之一,所述文献的内容特此通过引用整体并入。在一些实施方案中,本文公开的引导RNA包含US20170114334中公开的结构/修饰模式之一,所述文献的内容特此通过引用整体并入。在一些实施方案中,本文公开的引导RNA包含W02017/136794中公开的结构/修饰模式之一,所述文献的内容特此通过引用整体并入。

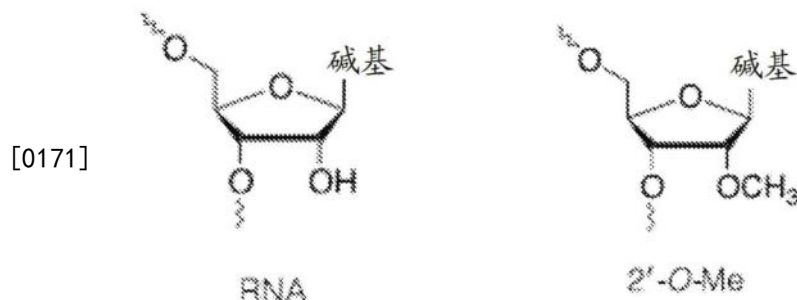
[0167] 在一些实施方案中,sgRNA包含本文所示的任何修饰模式,其中N是任何天然或非天然核苷酸,并且其中全体N包含例如本文表1中所述的TIM3引导序列。在一些实施方案中,经修饰的sgRNA包含以下序列: $mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU$ (SEQ ID NO:300),其中“N”可以是任何天然或非天然核苷

酸,并且其中全体N包含如表1中所述的TIM3引导序列。例如,其中N被本文表1中所公开的任何引导序列置换,任选地其中N被SEQ ID NO:1-88;或SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88;SEQ ID NO:1-4、6-15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86和88;SEQ ID NO:1-5、7、8、12-15、23、26、32、56、59、63、66、75和87;SEQ ID NO:2、4、15、23、56、59、63、75和87;SEQ ID NO:1-4;SEQ ID NO:2、4和15;SEQ ID NO:2、4、15、63和87;SEQ ID NO:2和15;SEQ ID NO:63和87;或SEQ ID NO:15置换。

[0168] 下文所述的任何修饰都可能存在于本文所述的gRNA和mRNA中。

[0169] 术语“mA”、“mC”、“mU”或“mG”可用于表示经2'-O-Me修饰的核苷酸。

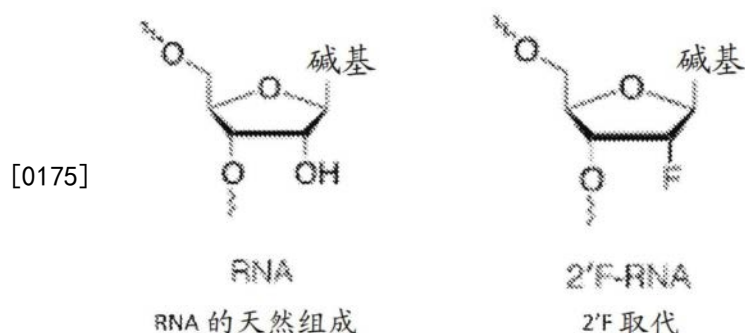
[0170] 2'-O-甲基的修饰可描绘如下:



[0172] 另一种已证明影响核苷酸糖环的化学修饰是卤素取代。例如,核苷酸糖环上的2'-氟(2'-F)取代可增加寡核苷酸的结合亲和力和核酸酶稳定性。

[0173] 在本申请中,术语“fA”、“fC”、“fU”或“fG”可用于表示经2'-F取代的核苷酸。

[0174] 2'-F的取代可描绘如下:



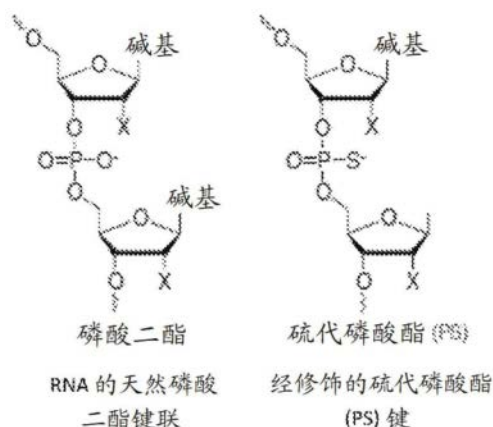
[0176] 硫代磷酸酯(PS)键联或键是指磷酸二酯键联(例如核苷酸碱基之间的键)中,用一个硫取代一个非桥接磷酸氧的键。当使用硫代磷酸酯生成寡核苷酸时,经修饰的寡核苷酸也可称为S-寡核苷酸。

[0177] “*”可用于描绘PS修饰。在本申请中,术语A*、C*、U*或G*可用于表示与下一个(例如3')核苷酸以PS键连接的核苷酸。

[0178] 在本申请中,术语“mA*”、“mC*”、“mU*”或“mG*”可用于表示已经2'-O-Me取代并与下一个(例如3')核苷酸以PS键连接的核苷酸。

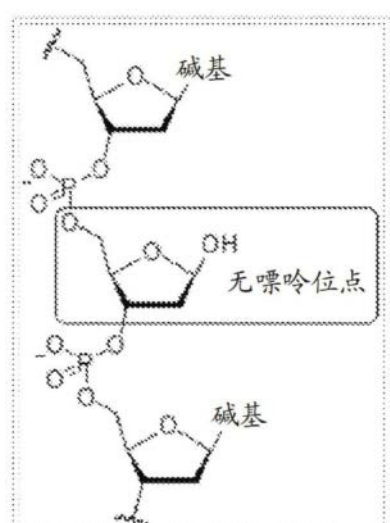
[0179] 下图显示了S-取代成非桥接磷酸氧,从而生成PS键代替磷酸二酯键:

[0180]



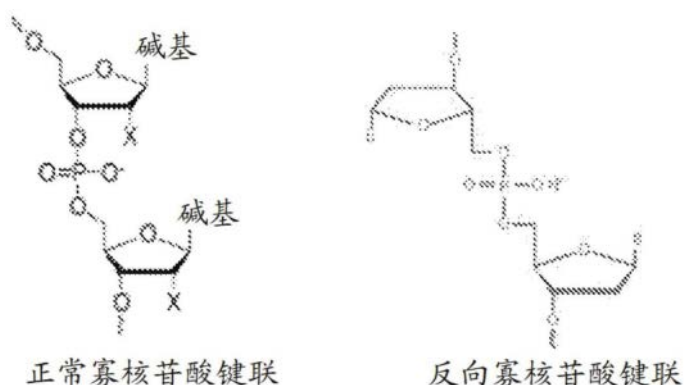
[0181] 无碱基核苷酸是指缺乏含氮碱基的核苷酸。下图描绘了一个缺乏碱基的无碱基 (也称为无嘌呤) 位点的寡核苷酸:

[0182]



[0183] 反向碱基是指具有与正常的5'至3'键联反向的键联的碱基(即5'至5'键联或3'至3键联)。例如:

[0184]



[0185] 无碱基核苷酸可以反向键联连接。例如,无碱基核苷酸可经由5'至5'键联连接到末端5'核苷酸,或无碱基核苷酸可经由3'至3'键联连接到末端3'核苷酸。末端5'或3'核苷酸上的反向无碱基核苷酸也可称为反向无碱基端帽。

[0186] 在一些实施方案中,5'末端的前三个、四个或五个核苷酸中的一个或多个以及3'末端的后三个、四个或五个核苷酸中的一个或多个经修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-Me、2'-F、反向无碱基核苷酸、PS键或本领域众所周知的其他核苷酸修饰,以提高稳定性

或性能。

[0187] 在一些实施方案中,5'末端的前四个核苷酸和3'末端的后四个核苷酸以硫代磷酸酯(PS)键连接。

[0188] 在一些实施方案中,5'末端的前三个核苷酸和3'末端的后三个核苷酸包含2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰核苷酸。在一些实施方案中,5'末端的前三个核苷酸和3'末端的后三个核苷酸包含2'-氟(2'-F)修饰核苷酸。在一些实施方案中,5'末端的前三个核苷酸和3'末端的后三个核苷酸包含反向无碱基核苷酸。

[0189] 在一些实施方案中,引导RNA包含经修饰的sgRNA。在一些实施方案中,sgRNA包含以mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAUAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU(SEQ ID NO:300)所示的修饰模式,其中N是任何天然或非天然核苷酸,并且其中全体N包含将核酸酶导引至TIM3中的目标序列,例如表1中所示的基因组坐标的引导序列。

[0190] 在一些实施方案中,引导RNA包含sgRNA,所述sgRNA包含SEQ ID NO:1-88的引导序列中的任一者和sgRNA的保守部分,例如,以示例性SpyCas9 sgRNA-1所示的sgRNA的保守部分或在表2和整个说明书中所示的gRNA的保守部分。在一些实施方案中,引导RNA包含sgRNA,所述sgRNA包含SEQ ID NO:1-88的引导序列中的任一者和GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGUGCUUUU(SEQ ID NO:202)的核苷酸,其中所述核苷酸位于引导序列的3'端,并且其中sgRNA可如本文中或序列mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAUAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*Mu(SEQ ID NO:300)中所示经修饰。在一些实施方案中,sgRNA包括示例性SpyCas9 sgRNA-1和本文提供的其修饰型式,或如下表3提供的型式,其中全体N包含将核酸酶导引至目标序列的引导序列。每个N独立地经修饰或未经修饰。在某些实施方案中,在没有修饰指示的情况下,核苷酸是未经修饰的RNA核苷酸残基,即核糖和磷酸二酯主链。

[0191] 表3. 示例性sgRNA序列(经修饰和未经修饰型式)

[0192]

引导支架 (未经修饰/ 经修饰)	sgRNA 未经修饰序列	sgRNA 经修饰序列
81/181	(N)20GUUUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUA UCACGAAAGGGCACCG AGUCGGUGC (SEQ ID NO: 401)	mN*mN*mN*(N)17GU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCG UUAUCACGAAAGG GCACCGAGUCGG*m U*mG*mC (SEQ ID NO: 402)
94/194	(N)20GUUUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGGCACCGAG UCGGUGC (SEQ ID NO: 403)	mN*mN*mN*(N)17GU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU* mG*mC (SEQ ID NO: 404)
95/195	(N)20GUUUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGGCACCGAG UCGGUGC (SEQ ID NO: 405)	mN*mN*mN*(N)17GU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU* mG*mC

[0193]

		(SEQ ID NO: 406)
871/971	(N)20GUUUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUA UCACGAAAGGGCACCG AGUCGGUGC (SEQ ID NO: 407)	mN*mN*mN*(N)17m GUUUfUAGmAmGmC mUmAmGmAmAmAm UmAmGmCmAmAGU fUmAfAmAfAmUAm AmGmGmCmUmAGU mCmCGUfUAmUmCA mCmGmAmAmAmGm GmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmG* mU*mG*mC (SEQ ID NO: 408)
872/972	(N)20GUUUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUA UCACGAAAGGGCACCG AGUCGGUGC (SEQ ID NO: 409)	mN*mN*mN*(N)17GU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCG UUAUCACGAAAGG GCACCGAGUCGG*m U*mG*mC (SEQ ID NO: 410)

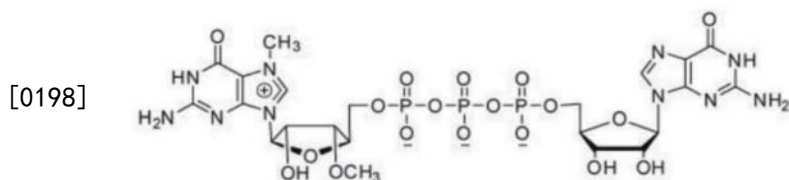
[0194] 如上所述,在一些实施方案中,本文公开的组合物或制剂包含mRNA,所述mRNA包含编码如本文所述的经RNA引导的DNA结合剂(如Cas核酸酶,例如Cas9核酸酶)的开放阅读框(ORF)。在一些实施方案中,提供、使用或施用包含编码经RNA引导的DNA结合剂(如Cas核酸酶,例如Cas9核酸酶)的ORF的mRNA。在一些实施方案中,编码RNA引导的DNA核酸酶的ORF是“经修饰的RNA引导DNA结合剂ORF”或简称“经修饰的ORF”,其用作表示ORF经修饰的简写。

[0195] 在一些实施方案中,mRNA或经修饰ORF可包含至少在一个、多个或所有尿苷位置的经修饰的尿苷。在一些实施方案中,经修饰的尿苷是在5位经修饰的尿苷,例如,经卤素、甲基或乙基修饰的尿苷。在一些实施方案中,经修饰的尿苷是在1位经修饰的假尿苷,例如经卤素、甲基或乙基修饰的假尿苷。例如,经修饰的尿苷可为假尿苷、N1-甲基-假尿苷、5-甲氧基尿苷、5-碘尿苷或其组合。在一些实施方案中,经修饰的尿苷是5-甲氧基尿苷。在一些实施方案中,经修饰的尿苷是5-碘尿苷。在一些实施方案中,经修饰的尿苷是假尿苷。在一些实施方案中,经修饰的尿苷是N1-甲基-假尿苷。在一些实施方案中,经修饰的尿苷是假尿苷和N1-甲基-假尿苷的组合。在一些实施方案中,经修饰的尿苷是假尿苷和5-甲氧基尿苷的组合。在一些实施方案中,经修饰的尿苷是N1-甲基假尿苷和5-甲氧基尿苷的组合。在一些实施方案中,经修饰的尿苷是5-碘尿苷和N1-甲基-假尿苷的组合。在一些实施方案中,经修饰的尿苷是假尿苷和5-碘尿苷的组合。在一些实施方案中,经修饰的尿苷是5-碘尿苷和5-甲氧基尿苷的组合。

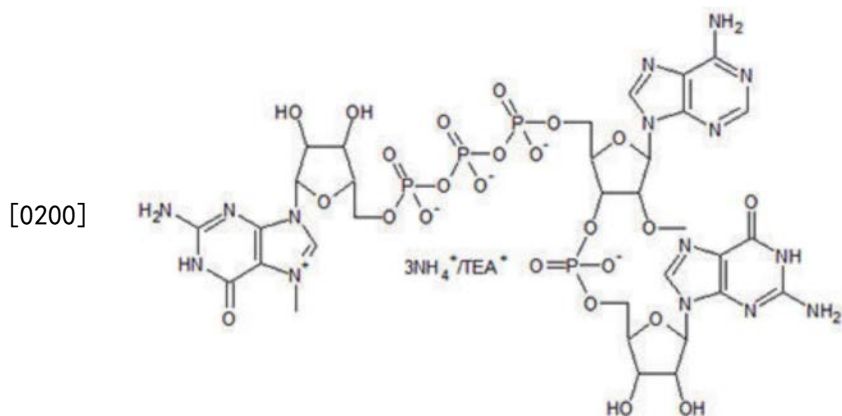
[0196] 在一些实施方案中,本文公开的mRNA包含5'帽,例如Cap0、Cap1或Cap2。5'帽通常为经由5'-三磷酸连接到核酸的5'至3'链的第一核苷酸的5'位的7-甲基鸟嘌呤核糖核苷酸(其可进一步修饰,如下文例如相对于ARCA所论述),即第一帽近端核苷酸。在Cap0中,mRNA的第一与第二帽近端核苷酸的核糖都包含2'-羟基。在Cap1中,mRNA的第一和第二转录核苷

酸的核糖分别包含2'-甲氧基和2'-羟基。在Cap2中,mRNA的第一和第二帽近端核苷酸的核糖都包含2'-甲氧基。参见例如Katibah等人(2014)Proc Natl Acad Sci USA 111(33):12025-30;Abbas等人(2017)Proc Natl Acad Sci USA 114(11):E2106-E2115。包括哺乳动物mRNA(例如人类mRNA)的大多数内源性高等真核mRNA包含Cap1或Cap2。归因于通过先天免疫系统的组分如IFIT-1和IFIT-5识别为“非自体(non-self)”,Cap0和与Cap1和Cap2不同的其他帽结构在哺乳动物如人类中可呈免疫原性,其可导致包括I型干扰素的细胞因子水平升高。先天免疫系统的组分如IFIT-1和IFIT-5也可与eIF4E竞争结合具有除Cap 1或Cap2外的帽的mRNA,从而潜在地抑制mRNA翻译。

[0197] 帽可以共转录方式包括。例如,ARCA(抗反向帽类似物;Thermo Fisher Scientific目录号AM8045)为包含连接到鸟嘌呤核糖核苷酸的5'位的7-甲基鸟嘌呤3'-甲氧基-5'-三磷酸的帽类似物,其可在开始时体外并入转录物中。ARCA产生Cap0帽,其中第一个帽近端核苷酸的2'位为羟基。参见例如Stepinski等人,(2001)“Synthesis and properties of mRNAs containing the novel ‘anti-reverse’ cap analogs 7-methyl (3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG”,RNA 7:1486-1495。ARCA结构显示如下。



[0199] CleanCap™ AG (m7G (5') ppp (5') (2'OMeA) pG;TriLink Biotechnologies目录号 N-7113)或CleanCap™ GG (m7G (5') ppp (5') (2'OMeG) pG;TriLink Biotechnologies目录号 N-7133)可用于以共转录方式提供Cap1结构。CleanCap™ AG和CleanCap™ GG的3'-O-甲基化型式也可分别以目录号N-7413和N-7433获自TriLink Biotechnologies。CleanCap™ AG结构显示如下。



[0201] 或者,可以转录后方式将帽添加至RNA。例如,牛痘加帽酶可商购获得(New England Biolabs目录号M2080S),并且具有由其D1亚基提供的RNA三磷酸酶和鸟苷酸转移酶活性和由其D12亚基提供的鸟嘌呤甲基转移酶。因此,在S-腺苷甲硫氨酸和GTP存在下,可将7-甲基鸟嘌呤添加至RNA,以产生Cap0。参见例如Guo,P.和Moss,B.(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87,4023-4027;Mao,X.和Shuman,S.(1994)J.Biol.Chem.269,24472-24479。

[0202] 在一些实施方案中,mRNA还包含多腺苷酸化(聚A)尾。在一些实施方案中,聚A尾包含至少20、30、40、50、60、70、80、90或100个腺嘌呤,任选地至多300个腺嘌呤。在一些实施方案中,聚A尾包含95、96、97、98、99或100个腺嘌呤核苷酸。

[0203] C.核糖核蛋白复合物

[0204] 在一些实施方案中,涵盖包含一个或多个gRNA的组合物,所述一个或多个gRNA包含来自表1的引导序列或来自表2的一个或多个sgRNA和经RNA引导的DNA结合剂,例如核酸酶,如Cas核酸酶,如Cas9。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂具有裂解酶活性,其也可称为双链核酸内切酶活性。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂包含Cas核酸酶。Cas9核酸酶的实例包括酿脓链球菌(*S. pyogenes*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和其他原核生物(参见例如下一段中的列表)的II型CRISPR系统的那些和其经修饰(例如工程化或突变)型式。参见例如US20160312198;US 20160312199。Cas核酸酶的其他实例包括III型CRISPR系统的Csm或Cmr复合物,或其Cas10、Csm1或Cmr2亚基;和I型CRISPR系统的级联复合物,或其Cas3亚基。在一些实施方案中,Cas核酸酶可来自IIA型、IIB型或IIC型系统。关于各种CRISPR系统和Cas核酸酶的论述,参见例如Makarova等人,NAT.REV.MICROBIOL.9:467-477 (2011);Makarova等人,NAT.REV.MICROBIOL,13:722-36 (2015);Shmakov等人,MOLECULAR CELL,60:385-397 (2015)。

[0205] 可衍生Cas核酸酶的非限制性示例性菌种包括酿脓链球菌、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、链球菌属、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、无害李斯特菌(*Listeria innocua*)、加氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)、新凶手弗朗西斯氏菌(*Francisella novicida*)、产琥珀酸沃廉菌(*Wolinella succinogenes*)、华德萨特菌(*Sutterella wadsworthensis*)、伽马变形菌(*Gammaproteobacterium*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、多杀巴斯德菌(*Pasteurella multocida*)、产琥珀酸纤维杆菌(*Fibrobacter succinogene*)、深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)、达松维尔拟诺卡氏菌(*Nocardiopsis dassonvillei*)、始旋链霉菌(*Streptomyces pristinaespiralis*)、产绿色链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*)、产绿色链霉菌、粉红链孢囊菌(*Streptosporangium roseum*)、粉红链孢囊菌、嗜酸热脂环杆菌(*Alicyclobacillus acidocaldarius*)、假蕈状芽孢杆菌(*Bacillus pseudomycooides*)、砷还原芽孢杆菌(*Bacillus selenitireducens*)、西伯利亚微小杆菌(*Exiguobacterium sibiricum*)、戴白氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)、布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)、海洋微颤菌(*Microscilla marina*)、伯克霍尔德氏细菌(*Burkholderiales bacterium*)、食萘极地单胞菌(*Polaromonas naphthalenivorans*)、单胞菌属(*Polaromonas sp.*)、瓦氏鳄球藻(*Crocospaera watsonii*)、鳄球藻属、铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、聚球藻属(*Synechococcus sp.*)、阿拉伯糖醋杆菌(*Acetohalobium arabaticum*)、根制氨菌(*Ammonifex degensii*)、热解纤维素菌(*Caldicelulosiruptor beccsii*)、脱硫假丝酵母(*Candidatus Desulforudis*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、大芬戈尔德菌(*Finegoldia magna*)、嗜热盐碱厌氧菌(*Natranaerobius thermophilus*)、嗜热丙酸厌氧肠状菌(*Pelotomaculum thermopropionicum*)、嗜酸性喜温硫杆菌(*Acidithiobacillus*

caldus)、嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、酒色异着色菌 (*Allochromatium vinosum*)、海杆菌属 (*Marinobacter* sp.)、嗜盐亚硝化球菌 (*Nitrosococcus halophilus*)、瓦氏亚硝化球菌 (*Nitrosococcus watsoni*)、浮游假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas haloplanktis*)、消旋纤线杆菌 (*Ktedonobacter racemifer*)、发现甲烷耐盐菌 (*Methanohalobium evestigatum*)、变异念珠藻 (*Anabaena variabilis*)、泡沫节球藻 (*Nodularia spumigena*)、念珠藻属 (*Nostoc* sp.)、极大节旋藻 (*Arthrospira maxima*)、钝顶节旋藻 (*Arthrospira platensis*)、节旋藻属、螺旋藻属 (*Lyngbya* sp.)、原型微鞘藻 (*Microcoleus chthonoplastes*)、颤藻属 (*Oscillatoria* sp.)、运动石袍菌 (*Petrotoga mobilis*)、非洲高热杆菌 (*Thermosipho africanus*)、巴氏链球菌 (*Streptococcus pasteurianus*)、灰色奈瑟球菌 (*Neisseria cinerea*)、红嘴鸥弯曲杆菌 (*Campylobacter lari*)、食清洁剂细小棒菌 (*Parvibaculum lavamentivorans*)、白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheria*)、氨基酸球菌属 (*Acidaminococcus* sp.)、毛螺科菌 (*Lachnospiraceae* bacterium) ND2006 和海洋无核氯菌 (*Acaryochloris marina*)。

[0206] 在一些实施方案中,Cas核酸酶为来自酿脓链球菌的Cas9核酸酶。在一些实施方案中,Cas核酸酶为来自嗜热链球菌的Cas9核酸酶。在一些实施方案中,Cas核酸酶为来自脑膜炎奈瑟氏菌的Cas9核酸酶。在一些实施方案中,Cas核酸酶为来自金黄色葡萄球菌的Cas9核酸酶。在一些实施方案中,Cas核酸酶为来自新凶手弗朗西斯氏菌的Cpf1核酸酶。在一些实施方案中,Cas核酸酶为来自氨基酸球菌属的Cpf1核酸酶。在一些实施方案中,Cas核酸酶为来自毛螺科菌ND2006的Cpf1核酸酶。在其他实施方案中,Cas核酸酶为来自以下的Cpf1核酸酶:土拉热弗朗西丝菌 (*Francisella tularensis*)、毛螺科菌、瘤胃溶纤维丁酸弧菌 (*Butyrivibrio proteoclasticus*)、佩氏细菌 (*Peregrinibacteria bacterium*)、帕库氏菌 (*Parcubacteria bacterium*)、史密斯氏菌 (*Smithella*)、氨基酸球菌属、白蚁甲烷支原体菌候选种 (*Candidatus Methanoplasma termitum*)、挑剔真杆菌 (*Eubacterium eligens*)、牛眼莫拉菌 (*Moraxella bovoculi*)、稻田钩端螺旋体 (*Leptospira inadai*)、狗口腔卟啉单胞菌 (*Porphyromonas crevioricanis*)、解糖脲普雷沃菌 (*Prevotella disiens*) 或猕猴卟啉单胞菌 (*Porphyromonas macacae*)。在某些实施方案中,Cas核酸酶为来自氨基酸球菌属或毛螺科菌的Cpf1核酸酶。

[0207] 在一些实施方案中,gRNA连同经RNA引导的DNA结合剂一起称为核糖核蛋白复合物 (RNP)。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂为Cas核酸酶。在一些实施方案中,gRNA连同Cas核酸酶一起称为Cas RNP。在一些实施方案中,RNP包含I型、II型或III型组分。在一些实施方案中,Cas核酸酶为来自II型CRISPR/Cas系统的Cas9蛋白质。在一些实施方案中,gRNA连同Cas9一起称为Cas9 RNP。

[0208] 野生型Cas9具有两个核酸酶结构域:RuvC和HNH。RuvC结构域裂解非目标DNA链,并且HNH结构域裂解目标DNA链。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含多于一个RuvC结构域和/或多于一个HNH结构域。在一些实施方案中,Cas9蛋白质为野生型Cas9。在组合物、用途和方法实施方案中的每一者中,Cas诱导目标DNA中的双链断裂。

[0209] 在一些实施方案中,使用嵌合Cas核酸酶,其中所述蛋白质的一个结构域或区域被不同蛋白质的一部分置换。在一些实施方案中,Cas核酸酶结构域可被来自例如Fok1的不同核酸酶的结构域置换。在一些实施方案中,Cas核酸酶可为经修饰的核酸酶。

[0210] 在其他实施方案中,Cas核酸酶可来自I型CRISPR/Cas系统。在一些实施方案中,Cas核酸酶可为I型CRISPR/Cas系统的级联复合物的组分。在一些实施方案中,Cas核酸酶可为Cas3蛋白。在一些实施方案中,Cas核酸酶可来自III型CRISPR/Cas系统。在一些实施方案中,Cas核酸酶可具有RNA裂解活性。

[0211] 在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂具有单链切口酶活性,即可切割一个DNA链以产生单链断裂,所述单链断裂也称为“切口”。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂包含Cas切口酶。切口酶为在dsDNA中产生切口,即切割DNA双螺旋的一条链但不切割另一条链的酶。在一些实施方案中,Cas切口酶为其中例如通过催化结构域中的一种或多种改变(例如点突变)使核酸内切活性位点失活的Cas核酸酶(例如上文所论述的Cas核酸酶)的型式。关于Cas切口酶和示例性催化结构域改变的论述,参见例如美国专利第8,889,356号。在一些实施方案中,Cas切口酶如Cas9切口酶具有失活的RuvC或HNH结构域。

[0212] 在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂经修饰而仅含有一个功能核酸酶结构域。例如,药剂蛋白质可经修饰以使得核酸酶结构域中的一者经突变或完全或部分缺失以降低其核酸裂解活性。在一些实施方案中,使用具有活性降低的RuvC结构域的切口酶。在一些实施方案中,使用具有非活性RuvC结构域的切口酶。在一些实施方案中,使用具有活性降低的HNH结构域的切口酶。在一些实施方案中,使用具有非活性HNH结构域的切口酶。

[0213] 在一些实施方案中,Cas蛋白质核酸酶结构域内的保守氨基酸经取代以降低或改变核酸酶活性。在一些实施方案中,Cas核酸酶可包含RuvC或RuvC样核酸酶结构域中的氨基酸取代。RuvC或RuvC样核酸酶结构域中的示例性氨基酸取代包括D10A(基于酿脓链球菌Cas9蛋白质)。参见例如Zetsche等人,(2015)Cell 10月22:163(3):759-771。在一些实施方案中,Cas核酸酶可包含HNH或HNH样核酸酶结构域中的氨基酸取代。HNH或HNH样核酸酶结构域中的示例性氨基酸取代包括E762A、H840A、N863A、H983A和D986A(基于酿脓链球菌Cas9蛋白质)。参见例如Zetsche等人(2015)。其他示例性氨基酸取代包括D917A、E1006A和D1255A(基于新凶手弗朗西斯氏菌U 112 Cpf1(FnCpf1)序列(UniProtKB-A0Q7Q2(CPF1_FRATN)))。

[0214] 在一些实施方案中,编码切口酶的mRNA将与一对分别与目标序列的有义链和反义链互补的引导RNA组合提供。在此实施方案中,引导RNA将切口酶导引至目标序列并且通过在目标序列的相对链上产生切口而引入DSB(即双切口)。在一些实施方案中,使用双切口可改进特异性并减少脱靶效应。在一些实施方案中,切口酶连同靶向DNA的相对链的两个单独引导RNA使用以在目标DNA中产生双切口。在一些实施方案中,切口酶连同经选择以非常接近的两个单独引导RNA使用以在目标DNA中产生双切口。

[0215] 在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂缺乏裂解酶和切口酶活性。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂包含dCas DNA结合多肽。dCas多肽具有DNA结合活性,而基本上缺乏催化(裂解酶/切口酶)活性。在一些实施方案中,dCas多肽为dCas9多肽。在一些实施方案中,缺乏裂解酶和切口酶活性的经RNA引导的DNA结合剂或dCas DNA结合多肽为其中例如通过催化结构域的一种或多种改变(例如点突变)而使核酸内切活性位点失活的Cas核酸酶的型式(例如上文所论述的Cas核酸酶)。参见例如US20140186958;US 20150166980。

[0216] 在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂包含一个或多个异源功能域(例如为或包含融合多肽)。

[0217] 在一些实施方案中,异源功能域可促进将经RNA引导的DNA结合剂输送至细胞核

中。例如,异源功能域可为核定域信号(NLS)。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂可与1-10个NLS融合。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂可与1-5个NLS融合。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂可与一个NLS融合。在使用一个NLS的情况下,NLS可连接在经RNA引导的DNA结合剂序列的N末端或C末端。它也可插入在经RNA引导的DNA结合剂序列内。在其他实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂可与多于一个NLS融合。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂可与2、3、4或5个NLS融合。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂可与两个NLS融合。在某些情形下,两个NLS可相同(例如两个SV40 NLS)或不同。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂与在羧基末端连接的两个SV40 NLS序列融合。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂可与两个NLS融合,一个NLS连接在N末端并且一个连接在C末端。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂可与3个NLS融合。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂可不与NLS融合。在一些实施方案中,NLS可为单联(monopartite)序列,例如SV40 NLS、PKKKRKV (SEQ ID NO:115) 或PKKKRRV (SEQ ID NO:116)。在一些实施方案中,NLS可为双联序列,例如核质蛋白的NLS、KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO:117)。在一个特定实施方案中,单一PKKKRKV (SEQ ID NO:115) NLS可连接在经RNA引导的DNA结合剂的C末端。一个或多个接头任选地包括在融合位点处。

[0218] 在一些实施方案中,异源功能域可能能够修改经RNA引导的DNA结合剂的细胞内半衰期。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂的半衰期可得以提高。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂的半衰期可得以降低。在一些实施方案中,异源功能域可能能够增加经RNA引导的DNA结合剂的稳定性。在一些实施方案中,异源功能域可能能够降低经RNA引导的DNA结合剂的稳定性。在一些实施方案中,异源功能域可充当蛋白质降解的信号肽。在一些实施方案中,蛋白质降解可由蛋白水解酶,例如蛋白酶体、溶酶体蛋白酶或钙蛋白酶(calpain)蛋白酶介导。在一些实施方案中,异源功能域可包含PEST序列。在一些实施方案中,经RNA引导的DNA结合剂可通过添加泛素或多泛素链来修饰。在一些实施方案中,泛素可为泛素样蛋白质(UBL)。泛素样蛋白质的非限制性实例包括小泛素样修饰因子(SUMO)、泛素交叉反应蛋白(UCRP,也称为干扰素刺激基因-15(ISG15))、泛素相关修饰因子-1(URM1)、神经元-前体细胞-细胞表达的发育下调蛋白-8(NEDD8,在酿酒酵母中被称为Rub1)、人类白细胞抗原F相关(FAT10)、自噬-8(ATG8)和自噬-12(ATG12)、Fau泛素样蛋白(FUB1)、膜锚定UBL(MUB)、泛素折叠修饰因子-1(UFM1)和泛素样蛋白-5(UBL5)。

[0219] 在一些实施方案中,异源功能域可为标记域。标记域的非限制性实例包括荧光蛋白、纯化标签、表位标签和报告基因序列。在一些实施方案中,标记域可为荧光蛋白。适合的荧光蛋白的非限制实例包括绿色荧光蛋白(例如,GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、sfGFP、EGFP、Emerald、Azami Green、Monomeric Azami Green、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1)、黄色荧光蛋白(例如,YFP、EYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1)、蓝色荧光蛋白(例如,EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal、GFPuv、Sapphire、T-sapphire)、青色荧光蛋白(例如,ECFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan)、红色荧光蛋白(例如,mKate、mKate2、mPlum、DsRed monomer、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed-Monomer、HcRed-Tandem、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、Jred)和橙色荧光蛋白(mOrange、mKO、Kusabira-Orange、Monomeric Kusabira-Orange、mTangerine、tdTomato)或任何其他合适的荧光蛋白。在其他实施方案中,标记域可为纯化标签或表位标签。非限制性

的示例性标签包括谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、壳质结合蛋白(CBP)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、硫氧还蛋白(TRX)、聚(NANP)、串联亲和纯化(TAP)标签、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、FLAG、HA、nus、Softag 1、Softag 3、Strep、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、S1、T7、V5、VSV-G、6xHis、8xHis、生物素羧基载体蛋白质(BCCP)、聚His和调钙蛋白。非限制性的示例性报告基因包括谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、辣根过氧化物酶(HRP)、氯霉素乙酰基转移酶(CAT)、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酶、荧光素酶或荧光蛋白。

[0220] 在其他实施方案中,异源功能域可将经RNA引导的DNA结合剂靶向至特定细胞器、细胞型、组织或器官。在一些实施方案中,异源功能域可将经RNA引导的DNA结合剂靶向至线粒体。

[0221] 在其他实施方案中,异源功能域可为效应结构域。当经RNA引导的DNA结合剂导引至其目标序列时,例如当Cas核酸酶通过gRNA导引至目标序列时,效应结构域可修饰或影响目标序列。在一些实施方案中,效应结构域可选自核酸结合结构域、核酸酶结构域(例如非Cas核酸酶结构域)、表观基因修饰结构域、转录活化结构域或转录抑制结构域。在一些实施方案中,异源功能域为核酸酶,例如FokI核酸酶。参见例如美国专利第9,023,649号。在一些实施方案中,异源功能域为转录激活因子或抑制子。参见例如Qi等人,“Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression”,*Cell* 152:1173-83 (2013);Perez-Pinera等人,“RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors”,*Nat.Methods* 10:973-6 (2013);Mali等人,“CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering”,*Nat.Biotechnol.* 31:833-8(2013);Gilbert等人,“CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes”,*Cell* 154:442-51(2013)。因此,经RNA引导的DNA结合剂基本上变成可使用引导RNA导引以结合所需目标序列的转录因子。在一些实施方案中,异源功能域是一种脱氨酶,如胞苷脱氨酶或腺嘌呤脱氨酶。在某些实施方案中,异源功能域是C至T碱基转换器(胞苷脱氨酶),如脱脂蛋白B mRNA编辑酶(APOBEC)脱氨酶。

[0222] D. 测定gRNA的功效

[0223] 在一些实施方案中,当与形成RNP的其他组分一起递送或表达时,测定gRNA的功效。在一些实施方案中,gRNA与经RNA引导的DNA结合剂(如Cas蛋白,例如Cas9)一起表达。在一些实施方案中,将gRNA递送至已稳定表达经RNA引导的DNA核酸酶(如Cas核酸酶或切口酶,例如Cas9核酸酶或切口酶)的细胞系中或在所述细胞系中表达。在一些实施方案中,gRNA作为RNP的一部分递送至细胞。在一些实施方案中,将gRNA与编码经RNA引导的DNA核酸酶(如Cas核酸酶或切口酶,例如Cas9核酸酶或切口酶)的mRNA一起递送至细胞中。

[0224] 如本文所述,使用本文公开的RNA引导的DNA核酸酶和引导RNA可导致DNA中的双链断裂,其在通过细胞机制修复时会产生插入/缺失(indel)突变形式的错误。由插入/缺失引起的许多突变会改变阅读框,或引入过早终止密码子,并且因此产生非功能性蛋白质。在一些实施方案中,特定gRNA的功效是根据体外模型确定的。在一些实施方案中,体外模型是稳定表达Cas9的HEK293细胞(HEK293_Cas9)。在一些实施方案中,体外模型是外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,体外模型是T细胞,例如原代人类T细胞。关于使用原代细胞,可使用市售原代细胞以提高实验之间的一致性。在一些实施方案中,确定体外模型中(例如T

细胞中)发生缺失或插入的脱靶位点的数目,例如通过分析用Cas9 mRNA和引导RNA体外转染细胞的基因组DNA。在一些实施方案中,此种测定包括分析用Cas9 mRNA、引导RNA和供体寡核苷酸体外转染细胞的基因组DNA。在使用HEK293细胞、PBMC和人类CD3+T细胞的工作实施例中提供了此类测定的示例性程序。

[0225] 在一些实施方案中,在用于gRNA选择过程的多个体外细胞模型上测定特定gRNA的功效。在一些实施方案中,利用所选gRNA进行细胞系数据比较。在一些实施方案中,进行多个细胞模型中的交叉筛选。

[0226] 在一些实施方案中,通过TIM3的插入/缺失百分比或基因修饰百分比来测量引导RNA的功效。在一些实施方案中,通过TIM3基因座处的插入/缺失百分比或基因修饰百分比来测量引导RNA的功效。在一些实施方案中,通过TIM3在表1或表2的基因组坐标处的插入/缺失百分比或基因修饰百分比来测量引导RNA的功效。在一些实施方案中,TIM3的编辑百分比与实现TIM3蛋白产物敲低所需的插入/缺失百分比或基因修饰百分比进行比较。在一些实施方案中,通过减少或消除TIM3蛋白的表达来测量引导RNA的功效。在实施方案中,所述TIM3蛋白表达的减少或消除是通过流式细胞术测量的,例如如本文所述。

[0227] 在一些实施方案中,使用本文公开的方法和组合物的细胞群体中的TIM3蛋白表达减少或消除。在一些实施方案中,如通过流式细胞术所测量,相对于未经修饰细胞群体,细胞群体的TIM3阴性率为至少65%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0228] “未经修饰细胞”(unmodified cell/unmodified cells)是指实验或测试中相同细胞类型的对照细胞(control cell/control cells),其中“未经修饰的”对照细胞尚未与TIM3引导物接触。因此,未经修饰细胞(unmodified cell/unmodified cells)可为尚未与引导RNA接触的细胞,或已与不靶向TIM3的引导RNA接触的细胞。

[0229] 在一些实施方案中,引导RNA的功效是通过目标细胞类型(如T细胞)的基因组内的脱靶序列处的插入/缺失或基因修饰的数目或频率来测量。在一些实施方案中,提供了有效引导RNA,其在细胞群体中或相对于目标位点处的插入/缺失产生频率在脱靶位点以极低频率(例如<5%)产生插入/缺失。因此,本公开提供了引导RNA,其并未表现出目标细胞类型(例如T细胞)中的脱靶插入/缺失形成,或其在细胞群体中或相对于目标位点处的插入/缺失产生频率产生<5%的脱靶插入/缺失形成频率。在一些实施方案中,本公开提供了并未表现出目标细胞类型(例如T细胞)中的任何脱靶插入/缺失形成的引导RNA。在一些实施方案中,例如如通过一种或多种本文所述方法所评价,提供了在少于5个脱靶位点产生插入/缺失的引导RNA。在一些实施方案中,例如如通过一种或多种本文所述方法所评价,提供了在少于或等于4、3、2或1个脱靶位点产生插入/缺失的引导RNA。在一些实施方案中,脱靶位点不出现在目标细胞(例如肝细胞)基因组中的蛋白质编码区中。

[0230] 在一些实施方案中,检测目标DNA中的基因编辑事件如插入/缺失(“indel”)突变成和插入或同源定向修复(HDR)事件利用了具有经标记引物的线性扩增并且分离经标记的扩增产物(下文称为“LAM-PCR”,或“线性扩增(LA)”方法)。在一些实施方案中,引导RNA的功效是通过包含基因表达蛋白产物的功能蛋白复合物的水平来测量的。在一些实施方案中,引导RNA的功效是通过TCR表达的流式细胞术分析来测量,通过所述方法分析活编辑细胞群体的TCR损失。

[0231] E.T细胞受体(TCR)

[0232] 在一些实施方案中,包含例如对编码TIM3的内源核酸序列进行基因修饰的工程化细胞或细胞群体还包含编码TCR基因序列(例如TRAC或TRBC)的内源核酸序列的修饰(例如敲低)。

[0233] 在一些实施方案中,包含对编码TIM3的内源核酸序列进行基因修饰(例如敲低)并将编码靶向受体的异源序列插入细胞中的工程化细胞或细胞群体还包含对编码TCR基因序列(例如TRAC或TRBC)的内源核酸序列进行修饰(例如敲低)。

[0234] 一般来说,TCR是一种异源二聚体受体分子,其包含两条TCR多肽链,即 α 和 β 。本领域已知适于靶向以用于敲低的 α 和 β 基因组序列或基因座。在一些实施方案中,工程化T细胞包含对TCR α 链基因序列(例如TRAC)的修饰(例如敲低)。参见例如NCBI基因ID:28755; Ensembl:ENSG00000277734(T细胞受体 α 恒定)、US 2018/0362975和WO2020081613。

[0235] 在一些实施方案中,工程化细胞或细胞群体包含编码TIM3的内源核酸序列的基因修饰、编码TCR基因序列(例如TRAC或TRBC)的内源核酸序列的基因修饰(例如敲低);以及MHC I类基因(例如B2M或HLA-A)的修饰(例如敲低)。在一些实施方案中,MHC I类基因是HLA-B基因或HLA-C基因。

[0236] 在一些实施方案中,工程化细胞或细胞群体包含编码TIM3的内源核酸序列的基因修饰和编码TCR基因序列(例如TRAC或TRBC)的内源核酸序列的基因修饰(例如敲低);以及MHC II类基因(例如CIITA)的基因修饰(例如敲低)。

[0237] 在一些实施方案中,工程化细胞或细胞群体包含编码TIM3的内源核酸序列的修饰,编码TCR基因序列(例如TRAC或TRBC)的内源核酸序列的基因修饰(例如敲低);以及检查点抑制剂基因(例如LAG3、2B4或PD-1)的基因修饰(例如敲低)。

[0238] 在一些实施方案中,工程化细胞或细胞群体包含如通过测序(例如NGS)评估的TIM3基因的基因修饰,其中至少50%、55%、60%、65%,优选至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的细胞包含内源TIM3序列的插入、缺失或取代。在一些实施方案中,群体中至少50%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。在一些实施方案中,群体中至少55%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。在一些实施方案中,群体中至少60%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。在一些实施方案中,群体中至少65%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。在一些实施方案中,群体中至少70%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。在一些实施方案中,群体中至少75%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。在一些实施方案中,群体中至少85%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。在一些实施方案中,群体中至少70%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。在一些实施方案中,群体中至少90%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。在一些实施方案中,群体中至少95%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。在一些实施方案中,与例如其中TIM3基因未经修饰的合适对照相比,TIM3降低至少50%、55%、60%、65%,优选至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,或降至低于测定法的检测限。在一些实施方案中,与例如其中TIM3基因未经修饰的合适对照相比,TIM3的表达降低至少50%,或降至低于测定法的检测限。在一些实施方案中,与例如其中TIM3基因未经修饰的

合适对照相比, TIM3的表达降低至少55%, 或降至低于测定法的检测限。在一些实施方案中, 与例如其中TIM3基因未经修饰的合适对照相比, TIM3的表达降低至少60%, 或降至低于测定法的检测限。在一些实施方案中, 与例如其中TIM3基因未经修饰的合适对照相比, TIM3的表达降低至少65%, 或降至低于测定法的检测限。在一些实施方案中, 与例如其中TIM3基因未经修饰的合适对照相比, TIM3的表达降低至少70%, 或降至低于测定法的检测限。一些实施方案, 与例如其中TIM3基因未经修饰的合适对照相比, TIM3的表达降低至少80%, 或降至低于测定法的检测限。在一些实施方案中, 与例如其中TIM3基因未经修饰的合适对照相比, TIM3的表达降低至少90%, 或降至低于测定法的检测限。在一些实施方案中, 与例如其中TIM3基因未经修饰的合适对照相比, TIM3的表达降低至少95%, 或降至低于测定法的检测限。TIM3蛋白和mRNA表达的测定法是本领域中已知的。

[0239] 在一些实施方案中, 工程化细胞或细胞群体包含通过基因编辑对TCR基因序列的修饰(例如敲低), 例如, 如通过测序(例如NGS)所评估, 其中至少50%、55%、60%、65%, 优选至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的细胞包含内源TCR基因序列的插入、缺失或取代。在一些实施方案中, 与例如其中TCR基因未经修饰的合适对照相比, TCR降低至少50%、55%、60%、65%, 优选至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%, 或降至低于测定法的检测限。在某些实施方案中, TCR是TRAC或TRBC。TCR蛋白和mRNA表达的测定法是本领域中已知的。

[0240] 在一些实施方案中, 工程化细胞或细胞群体包含通过基因编辑插入编码靶向受体的序列, 例如, 如通过测序(例如NGS)所评估。

[0241] 在一些实施方案中, 使用特异性靶向TCR基因(例如TRAC基因)内位点的引导RNA来提供对TCR基因的修饰(例如敲低)。

[0242] 在一些实施方案中, 使用引导RNA与经RNA引导的DNA结合剂在T细胞中对TCR基因进行修饰(例如敲低)。在一些实施方案中, 本文公开了通过诱导T细胞的TCR基因内的断裂(例如双链断裂(DSB)或单链断裂(切口))而工程化的T细胞, 例如使用引导RNA与经RNA引导的DNA结合剂(例如CRISPR/Cas系统)。所述方法可例如体外或离体用于制造抑制免疫反应的细胞产物。

[0243] 在一些实施方案中, 引导RNA通过经RNA引导的DNA结合剂(例如Cas核酸酶)在TCR基因内本文所述位点处介导靶特异性切割。应理解, 在一些实施方案中, 引导RNA包含与所述区域结合或能够与所述区域结合的引导序列。

[0244] III. 方法和用途, 包括治疗方法和用途以及制备工程化细胞或免疫疗法试剂的方法

[0245] 本文公开的gRNA以及相关方法和组合物可用于制造免疫疗法试剂, 如工程化细胞。

[0246] 在一些实施方案中, 包含表1的引导序列的gRNA与RNA引导的DNA核酸酶如Cas核酸酶一起诱导DSB, 并且在修复期间的非同源末端连接(NHEJ)导致TIM3基因中的修饰。在一些实施方案中, NHEJ导致一个或多个核苷酸的缺失或插入, 其诱导TIM3基因中的移码或无义突变。在某些实施方案中, 包含靶向TCR序列(例如TRAC和TRBC)的引导序列的gRNA也与RNA引导的DNA核酸酶如Cas核酸酶一起或单独递送至细胞, 以对TCR序列进行基因修饰以抑制全长TCR序列的表达。在某些实施方案中, gRNA是sgRNA。

[0247] 在一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,受试者是人类。在一些实施方案中,受试者是非人灵长类动物

[0248] 在一些实施方案中,引导RNA、组合物和制剂用于离体产生细胞,例如免疫细胞,例如TIM3基因中具有基因修饰的T细胞。经修饰的T细胞可为自然杀伤(NK)T细胞。经修饰的T细胞可表达T细胞受体,如通用TCR或经修饰的TCR。T细胞可表达CAR或带有 ζ 链信号传导基序的CAR构建体。

[0249] gRNA组合物的递送

[0250] 脂质纳米粒子(LNP)是用于递送核苷酸和蛋白质货物(cargo)的众所周知的手段,并且可用于离体和体外递送本文所公开的引导RNA和组合物。在一些实施方案中,LNP递送核酸、蛋白质、或核酸以及蛋白质。

[0251] 在一些实施方案中,本发明包括一种用于将本文公开的细胞或细胞群体中的任一者递送至受试者的方法,其中gRNA是经由LNP递送。在一些实施方案中,gRNA/LNP也与Cas9或编码Cas9的mRNA缔合。

[0252] 在一些实施方案中,本发明包含一种组合物,所述组合物包含所公开的任一种gRNA和一种LNP。在一些实施方案中,所述组合物还包含Cas9或编码Cas9的mRNA。

[0253] 在一些实施方案中,与本文公开的gRNA缔合的LNP用于制备细胞,作为治疗疾病或病症的药物。

[0254] 电穿孔为用于递送货物的众所周知的手段,并且任何电穿孔方法都可用于递送本文所公开的任一种gRNA。在一些实施方案中,电穿孔可用于递送本文所公开的任一种gRNA和Cas9或编码Cas9的mRNA。

[0255] 在一些实施方案中,本发明包含一种向离体细胞递送本文所公开的任一种gRNA的方法,其中gRNA与LNP缔合或不与LNP缔合。在一些实施方案中,gRNA/LNP或gRNA也与Cas9或编码Cas9的mRNA缔合。

[0256] 在一些实施方案中,单独或在一个或多个载体上编码的本文所述的引导RNA组合物是在脂质纳米粒子中配制或经由脂质纳米粒子施用;参见例如W02017/173054和W02021/222287,其各自内容通过引用整体并入本文。

[0257] 在某些实施方案中,本发明包含DNA或RNA载体,其编码包含本文所述的引导序列中的任一者或多者的任一种引导RNA。在一些实施方案中,除了引导RNA序列以外,载体还包含不编码引导RNA的核酸。不编码引导RNA的核酸包括(但不限于)启动子、增强子、调控序列和编码经RNA引导的DNA核酸酶(其可为例如Cas9的核酸酶)的核酸。在一些实施方案中,载体包含一个或多个编码crRNA、trRNA、或crRNA和trRNA的核苷酸序列。在一些实施方案中,载体包含一个或多个编码sgRNA的核苷酸序列和编码经RNA引导的DNA核酸酶(其可为Cas核酸酶,如Cas9或Cpf1)的mRNA。在一些实施方案中,载体包含一个或多个编码crRNA、trRNA的核苷酸序列,和编码经RNA引导的DNA核酸酶(其可为Cas蛋白,如Cas9)的mRNA。在一个实施方案中,Cas9来自酿脓链球菌(即Spy Cas9)。在一些实施方案中,编码crRNA、trRNA、或crRNA和trRNA(其可为sgRNA)的核苷酸序列包含以下或由以下组成:由来自天然存在的CRISPR/Cas系统的重复序列的全部或一部分侧接的引导序列。包含crRNA、trRNA、或crRNA和trRNA或由crRNA、trRNA、或crRNA和trRNA组成的核酸可进一步构成载体序列,其中所述载体序列包含以下或由以下组成:不会与crRNA、trRNA、或crRNA和trRNA一起天然存在的核

酸。

[0258] 在一些实施方案中,所述组分可以裸核酸的形式引入,也可以与例如脂质体或泊洛沙姆(poloxamer)的剂复合的核酸形式引入,或者它们可通过病毒载体(例如腺病毒、AAV、疱疹病毒、逆转录病毒、慢病毒)递送。非病毒递送核酸的方法和组合物包括电穿孔、脂质转染、显微注射、基因枪(biolistics)、病毒体、脂质体、免疫脂质体、LNP、聚阳离子或脂质:核酸缀合物、裸核酸(例如裸DNA/RNA)、人工病毒粒子以及DNA的剂增强吸收。使用例如Sonitron 2000系统(Rich-Mar)进行的声穿孔也可用于递送核酸。

[0259] 本说明书和示例性实施方案不应被视为限制性的。对本说明书和所附权利要求书来说,除非另有说明,否则所有表示数量、百分比或比例的数字,以及本说明书和权利要求书中使用的其他数值,均应理解为在所有情况下都被术语“约”修饰,只要它们尚未被修饰。因此,除非有相反指示,否则以下说明书和所附权利要求书中所阐述的数值参数是可根据设法获得的所需特性而变化的近似值。至少,并且不试图将均等论的应用限于权利要求的范围,每个数值参数至少应根据所报告的有效数字的个数并且通过应用普通舍入技术来解释。

[0260] 实施例

[0261] 提供以下实施例以说明某些所公开实施方案并且不应视为以任何方式限制本公开的范围。

[0262] 实施例1-材料和方法

[0263] 下一代测序(“NGS”)和在靶裂解效率分析

[0264] 根据制造商的方案,使用QuickExtract™ DNA提取溶液(Lucigen,目录号QE09050)提取基因组DNA。

[0265] 为了定量测定基因组中目标位置的编辑效率,使用深度测序来鉴定通过基因编辑引入的插入和缺失的存在。围绕所关注基因(例如TIM3)内的目标位点设计PCR引物,并且扩增所关注基因组区域。按本领域中的标准进行引物序列设计。根据制造商方案(Illumina)进行额外PCR以添加化学物用于测序。在Illumina MiSeq仪器上对扩增子进行测序。在消除具有低质量评分的那些读段之后,将读段与人类参考基因组(例如,hg38)进行比对。由此产生的含有读段的文件被映射到参考基因组(BAM文件),其中选择与所关注的目标区域重叠的读段,并计算野生型读段的数量对比含有插入或缺失(“插入/缺失”)的读段的数量。

[0266] 如实施例中使用的编辑百分比(例如“编辑效率”或“插入/缺失百分比”)被定义为具有插入或缺失(“插入/缺失”)的序列读段总数与包括野生型在内的序列读段总数之比。

[0267] 制备脂质纳米粒子。

[0268] 除非另外说明,否则以各种摩尔比将脂质组分溶解于100%乙醇中。将RNA货物(例如,Cas9 mRNA和sgRNA)溶解于25mM柠檬酸盐缓冲液、100mM NaCl(pH 5.0)中,产生大致0.45mg/mL的RNA货物浓度。

[0269] 除非另外说明,否则脂质核酸组装体含有摩尔比分别为50:38:9:3的可离子化脂质A(十八碳-9,12-二烯酸(9Z,12Z)-3-((4,4-双(辛氧基)丁酰基)氧基)-2-(((3-(二乙氨基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯,也称为(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯酸3-((4,4-双(辛氧基)丁酰基)氧基)-2-(((3-(二乙氨基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯)、胆固醇、DSPC和PEG2k-DMG。除非另外说明,否则脂质核酸组装体以约6的脂质胺与RNA磷酸酯(N:P)摩尔比

和按重量计1:1或1:2的gRNA与mRNA的比率配制。

[0270] 使用交叉流技术,利用含脂质的乙醇与两个体积的RNA溶液和一个体积的水的冲击射流混合来制备脂质纳米粒子(LNP)。经由混合交叉使含脂质的乙醇与两个体积的RNA溶液混合。经由线内T形管将第四水流与十字的出口流混合(参见W02016010840图2)。将LNP在室温(RT)下保持1小时并且进一步用水稀释(大约1:1v/v)。LNP在平板滤筒(Sartorius, 100kD MWC0)上使用切向流过滤浓缩,并且使用PD-10脱盐柱(GE)将其缓冲液交换至50mM Tris、45mM NaCl、5% (w/v) 蔗糖, pH 7.5(TSS)中。或者,任选地使用100kDa Amicon旋转过滤器浓缩LNP,并且使用PD-10脱盐柱(GE)将其缓冲液交换至TSS中。所得混合物接着使用0.2 μ m无菌过滤器过滤。将最终LNP储存于4℃或-80℃下直至进一步使用。

[0271] mRNA的体外转录(“IVT”)

[0272] 含有N1-甲基假-U的封端和多腺苷酸化mRNA是通过使用线性化质粒DNA模板和T7 RNA聚合酶的体外转录来产生。通过在以下条件下与XbaI一起在37℃下温育2小时来线性化含有T7启动子、转录序列和多腺苷酸化序列的质粒DNA:200ng/ μ L质粒、2U/ μ L XbaI (NEB) 和1x反应缓冲液。通过在65℃下加热反应物20分钟来使XbaI失活。由酶和缓冲盐纯化所述线性化质粒。用于产生经修饰mRNA的IVT反应是通过在37℃下在以下条件下温育1.5-4小时来进行:50ng/ μ L线性化质粒;各2-5mM的GTP、ATP、CTP和N1-甲基假-UTP(Trilink);10-25mM ARCA(Trilink);5U/ μ L T7 RNA聚合酶(NEB);1U/ μ L鼠类核糖核酸酶抑制剂(NEB);0.004U/ μ L无机大肠杆菌焦磷酸酶(NEB);和1x反应缓冲液。添加TURBO脱氧核糖核酸酶(ThermoFisher),至0.01U/ μ L的最终浓度,并且将反应物再温育30分钟以去除DNA模板。根据制造商的方案使用MegaClear Transcription Clean-up试剂盒(ThermoFisher)或RNeasy Maxi试剂盒(Qiagen)纯化mRNA。或者,经由沉淀方案(在一些情况下,其接着是基于HPLC的纯化)来纯化mRNA。简言之,在DNA酶消化之后,使用LiCl沉淀、乙酸铵沉淀和乙酸钠沉淀来纯化mRNA。对于经HPLC纯化的mRNA而言,在LiCl沉淀和重构之后,通过RP-IP HPLC纯化mRNA(参见例如Kariko等人,Nucleic Acids Research,2011,第39卷,第21期e142)。合并选择用于汇集的级分并通过如上文所描述的乙酸钠/乙醇沉淀来脱盐。在另一个替代方法中,mRNA用LiCl沉淀法纯化,随后通过切向流过滤进一步纯化。通过测量260nm处的吸光度(Nanodrop)测定RNA浓度,并且通过毛细管电泳法用Bioanalyzer(Agilent)来分析转录物。

[0273] 从编码根据SEQ ID NO:801-803的开放阅读框(参见表14中的序列)的质粒DNA生成酿脓链球菌(“Spy”)Cas9 mRNA。当关于RNA在下文提及SEQ ID NO:801-808时,应理解,T应经U置换(其为如上文所述的N1-甲基假尿苷)。实施例中使用的信使RNA包括5'帽和3'聚A尾,例如至多100nt,并且在表14中由SEQ ID NO:801-803标识。

[0274] 表4.crRNA引导序列

[0275]

引导物 ID	crRNA 引导序列	SEQ ID NO
CR008829	AUAGGCAUCUACAUCGGAGCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	251
CR008830	UAGGCAUCUACAUCGGAGCAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	252
CR008831	CCGUAACUCAUUGGCCAAUGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	253
CR008832	UCUAGAGUCCCGUAAACUCAUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	254
CR008833	CUAAAUGGGGAUUUCCGCAAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	255
CR008834	UGAGUUACGGGACUCUAGAUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	256
CR008835	UCCAGAGUCCCGUAAGUCAUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	257
CR008836	AGACGGGCACGAGGUUCCUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	258
CR008837	CCAAGGAUGCUUACCACCAGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	259
CR008838	UGUGUUUGAAUGUGGCAACGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	260
CR008839	GACGGGCACGAGGUUCCUGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	261
CR008840	UGCUGCCGGAUCCAAAUCCCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	262
CR008841	CAUCCAGAUACUGGCUAAAUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	263
CR008842	GCCAAUGACUUACGGGACUCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	264
CR008843	CGACAACCCAAAGGUUGUGAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	265
CR008844	GUUGUUUCUGACAUAAGCCAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	266
CR008845	CUGCCCCAUGCAUAGUUACCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	267
CR008846	UCUGGAGCAACCAUCAGAAUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	268
CR008847	GAACCUCGUGCCCGUCUGCUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	269

[0276]

引导物 ID	crRNA 引导序列	SEQ ID NO
CR008848	GCGACAACCCAAAGGUUGUGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	270
CR008849	GGAACCUCGUGCCCGUCUGCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	271
CR008850	CUGGUUUGAUGACCAACUUCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	272
CR008851	CAGACGGGCACGAGGUUCCCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	273
CR008852	GCAGCAACCCUCACAACCUUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	274
CR008853	AAUGUGGCAACGUGGUGCUCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	275
CR008854	AUUGCAAAGCGACAACCCAAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	276
CR008855	UUCUACACCCCAGCCGCCCCGUUUUAGAGC UAUGCUGUUUUG	277
CR008856	CCACAUUGGCCAAUGAGUUAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	278
CR008857	AUCCCCAUUUAGCCAGUAUCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	279
CR008858	CUUACUGUUAGAUUUUAUAUCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	280
CR008859	GAUGUAGAUGCCUAUUCUGAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	281
CR008860	CUAGAUUGGCCAAUGACUUAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	282
CR008861	UCCAAGGAUGCUUACCACCAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	283
CR008862	GGUGGUAAGCAUCCUUGGAAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	284
CR008863	CACAUUGGCCAAUGAGUUACGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	285
CR008864	UAGAUUGGCCAAUGACUUACGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	286
CR008865	ACGUUGCCACAUUCAACACGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	287
CR008866	AUGCUUACCACCAGGGGACAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	288
CR008867	GUGGAAUACAGAGCGGAGGUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	289
CR008868	UCUACACCCCAGCCGCCCCAGUUUUAGAGC UAUGCUGUUUUG	290
CR008869	CUGUUAGAUUUUAUAUCAGGGGUUUUAGAG	291

[0277]

引导物 ID	crRNA 引导序列	SEQ ID NO
	CUAUGCUGUUUUG	
CR008870	CCCCUGGUGGUAAGCAUCCUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	292
CR008871	AUCGGAGCAGGGAUCUGUGCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	293
CR008872	UGGUGCUCAGGACUGAUGAAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	294
CR008873	UCCAUAAGCAAUAUCCACAUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	295
CR008874	CAUGCAA AUGUCCACUCACCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	296
CR008875	CAACCUCCCUCCUCAGGAUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	297
CR008876	GGCGGCUGGGGUGUAGAAGCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	298
CR008877	UUAUGCCUGGGAUUUGGAUCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	299
CR008878	AUCAGAAUAGGCAUCUACAUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	301
CR008879	CAGCAACCCUCACAACCUUUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	302
CR008880	UUGCCAAUCCUGAGGGAGGGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	303
CR008881	AUUAUUGCUAUGUCAGCAGCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	304
CR008882	ACGAGGUUCCCUGGGGCGGCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	305
CR008883	UUCCAAGGAUGCUUACCACCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	306
CR008884	GCGGCUGGGGUGUAGAAGCAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	307
CR008885	AGAAGUGGAAUACAGAGCGGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	308
CR008886	UCGGAGCAGGGAUCUGUGCUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	309
CR008887	ACAGUGGGAUCUACUGCUGCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	310
CR008888	UGAAAAAUUUAACCUGAAGUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	311
CR008889	UGCCCCAGCAGACGGGCACGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	312
CR008890	CUAUGCAGGGUCCUCAGAAGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	313

[0278]

引导物 ID	crRNA 引导序列	SEQ ID NO
CR008891	AAAUAAGGUGGUUGGAUCUAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	314
CR008892	CAUUUGCCAAUCCUGAGGGAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	315
CR008893	UCAGGGACACAUCUCCUUUGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	316
CR008894	AGUCGGUGCAGGGGUGACCUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	317
CR008895	UUGGCAA AUGCAGUAGCAGAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	318
CR008896	UUUUCAUCAUUCAUUAUGCCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	319
CR008897	AUCCAGAUACUGGCUAAAUGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	320
CR008898	GGUGCUCAGGACUGAUGAAAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	321
CR008899	ACCUGGGCCAUGUCCCCUGGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	322
CR008900	GCAUUUGCCAAUCCUGAGGGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	323
CR008901	CAGCAGCAGGACACAGUCAAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	324
CR008902	GUUACCUGGGCCAUGUCCCCGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	325
CR008903	GCCACAUCAAACACAGGACGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	326
CR008904	ACAUCCAGAUACUGGCUAAAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	327
CR008905	GCCUGUCCUGUGUUUGAAUGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	328
CR008906	GCUCCUUUGCCCCAGCAGACGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	329
CR008907	CGAGGUUCCCUGGGGCGGCUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	330
CR008908	UACUGCAUUUGCCAAUCCUGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	331
CR008909	GAGGUUCCCUGGGGCGGCUGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	332
CR008910	AACCUCGUGCCCGUCUGCUGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	333
CR008911	CAUUCAUUAUGCCUGGGAUUGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	334
CR008912	AGAGAACGUAAUGAAGUGGGUUUUAGAG	335

引导物 ID	crRNA 引导序列	SEQ ID NO
	CUAUGCUGUUUUG	
[0279]	CR008913 AGCAGCAGGACACAGUCAAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	336
	CR008914 CGCUCUGUAUUCCACUUCUGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	337
	CR008915 GGAGGUUGGCCAAAGAGAUGGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	338
	CR008916 ACUUCACUGCAGCCUUUCCAGUUUUAGAG CUAUGCUGUUUUG	339

[0280] 实施例2-TIM3引导物设计和在HEK细胞中的筛选

[0281] 使用人类参考基因组(例如hg38)和用户定义的所关注基因组区域(例如TIM3蛋白质编码外显子)进行初始引导物选择,以鉴定所关注区域中的PAM。对每个鉴定出的PAM进行分析并报告统计结果。根据本领域中已知的一些标准(例如GC含量、预测的在靶活性和潜在的脱靶活性),进一步选择gRNA分子并进行排序。

[0282] 在本实验中,针对TIM3 (ENSG00000135077)设计了共88个引导RNA。提供了引导序列和相应的基因组坐标(表1)。

[0283] 在HEK293_Cas9细胞中筛选引导物的编辑效率。组成型表达Spy Cas9的人胚肾腺癌细胞系HEK293(“HEK293_Cas9”) 在补充有10%胎牛血清的DMEM培养基中培养。在转染前约24小时,以10,000个细胞/孔的密度将细胞铺在96孔板中(转染时约70%汇合)。用Lipofectamine RNAiMAX(ThermoFisher,目录13778150)根据制造商的方案进行转染。用含有个别引导物(25nM)、trRNA(25nM)、Lipofectamine RNAiMAX(0.3μL/孔)和OptiMEM培养基(ThermoFisher)的lipoplex转染细胞。DNA分离和NGS分析如实施例1中所述进行。表5显示了在HEK 293 Cas9细胞中通过这些引导物在TRAC基因座处的插入/缺失%。

[0284] 表5-HEK293细胞中TIM3基因座的平均编辑百分比(除非另有说明,否则n=3)

[0285]

引导物 ID	平均值	SD	引导物 ID	平均值	SD	引导物 ID	平均值	SD
CR008829	49.57	4.14	CR008859	34.33	6.34	CR0088888	3.27	0.29
CR008830	72.07	3.72	CR008860	75.70	1.66	CR0088889	0.77	0.12
CR008831	31.70	5.48	CR008861*	65.55	4.05	CR008890	28.23	9.77
CR008832	46.10	3.82	CR008862	64.13	7.53	CR008891	61.43	5.14
CR008833	60.73	5.85	CR008863	30.30	3.79	CR008892	40.27	7.13
CR008834	68.27	8.18	CR008864	67.70	9.60	CR008893	33.00	2.87
CR008835	40.63	7.29	CR008865	12.40	2.67	CR008894	40.80	2.12
CR008836	43.77	2.79	CR008866	9.50	1.81	CR008895	24.53	9.23
CR008837	73.57	3.48	CR008867	37.50	2.51	CR008896	0.57	0.33
CR008838	46.37	2.14	CR008868	34.37	3.00	CR008897	24.13	10.02
CR008839	84.73	1.01	CR008869	33.50	12.04	CR008898	55.87	8.17
CR008840	73.53	2.73	CR008870	47.57	6.21	CR008899	1.90	0.24
CR008841	11.97	2.74	CR008871	27.70	2.93	CR008900	11.83	2.65
CR008842	7.80	1.23	CR008872	41.07	8.61	CR008901	30.57	4.49
CR008843	1.10	0.08	CR008873	35.10	10.67	CR008902	27.53	5.73
CR008844	47.40	7.16	CR008874	8.73	0.45	CR008903	10.20	0.70
CR008845	4.37	1.04	CR008875	13.73	1.81	CR008904	10.67	3.21
CR008846	48.30	2.26	CR008876	3.97	0.17	CR008905	11.67	1.77
CR008847	11.60	1.67	CR008877	54.73	11.59	CR008906	60.03	1.11
CR008848	0.43	0.05	CR008878	20.43	1.24	CR008907	50.87	6.95
CR008849	5.67	0.79	CR008879	68.53	8.63	CR008908	42.50	8.43
CR008850	32.23	3.02	CR008880	13.03	1.60	CR008909	20.27	6.54

[0286]

引导物 ID	平均值	SD	引导物 ID	平均值	SD	引导物 ID	平均值	SD
CR008851	12.57	2.96	CR008881	10.20	3.69	CR008910	73.60	1.35
CR008852	12.07	2.03	CR008882	1.37	0.09	CR008911	10.87	2.61
CR008853	4.93	0.74	CR008883	64.67	8.86	CR008912	49.40	6.57
CR008854	36.47	3.80	CR008884	61.63	6.51	CR008913	53.80	8.90
CR008855	15.70	5.39	CR008885	36.27	5.04	CR008914	7.13	0.84
CR008856	55.77	2.64	CR008886	43.83	2.66	CR008915	70.67	1.57
CR008857	7.70	1.20	CR008887	20.70	0.50	CR008916	77.33	3.09
CR008858	27.10	6.21						

[0287] * CR008861 n=2

[0288] 实施例3-在人类CD3+T细胞中筛选TLM3引导物

[0289] 在人类CD3⁺ T细胞中针对从实施例2的HEK293_Cas9细胞编辑筛选得到的引导物对编辑效率进行了筛选。CD3⁺ T细胞由多种T细胞群体组成,包括CD4⁺ T辅助细胞和CD8⁺ 细胞毒性T细胞。这些细胞可从全血或白细胞透入(leukophoresis)样品中分离出来。通过使用Cas9介导的编辑对患者的T细胞进行工程化,可使T细胞经修饰以特异性地靶向癌细胞并降低其免疫原性。

[0290] 实施例3.1.向T细胞递送RNP

[0291] T细胞可商购获得(例如人外周血CD4⁺CD45RA⁺ T细胞,冷冻,Stem Cell Technology,目录70029)或从leukopak内部制备。对于内部制备,首先使用市售试剂盒(例如EasySep™人类T细胞分离试剂盒,Stem Cell Technology)从leukopak富集T细胞。将富集的T细胞等分并冷冻(5x10⁶个/小瓶),以供将来使用。随后根据需要解冻小瓶,并通过在T细胞培养基(RPMI 1640、FBS、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、丙酮酸钠、HEPES缓冲液、2-巯基乙醇和任选地IL2)中加入3:1比率的CD3/CD28珠粒(Dynabeads,Life Technologies)进行激活。通过混合等量试剂将个别crRNA和trRNA预退火并在95℃下温育2分钟并冷却至室温来生成RNP。由预退火的crRNA和trRNA组成的双引导(dgRNA)与Spy Cas9蛋白一起温育,以形成核糖核蛋白(RNP)复合物。对于经刺激的人类T细胞,用使用制造商的Amaxa™ 96孔Shuttle™方案使用P3 Primary Cell 96孔Nucleofector™试剂盒(Lonza,目录V4SP-3960)核转染的含有Spy Cas9(10nM)、个别引导物(10nM)和tracer RNA(10nM)的RNP一式三份地转染CD3+T细胞。核转染后立即向细胞中添加T细胞培养基,并培养2天或更长时间。

[0292] 核转染两天后,如实施例1中所述制备基因组DNA并进行NGS分析。表6A和图1显示了CD3+T细胞中的NGS编辑%数据。

[0293] 表6A-TIM3基因座处T细胞的平均编辑百分比。

[0294]

	供体 826		供体 112		供体 262		供体 315	
引导物 ID	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
CR008910	66.17	3.44	39.87	2.40	29.00	25.21	44.73	4.61
CR008898	56.40	8.92	39.50	2.35	31.93	1.91	36.33	1.50
CR008906	53.27	11.83	31.13	1.03	25.93	2.40	32.17	1.11
CR008839	37.97	18.08	42.83	3.18	46.55	0.07	49.00	4.67
CR008840	35.40	0.92	20.57	0.25	22.30	2.56	25.73	2.53
CR008913	33.83	1.46	20.60	0.56	9.27	1.05	12.13	0.35
CR008915	31.07	1.19	19.40	0.75	20.23	2.15	19.77	1.46
CR008856	31.07	1.58	16.87	0.68	13.23	2.58	15.17	1.88
CR008884	30.60	3.54	25.03	0.42	28.20	0.87	29.43	2.78
CR008877	29.50	0.95	20.07	0.67	18.20	3.20	27.77	3.42
CR008916	27.63	1.33	7.00	1.25	5.10	0.66	6.57	0.35
CR008862	16.95	7.85	20.70	1.78	23.13	1.87	26.53	1.19
CR008846	19.53	8.06	18.47	1.81	16.50	1.61	12.57	7.95
CR008883	16.87	8.42	7.40	2.61	11.77	1.32	13.30	0.56
CR008879	15.97	5.01	8.77	0.85	13.10	1.32	11.90	2.07
CR008912	15.47	7.97	11.67	1.31	10.47	1.10	8.53	0.92
CR008833	14.97	2.99	10.03	0.59	10.27	1.36	9.43	0.98
CR008837	14.93	11.48	11.30	3.95	12.30	1.39	15.57	1.18
CR008864	14.80	4.55	11.70	0.92	14.23	1.81	9.50	5.99
CR008860	13.77	3.55	6.67	0.49	4.60	0.00	6.43	1.26
CR008861	13.20	2.59	15.73	2.17	23.27	1.24	24.40	1.67
CR008830	12.20	1.31	6.47	1.07	5.37	0.35	6.23	0.38
CR008907	10.00	0.82	7.33	0.90	7.77	0.55	8.20	1.76

[0295]

	供体 826		供体 112		供体 262		供体 315	
引导物 ID	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
CR008891	9.63	2.19	5.07	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00
CR008834	7.00	3.30	7.87	5.23	5.97	0.65	5.33	1.19
CR008829	1.13	0.21	1.30	0.46	1.27	0.29	1.03	0.23
CR000961 (TRAC)	84.40	2.67	78.77	1.66	67.13	5.31	78.83	4.19

[0296] 实施例3.2.TIM3蛋白质表达的流式细胞术分析

[0297] 电穿孔七天后,使用细胞与CD3/CD28珠粒(Dynabeads,Life Technologies)的1:1比率对细胞进行再刺激。电穿孔后第11天,通过流式细胞术测定T细胞,以评估TIM3表面蛋白表达。用识别TIM3的抗体(Biolegend,目录369314)温育T细胞,并用可固定的live dead染料(Thermo Fisher,目录L34975)染色。随后用Cytotflex LX仪器(Beckman Coulter)处理细胞,并使用FlowJo软件包分析数据。表达TIM3细胞表面蛋白的细胞百分比示于表6B和图2A-B中。

[0298] 表6B- 双引导物编辑后TIM3阳性人类CD3+T细胞百分比

[0299]

crRNA	供体 262		供体 315		供体 112		供体 826	
	平均 TIM3+ %	SD	平均 TIM3+ %	SD	平均 TIM3+ %	SD	平均 TIM3+ %	SD
CR0088 39	30.87	3.61	38.07	1.97	5.35	0.60	12.06	5.06
CR0089 10	28.03	2.78	38.00	0.61	3.98	0.32	4.04	0.54
CR0088 98	31.53	4.15	42.70	4.78	5.22	1.14	5.71	1.00
CR0089 06	40.97	5.02	48.57	2.74	5.74	0.21	6.80	3.46
CR0088 84	35.53	2.38	52.17	6.14	6.71	0.32	10.11	1.38
CR0088 77	45.87	6.04	54.77	5.29	8.79	2.45	12.44	2.76
CR0088 62	50.47	4.20	59.10	6.68	9.13	1.80	9.73	3.62
CR0088 40	46.23	2.45	56.60	3.40	8.40	1.29	8.47	1.33
CR0088 61	51.57	3.18	63.70	4.20	8.55	0.66	13.10	2.09

[0300]

crRNA	供体 262		供体 315		供体 112		供体 826	
CR0089 15	47.27	8.28	62.40	0.80	8.49	1.21	14.77	2.57
CR0088 37	55.03	2.87	69.20	4.12	9.00	1.93	13.90	1.57
CR0088 56	50.53	6.09	60.97	2.89	11.40	0.70	13.70	1.10
CR0088 83	53.97	0.12	65.33	2.68	9.53	1.04	14.93	1.90
CR0088 46	49.67	13.7 6	60.37	2.78	10.26	1.09	17.33	0.38
CR0089 13	50.87	7.96	62.43	5.05	8.99	1.97	12.73	3.40
CR0088 79	55.67	3.90	66.87	5.75	9.87	1.10	22.33	4.52
CR0088 64	56.20	9.71	66.53	3.36	12.57	3.84	19.60	1.40
CR0088 33	52.40	6.26	63.57	6.75	8.01	1.05	16.73	3.08
CR0089 12	57.33	6.84	68.47	5.28	9.58	1.50	24.17	7.57
CR0089 07	56.63	4.97	64.30	7.05	14.93	4.40	15.40	2.17
CR0089 16	56.13	0.21	67.60	1.31	8.12	2.42	14.17	2.97
CR0088 60	59.37	3.44	67.70	1.55	9.76	1.16	19.93	2.42
CR0088 30	57.63	1.76	64.70	1.97	14.27	2.82	13.20	1.25
CR0088 34	58.87	3.00	61.63	7.41	15.07	2.76	23.17	8.21
CR0088 29	52.70	9.70	67.03	3.43	12.77	2.71	20.43	1.56
CR0088 91	64.57	6.56	68.30	3.39	12.57	1.07	23.53	3.00
CR0009 61 (TRAC)	76.17	4.83	75.23	3.25	11.77	1.53	21.87	1.60

[0301] 实施例4-TIM3引导物的脱靶分析

[0302] 使用一种生物化学方法(参见例如Cameron等人,Nature Methods.6,600-606; 2017)来确定使用靶向TIM3的引导物通过Cas9裂解的潜在脱靶基因组位点。利用这种测定,对显示在靶插入/缺失活性的引导物测试了潜在的脱靶基因组裂解位点。在本实验中,使用纯化的人类基因组DNA筛选了15个靶向人类TIM3的dgRNA和靶向VEGFA的阳性对照引导物G000645。表7显示了在生化测定中使用64nM引导物浓度检测到的潜在脱靶位点数量。

[0303] 表7-通过生化测定预测的TIM3引导物的潜在脱靶位点

[0304]

引导物	靶标	位点
CR008829	TIM3	60
CR008830	TIM3	55
CR008839	TIM3	526

CR008840	TIM3	406
CR008856	TIM3	58
CR008861	TIM3	973
CR008862	TIM3	248
CR008877	TIM3	598
CR008883	TIM3	236
CR008884	TIM3	1238
CR008898	TIM3	502
CR008906	TIM3	286
CR008910	TIM3	281
CR008913	TIM3	386
CR008915	TIM3	1037
G000645	VEGFA	6071

[0305] 实施例4.1.用于验证潜在脱靶位点的靶向测序

[0306] 在已知的脱靶检测测定(例如上文使用的生化方法)中,通常会设计回收大量潜在的脱靶位点,以便“广撒网”寻找可在其他情形下(例如在所关注的原代细胞中)验证的潜在位点。例如,生化方法通常会高估潜在脱靶位点的数量,因为所述测定利用了经纯化的高分子量基因组DNA,不受细胞环境影响并且取决于所用Cas9 RNP的剂量。因此,通过这些方法鉴定出的潜在脱靶位点可通过对鉴定出的潜在脱靶位点进行靶向测序来验证。

[0307] 在一种方法中,用包含Cas9 mRNA和所关注的sgRNA(例如,具有用于评价的潜在脱靶位点的sgRNA)的LNP处理原代T细胞。然后裂解原代T细胞,并且使用潜在脱靶位点侧翼的引物产生扩增子以进行NGS分析。在一定水平上鉴定的插入/缺失可能验证了潜在的脱靶位点,而在潜在的脱靶位点上没有发现插入/缺失可能表明所利用的脱靶测定是假阳性的。

[0308] 实施例5-CD3⁺T细胞中的单引导物分析

[0309] 如实施例3中所概述制备T细胞。将单引导物(sgRNA)在95℃下温育2分钟并冷却至室温。然后将sgRNA与Spy Cas9蛋白温育,以形成核糖核蛋白(RNP)复合物。对于经刺激的人类T细胞,用使用制造商的Amaxa™ 96孔Shuttle™方案使用P3原代细胞96孔Nucleofector™试剂盒(Lonza,目录V4SP-3960)核转染的含有Spy Cas9(10nM)和个别sgRNA(10nM)的RNP转染CD3⁺T细胞。核转染后立即向细胞中添加T细胞培养基并进行培养。电穿孔两天后,收集部分细胞,并且如实施例1中进行NGS。平均编辑百分比示于表8A和图3A。

[0310] 表8A:sgRNA编辑后T细胞中TIM3基因座处的平均编辑百分比

[0311]

引导物	供体 1162		供体 907	
	平均编辑%	SD	平均编辑%	SD
G015083	39.93	9.81	62.17	6.64
G015087	39.13	6.15	48.20	4.57
G015078	7.70	0.66	20.73	1.17
G015085	13.17	1.11	13.57	1.44
G015081	8.87	1.50	12.83	2.51
G015086	7.20	1.04	8.93	2.54
G015080	5.90	0.87	7.87	1.50
G015079	0.87	0.15	1.80	0.10
G015082	6.23	0.71	9.63	1.27
G015084	3.73	0.06	3.30	0.10
G000294 VEGFA (对照)	81.70	1.42	66.85	6.45

[0312] 电穿孔后第七天,用IL-2和CD3/CD28珠粒(Dynabeads)制备培养基。细胞与珠粒的比率为1:1,用于再刺激。如实施例3.2所述,通过流式细胞术测量再刺激蛋白水平,并示于表8B和图3B中。

[0313] 表8B:sgRNA编辑后TIM3阳性人类CD3+T细胞的平均百分比 (n=3)

[0314]

引导物	供体 1162		供体 907	
	平均 TIM3+ %	SD	平均 TIM3+ %	SD
G015083	54.13	10.20	37.23	5.73
G015087	57.40	5.70	55.57	3.04
G015078	78.33	2.46	78.07	2.03
G015085	81.57	0.15	89.03	0.12
G015081	82.47	1.33	85.43	1.21
G015086	82.57	0.98	90.43	0.83
G015080	83.67	2.50	89.13	0.90
G015079	84.27	0.45	89.90	0.92
G015082	85.43	2.05	89.97	0.70
G015084	86.30	1.39	91.77	1.01
G000294 VEGFA (对照)	79.97	3.46	89.70	3.70

[0315] 实施例6-用不同剂量的RNA进行TIM3编辑

[0316] 用增加量的与编码Cas9的mRNA和靶向TIM3或对照基因座的sgRNA共同配制的脂质纳米粒子编辑T细胞。

[0317] 低温保存的T细胞在水浴中解冻。以每10mL细胞因子培养基 15×10^6 个的密度重悬T细胞。将TransAct™(Miltenyi)以1:100的稀释度加入到每个烧瓶中,并在37℃下温育过夜。

[0318] 收集T细胞并将其重悬于用细胞因子(IL-2 (200U/mL)、IL-7 (5ng/mL) 和IL-15 (5ng/mL))制备的培养基(X-VIVO™无血清基础培养基)中。在X-VIVO™ 5%HS培养基中加入ApoE3至最终浓度为1ug/mL。将用表7所示的引导物配制的LNP在ApoE3培养基中制备成2x最终浓度,并在37℃下温育15分钟。将50μL的LNP-ApoE和50μL的T细胞混合并温育24小时。如

实施例1中进行NGS分析。NGS数据示于表9和图4中。

[0319] 表9:用不同剂量的LNP编辑的T细胞的插入/缺失百分比

剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	G018436		G018437		G018438 阳性对照		G000739 阴性对照	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
10	95.23	0.45	95.50	1.15	94.63	1.36	0.17	0.06
5	91.70	0.89	94.43	1.00	91.80	1.11	0.10	0.00
2.5	81.57	0.92	82.90	3.64	76.30	3.38	0.17	0.06
1.25	46.10	5.86	40.00	7.29	28.47	3.58	0.13	0.06
0.625	17.23	5.74	13.57	2.20	6.53	1.23	0.10	0.00
0.3125	4.80	1.30	3.27	2.49	1.70	0.10	0.10	0.00
0.15	1.70	0.53	0.93	0.21	0.87	0.29	0.10	0.00
0.07	0.80	0.36	0.47	0.06	0.47	0.21	0.17	0.06

[0321] 实施例7-具有TIM3敲除的工程化T细胞

[0322] T细胞经设计具有一系列基因破坏和插入。用三种LNP依序处理健康供体细胞,每种LNP与编码Cas9的mRNA和靶向sgRNA共同配制。首先编辑细胞以敲除TRBC。然后将靶向威尔姆斯肿瘤抗原的转基因T细胞受体(WT1 TCR) (SEQ ID NO:1001)通过使用AAV递送同源定向修复模板而整合到TRAC切割位点中。最后,编辑T细胞以敲除TIM3。

[0323] 7.1.T细胞制备

[0324] 健康人类供体单采(apheresis)可商购获得(HemaCare),洗涤并重悬于CliniMACS PBS/EDTA缓冲液(Miltenyi目录130-070-525)中。使用CliniMACS Plus和CliniMACS LS一次性试剂盒,经由使用CD4和CD8磁性珠粒(Miltenyi BioTec,目录130-030-401,130-030-801)的阳性选择,分离来自三名供体的T细胞。T细胞被等分至小瓶中,并在Cryostor CS10 (StemCell Technologies目录07930)和Plasmalyte A(Baxter目录2B2522X)的1:1制剂中冷冻保存,以供将来使用。在开始T细胞编辑前一天,解冻细胞并在T细胞活化培养基(TCAM)中静置过夜:CTS OpTmizer (Thermofisher,目录A3705001),补充有2.5%人类AB血清(Gemini,目录100-512)、1X GlutaMAX (Thermofisher,目录35050061)、10mM HEPES (Thermofisher,目录15630080)、200U/mL IL-2 (Peprotech,目录200-02)、IL-7 (Peprotech,目录200-07)、IL-15 (Peprotech,目录200-15)。

[0325] 7.2.LNP处理和T细胞扩增

[0326] 第1天,将含有Cas9 mRNA和靶向TRBC的sgRNA(G016239)的LNP以5 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度在含有1 $\mu\text{g/mL}$ rhApoE3的TCAM(Peprotech,目录350-02)中温育。同时,收集T细胞,洗涤,并以2 $\times 10^6$ 个细胞/毫升的密度重悬于具有1:50稀释的人类T细胞TransAct试剂(Miltenyi,目录130-111-160)的TCAM中。将T细胞和LNP-ApoE培养基以1:1比率混合并且将T细胞接种在培养瓶中过夜。

[0327] 第3天,收集T细胞,洗涤,并以1 $\times 10^6$ 个细胞/毫升的密度重悬于TCAM中。将含有Cas9 mRNA和靶向TRAC的sgRNA(G013006)的LNP以5 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度在含有5 $\mu\text{g/mL}$ rhApoE3的TCAM(Peprotech,目录350-02)中。将T细胞和LNP-ApoE培养基以1:1比率混合,并且将T细胞接种在培养瓶中。然后以3 $\times 10^5$ 个基因组拷贝/细胞的MOI向每组添加含WT1 TCR的AAV。在表格和附图中,具有这些编辑的细胞被称为“WT1 T细胞”。

[0328] 第4天,收集T细胞,洗涤,并以 1×10^6 个细胞/毫升的密度重悬于TCAM中。LNP含有Cas9 mRNA和表11中所列的gRNA之一。LNP以5ug/mL的浓度在含有5ug/mL rhApoE3的TCAM (Peprotech,目录350-02)中温育。然后以1:1比率将LNP-ApoE溶液加入到适当的培养物中。

[0329] 第5-11天,将T细胞转移至24孔GREX板(Wilson Wolf,目录80192)的T细胞扩增培养基(TCEM)中:CTS OpTmizer(Thermofisher,目录A3705001),补充有5%CTS免疫细胞血清替代物(Thermofisher,目录A2596101)、1X GlutaMAX(Thermofisher,目录35050061)、10mM HEPES(Thermofisher,目录15630080)、200U/mL IL-2(Peprotech,目录200-02)、IL-7(Peprotech,目录200-07)和IL-15(Peprotech,目录200-15)。细胞按制造商方案扩增。将T细胞扩增6天,每隔一天更换一次培养基。使用Vi-CELL细胞计数器(Beckman Coulter)对细胞进行计数,并且所有样品显示相似的倍数扩增。

[0330] 7.3.通过流式细胞术和NGS对T细胞编辑进行量化

[0331] 扩增后,通过流式细胞术检测编辑的T细胞,以确定TCR插入和记忆细胞表型。T细胞与靶向以下分子的抗体混合液一起温育:CD4(Biolegend,目录300524)、CD8(Biolegend,目录301045)、Vb8(Biolegend,目录348106)、CD3(Biolegend,目录300327)、CD62L(Biolegend,目录304844)、CD45RO(Biolegend,目录304230)、CCR7(Biolegend,目录353214)和CD45RA(Biolegend,目录304106)。随后用Cytoflex LX仪器(Beckman Coulter)处理细胞,并使用FlowJo软件包分析数据。连续T细胞工程化之后表达相关细胞表面蛋白的细胞百分比示于表10A-10C和图5A-5C中。表10A显示了T细胞工程化之后CD8+细胞的总百分比,以及用Vb8抗体检测到的表达工程化TCR的CD8+或CD4+细胞的比例。表10B和图5A显示了具有干细胞记忆表型(Tscm;CD45RA+CD62L+)的CD8+Vb8+细胞的百分比。表10C和图5B显示了具有中心记忆细胞表型(Tcm;CD45RO+CD62L+)的CD8+Vb8+细胞的百分比。表10C和图5C显示了具有效应记忆表型(Tem;CD45RO+CD62L-CCR7-)的细胞总数的百分比。除了流式细胞术分析外,还制备了基因组DNA并如实施例1所述进行了NGS分析,以确定每个目标位点的编辑率。表11和图6A-6B显示了在第三次连续编辑中工程化的基因座处插入/缺失频率的结果。

[0332] 表10A-表达指定表面蛋白的细胞百分比。

样品	总数的 CD8+%		CD8+的 Vb8+%		CD4+的 Vb8+%	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
WT1 T 细胞	57.77	7.95	57.87	5.02	62.63	5.17
G018436	56.73	6.09	57.00	5.86	62.73	6.03
G020845	56.17	7.25	58.17	5.60	63.03	5.85

[0334] 表10B-具有干细胞记忆表型的Vb8+CD8+细胞百分比

样品	CD45RA+ CD62L+ CCR7+ %		CD45RA+ CD62L+ CCR7- %	
	平均值	SD	平均值	SD
WT1 T 细胞	13.64	12.95	15.88	12.61
G018436	11.96	11.10	17.13	13.64
G020845	11.85	10.66	17.41	14.83

[0336] 表10C-具有中心记忆细胞表型或具有效应记忆细胞表型的Vb8+CD8+细胞的百分比。

样品	CD45RO+ CD62L+ CCR7+ %		CD45RO+ CD62L+ CCR7- %		CD45RO+ CD62L- CCR7- %	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
WT1 T 细胞	3.48	1.70	17.73	7.12	36.67	24.49
G018436	3.47	2.11	16.90	6.32	37.43	24.99
G020845	3.36	1.92	18.53	6.09	37.33	23.47

[0338] 表11-第三次连续编辑中工程化的基因的插入/缺失频率

样品	引物组 1			引物组 2		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n
G018434 [LAG3]	0.99	0.00	2	0.99	0.00	3
G018436 [TIM3]	0.83	0.06	2	0.85	0.05	3
G020845 [TIM3]	0.92	0.01	2	0.88	0.05	3
G021215 [2B4]	no data			0.58	0.06	3
G021216 [2B4]	0.61	0.06	2	0.63	0.05	3

[0340] 实施例8-使用工程化T细胞抑制AML细胞增殖

[0341] 第4天,收集T细胞,洗涤并以 1×10^6 个细胞/毫升的密度重悬于TCAM中。LNP含有Cas9 mRNA和表14所列的gRNA之一。将LNP以5ug/mL的浓度在含有5ug/mL rhApoE3 (Peprotech, 目录350-02)的TCAM中温育。然后将LNP-ApoE溶液以1:1比率加入到适当培养物中。

[0342] 检查点抑制剂与免疫耗竭相关,而免疫耗竭可能出现在增生性病症如癌症中。与WT1相关的增生性病症包括多种血液恶性疾病,包括急性髓系白血病(AML)和慢性髓系白血病(CML)。使用已知的AML模型在体外和体内测试通过实施例7的方法制备以减少检查点抑制剂的表达并诱导WT1 TCR的表达的细胞(参见例如Zhou等人,Blood (2009) 114:3793-3802)。

[0343] 体外细胞杀伤测定可用于检测T细胞对异常增殖细胞的活性。通过将工程化T细胞与来自具有WT1抗原高表达的急性髓系白血病(AML)的原发性白血病母细胞(CD33+细胞)共培养,评估通过实施例7的方法制备的T细胞消除靶细胞的能力。白血病母细胞可如例如实施例9中进行测定。

[0344] 将人类WT1表达AML细胞系在第0天以致死剂量经由静脉内途径注射至小鼠中。第14天经静脉内施用通过实施例7的方法制备的细胞。监测小鼠的存活情况。用经工程化以表达WT1 TCR的T细胞治疗的小鼠比用不表达WT1 TCR的T细胞治疗的小鼠存活时间更长。与接受表达WT1 TCR和所有内源检查点抑制剂的T细胞治疗的小鼠相比,接受除表达WT1 TCR外还抑制检查点抑制剂表达的工程化T细胞治疗的小鼠存活时间更长。

[0345] 实施例9-通过工程化T细胞杀伤靶细胞

[0346] 使用Incucyte活体成像系统对实施例7中工程化的T细胞杀伤原代白血病母细胞的能力进行了评估。简言之,在两个T细胞供体样品(WT1 T细胞)中对T细胞进行工程化以将WT1 TCR插入TRAC基因座中并敲除TRBC基因座。在第三个工程化步骤中,使用G018436或G020845处理一些WT1 T细胞以敲除TIM3。用NucLight Rapid Red试剂(Essen Biosciences)

进行活细胞核标记来标记从3个HLA-A*02:01患者收集的表达WT1的原代白血病母细胞,并与工程化淋巴细胞在Caspase 3/7绿色试剂存在下以不同(5:1、1:1和1:5)的效应物与靶标(E:T)比率进行共培养。E:T比率为5:1时使用2万个母细胞,并且E:T比率为1:1和1:5时使用75,000个母细胞。将共培养物接种在平底96孔板中的X-VIVO中,补充有5%FBS、1%青霉素-链霉素(BioWhittaker/Lonza)、2mM谷氨酰胺(BioWhittaker/Lonza)、1 μ g/mL CD28单克隆抗体(BD Biosciences)、G-CSF和IL-3(20ng/mL;Bio-technique)。每60分钟拍摄一次图像,并且使用Incucyte活细胞成像和分析软件(Essen Biosciences)量化红色靶细胞中的绿色荧光Caspase 3/7信号。在此测定中,活的AML细胞只发出红色荧光,而死亡的AML细胞则同时发出红色和绿色荧光。表12和图7A-7I显示了每张图像发出绿色和红色荧光的平均面积的平均值 $\pm$ SEM(μm^2 /图像)。对于每个效应子群体,都使用了来自上述2个不同T细胞供体的工程化细胞。

[0347]

表 12 – 在表达 WT1 的 AML 细胞暴露于工程化 T 细胞后，每张图像发出绿色和红色荧光的平均面积(um²/图像)。

细胞	E:T	时间(h)	仅 AML		WT1 T 细胞		G018436		G020845	
			平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
pAML1	1:5	1	3354	425	3558	1253	4866	1198	3477	565
pAML1	1:5	2	4950	59	5246	986	7239	1119	5463	210
pAML1	1:5	3	6025	567	6879	69	9927	1165	8218	276
pAML1	1:5	4	6558	1074	8320	644	12815	675	10759	1558
pAML1	1:5	5	7545	1341	9755	2081	15020	115	13207	2302
pAML1	1:5	6	7666	2215	10902	2883	16430	445	14740	3465
pAML1	1:5	7	7752	2651	11272	3548	17009	487	15286	3773
pAML1	1:5	8	8092	2428	11439	2987	16511	195	14769	4311
pAML1	1:5	9	8082	2776	11135	3449	16170	210	14187	4318
pAML1	1:5	10	7993	2486	10709	3038	14717	199	13254	4075
pAML1	1:5	11	8056	2822	10507	2363	13890	180	12597	3346
pAML1	1:5	12	8169	3029	9784	2530	13101	507	11647	3176
pAML1	1:5	13	8012	3644	9293	2710	12403	271	11149	3029
pAML1	1:5	14	7859	3600	8941	2398	11625	146	10278	2770
pAML1	1:5	15	7449	4138	8363	2053	10781	218	9398	2475
pAML1	1:5	16	7051	3838	7641	2231	9759	254	8600	2387
pAML1	1:5	17	6789	3482	7049	2066	9213	66	8007	2211
pAML1	1:5	18	6541	3407	6760	1893	8728	76	7569	2346
pAML1	1:5	19	6298	3571	6229	2005	7894	228	6986	2282

[0348]

细胞	E:T	时间(h)	仅 AML		WT1 T 细胞		G018436		G020845	
			平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
pAML1	1:5	20	5860	3227	5748	1623	7660	15	6578	1925
pAML1	1:5	21	5739	3232	5509	1603	7150	167	6214	1961
pAML1	1:5	22	5486	3336	4638	130	6847	350	5950	1692
pAML1	1:5	23	5048	3561	5171	1804	6452	99	5333	1697
pAML1	1:5	24	4875	3090	4682	1375	5969	189	4822	1307
pAML1	1:1	0	2827	509	13236	792	18506	3403	12224	1520
pAML1	1:1	1	3354	425	13804	5477	23483	7376	13376	1340
pAML1	1:1	2	4950	59	19052	5728	32806	8682	18813	159
pAML1	1:1	3	6025	567	26223	6816	44347	9436	28243	1283
pAML1	1:1	4	6558	1074	35499	4617	58692	5598	39077	3476
pAML1	1:1	5	7545	1341	45746	2096	78430	5339	51140	6870
pAML1	1:1	6	7666	2215	53641	2027	84762	3747	60161	10851
pAML1	1:1	7	7752	2651	56628	3269	94531	172	63708	12422
pAML1	1:1	8	8092	2428	61273	4878	97258	419	65719	11649
pAML1	1:1	9	8082	2776	60981	3635	99099	1889	66267	12161
pAML1	1:1	10	7993	2486	61917	4229	98349	3181	62931	13995
pAML1	1:1	11	8056	2822	61609	2905	99422	4784	61894	11275
pAML1	1:1	12	8169	3029	61417	3408	96882	3360	60045	11362
pAML1	1:1	13	8012	3644	59798	1717	92606	2004	56536	14761
pAML1	1:1	14	7859	3600	59052	2513	91122	6152	54877	11407
pAML1	1:1	15	7449	4138	57879	1056	89011	4688	53117	13230
pAML1	1:1	16	7051	3838	54344	223	82495	1210	49178	14897

[0349]

细胞	E:T	时间(h)	仅 AML		WT1 T 细胞		G018436		G020845	
			平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
pAML1	1:1	17	6789	3482	53236	871	83153	6883	48985	12343
pAML1	1:1	18	6541	3407	51299	1296	79885	4281	47236	13115
pAML1	1:1	19	6298	3571	50863	1123	77241	1941	44179	16060
pAML1	1:1	20	5860	3227	49140	509	78579	5976	44530	14425
pAML1	1:1	21	5739	3232	49144	560	76285	8774	43881	13326
pAML1	1:1	22	5486	3336	48020	1809	71678	4174	41156	14453
pAML1	1:1	23	5048	3561	45640	2347	70217	243	39684	18408
pAML1	1:1	24	4875	3090	44944	1257	66290	971	38340	17381
pAML1	5:1	0	260	94	11330	5133	18343	8168	10674	262
pAML1	5:1	1	429	220	13196	4743	24803	12573	13665	807
pAML1	5:1	2	627	209	19065	4442	37466	19427	22532	1684
pAML1	5:1	3	776	151	27606	4557	50419	23595	34208	3913
pAML1	5:1	4	908	160	39114	1808	68198	24464	48569	1471
pAML1	5:1	5	915	198	50163	2145	82847	22360	65385	4753
pAML1	5:1	6	952	211	57449	4329	92758	22029	76094	10083
pAML1	5:1	7	911	254	61267	6398	96987	20525	81263	13679
pAML1	5:1	8	1029	293	63554	4397	99851	23100	81794	13826
pAML1	5:1	9	1029	387	63260	3866	97587	19983	80668	14115
pAML1	5:1	10	1037	420	61830	3055	94273	19383	77292	15546
pAML1	5:1	11	1132	485	61700	1135	93492	22367	76750	14614
pAML1	5:1	12	1180	540	60149	442	90713	23282	72007	13868
pAML1	5:1	13	1140	562	57421	409	87875	22975	68803	14808

[0350]

细胞	E:T	时间(h)	仅 AML		WT1 T 细胞		G018436		G020845	
			平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
pAML1	5:1	14	1166	592	56596	2191	85254	23319	66593	13388
pAML1	5:1	15	1119	613	54439	3881	81429	23684	64660	13197
pAML1	5:1	16	985	492	52113	4265	78212	23283	59654	13865
pAML1	5:1	17	984	510	50843	6004	77002	25941	58343	11216
pAML1	5:1	18	874	487	49954	6454	73820	24195	55696	12701
pAML1	5:1	19	816	422	47822	6412	71158	22623	53129	14091
pAML1	5:1	20	775	463	47665	7717	70949	25548	51653	13235
pAML1	5:1	21	780	474	46969	7606	67555	22927	49957	13273
pAML1	5:1	22	768	523	46262	11319	67213	25242	49493	10779
pAML1	5:1	23	661	352	41513	4150	61512	16242	44430	15488
pAML1	5:1	24	639	353	42152	6450	60162	17177	44087	13825
pAML2	1:5	1	5874	3593	-128	7179	7991	4569	3021	2681
pAML2	1:5	2	8990	2303	4735	8794	14849	6351	7512	4051
pAML2	1:5	3	10952	2796	8464	9292	21146	5244	11113	5536
pAML2	1:5	4	10432	5484	12167	7231	26594	6319	15377	4809
pAML2	1:5	5	10817	4334	16482	4777	33886	7088	23368	5314
pAML2	1:5	6	11265	6212	21199	2227	38465	3927	28788	3050
pAML2	1:5	7	10492	7822	22442	1160	40895	1798	31701	339
pAML2	1:5	8	10232	6164	23501	1059	41380	1617	33843	259
pAML2	1:5	9	10518	7563	24885	2627	41912	816	34623	2144
pAML2	1:5	10	9472	7470	24114	3122	41092	2623	34104	3508
pAML2	1:5	11	9351	8653	23935	5093	40231	2709	33849	3279

[0351]

细胞	E:T	时间(h)	仅 AML		WT1 T 细胞		G018436		G020845	
			平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
pAML2	1:5	12	8614	8981	23349	4417	39007	3029	32224	4526
pAML2	1:5	13	8045	8457	21814	5360	36581	4399	29664	5457
pAML2	1:5	14	6364	8590	20406	4731	34219	3406	28161	4097
pAML2	1:5	15	5270	9421	18965	4726	32269	3380	25639	4913
pAML2	1:5	16	3744	9415	17229	5532	29606	4813	23452	5514
pAML2	1:5	17	1725	8950	15487	5228	26929	4585	21773	5089
pAML2	1:5	18	763	9149	13494	5668	25165	3643	19265	4701
pAML2	1:5	19	-606	8876	11518	5824	22558	4392	17040	5608
pAML2	1:5	20	-1906	8549	9623	4578	20412	4091	15212	4530
pAML2	1:5	21	-3578	8225	8117	5170	18464	3425	13072	5306
pAML2	1:5	22	-3438	6448	6284	4824	14162	6783	10070	7087
pAML2	1:5	23	-3948	9503	4222	8373	9853	9299	5984	10504
pAML2	1:5	24	-5862	8226	1826	6660	6627	6279	2707	8539
pAML2	1:1	0	2827	509	13236	792	18506	3403	12224	1520
pAML2	1:1	1	3354	425	13804	5477	23483	7376	13376	1340
pAML2	1:1	2	4950	59	19052	5728	32806	8682	18813	159
pAML2	1:1	3	6025	567	26223	6816	44347	9436	28243	1283
pAML2	1:1	4	6558	1074	35499	4617	58692	5598	39077	3476
pAML2	1:1	5	7545	1341	45746	2096	78430	5339	51140	6870
pAML2	1:1	6	7666	2215	53641	2027	84762	3747	60161	10851
pAML2	1:1	7	7752	2651	56628	3269	94531	172	63708	12422
pAML2	1:1	8	8092	2428	61273	4878	97258	419	65719	11649

[0352]

细胞	E:T	时间(h)	仅 AML		WT1 T 细胞		G018436		G020845	
			平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
pAML2	1:1	9	8082	2776	60981	3635	99099	1889	66267	12161
pAML2	1:1	10	7993	2486	61917	4229	98349	3181	62931	13995
pAML2	1:1	11	8056	2822	61609	2905	99422	4784	61894	11275
pAML2	1:1	12	8169	3029	61417	3408	96882	3360	60045	11362
pAML2	1:1	13	8012	3644	59798	1717	92606	2004	56536	14761
pAML2	1:1	14	7859	3600	59052	2513	91122	6152	54877	11407
pAML2	1:1	15	7449	4138	57879	1056	89011	4688	53117	13230
pAML2	1:1	16	7051	3838	54344	223	82495	1210	49178	14897
pAML2	1:1	17	6789	3482	53236	871	83153	6883	48985	12343
pAML2	1:1	18	6541	3407	51299	1296	79885	4281	47236	13115
pAML2	1:1	19	6298	3571	50863	1123	77241	1941	44179	16060
pAML2	1:1	20	5860	3227	49140	509	78579	5976	44530	14425
pAML2	1:1	21	5739	3232	49144	560	76285	8774	43881	13326
pAML2	1:1	22	5486	3336	48020	1809	71678	4174	41156	14453
pAML2	1:1	23	5048	3561	45640	2347	70217	243	39684	18408
pAML2	1:1	24	4875	3090	44944	1257	66290	971	38340	17381
pAML2	5:1	0	8544	6060	28453	4417	44573	2389	27036	3558
pAML2	5:1	1	5486	2264	25864	6247	42830	18780	27418	273
pAML2	5:1	2	5389	2108	34805	5246	58200	21938	39574	1559
pAML2	5:1	3	5464	1824	45856	4647	80785	31602	55395	2930
pAML2	5:1	4	5618	1740	63955	154	106818	33332	79920	7865
pAML2	5:1	5	5707	1704	81405	8675	134617	30822	104589	14772

[0353]

细胞	E:T	时间(h)	仅 AML		WT1 T 细胞		G018436		G020845	
			平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
pAML2	5:1	6	5933	1616	96371	19045	158936	28473	124077	21113
pAML2	5:1	7	5794	1747	104357	24148	166931	15749	133412	28607
pAML2	5:1	8	5951	1493	110958	27899	178188	19006	139011	29758
pAML2	5:1	9	5951	1635	112764	28875	177442	8385	139856	33628
pAML2	5:1	10	5812	1582	114032	27647	177171	8365	138313	35590
pAML2	5:1	11	5923	1592	114965	26691	180276	13596	138177	33226
pAML2	5:1	12	5652	1846	115372	26562	179251	11705	135309	35062
pAML2	5:1	13	5699	1742	115277	23959	175482	11608	131966	37172
pAML2	5:1	14	5540	1738	112945	21372	174076	14216	129224	34143
pAML2	5:1	15	5410	1741	112218	22840	172500	13440	126185	36052
pAML2	5:1	16	5246	1920	110570	23432	169658	13577	123089	37580
pAML2	5:1	17	4937	1814	108018	20391	164679	15387	120285	36524
pAML2	5:1	18	4867	1720	107372	19439	160240	12920	117252	36791
pAML2	5:1	19	4613	1713	105140	19053	158829	10417	114201	39638
pAML2	5:1	20	4545	1686	103490	15295	153206	10193	112942	39119
pAML2	5:1	21	4424	1608	101914	15531	154584	14635	109646	39605
pAML2	5:1	22	4503	1393	97216	3580	158951	22107	110452	35950
pAML2	5:1	23	4421	1496	102070	16516	157094	17317	107956	42168
pAML2	5:1	24	4147	1398	97400	12875	152802	21628	102535	37628
pAML3	1:5	1	12582	3249	10361	2988	13320	3070	10415	1839
pAML3	1:5	2	15298	4803	13869	4097	18178	4318	14943	3274
pAML3	1:5	3	18963	6429	18221	5604	23322	6083	20668	5276

[0354]

细胞	E:T	时间(h)	仅 AML		WT1 T 细胞		G018436		G020845	
			平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
pAML3	1:5	4	22457	6780	23222	5874	29903	5654	26837	5859
pAML3	1:5	5	24776	6067	27676	5023	36424	5918	33583	5182
pAML3	1:5	6	25600	4957	30200	3609	39585	4457	37381	3236
pAML3	1:5	7	24996	4617	30785	2581	40343	4686	37885	3358
pAML3	1:5	8	24152	3733	31237	943	40885	3236	38387	1454
pAML3	1:5	9	23057	3264	30090	757	39023	3325	37280	1405
pAML3	1:5	10	21695	3120	29159	79	36791	2358	35296	16
pAML3	1:5	11	20472	2724	27871	360	35190	2077	33338	452
pAML3	1:5	12	19238	2457	25938	12	32623	1810	31255	237
pAML3	1:5	13	17694	2026	24060	494	29513	1469	28238	121
pAML3	1:5	14	16470	2080	22555	726	28031	1255	26502	221
pAML3	1:5	15	15310	1591	21151	24	25659	1187	24083	376
pAML3	1:5	16	14109	1249	19708	143	23311	497	21855	91
pAML3	1:5	17	12846	1490	18351	61	21883	1269	20549	439
pAML3	1:5	18	11779	1441	16742	130	20179	1493	18642	363
pAML3	1:5	19	10918	885	15463	357	18497	1231	17265	615
pAML3	1:5	20	10100	1021	14204	233	16796	1263	15731	620
pAML3	1:5	21	9347	760	13434	171	15558	990	14376	973
pAML3	1:5	22	8605	960	11888	589	13220	329	12542	134
pAML3	1:5	23	7917	111	10922	1673	12178	1252	11610	1101
pAML3	1:5	24	7298	494	9859	1286	11203	762	10330	450
pAML3	1:1	0	68259	25727	97207	18214	102456	17681	84608	11438

[0355]

细胞	E:T	时间(h)	仅 AML		WT1 T 细胞		G018436		G020845	
			平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
pAML3	1:1	1	55874	3593	86234	13603	111636	39890	82047	162
pAML3	1:1	2	58990	2303	100750	10127	138944	43606	101164	617
pAML3	1:1	3	60952	2796	121403	6229	171180	54785	126267	2832
pAML3	1:1	4	60432	5484	139119	1211	211221	62530	159049	2304
pAML3	1:1	5	60817	4334	165467	14640	254404	64942	198967	11259
pAML3	1:1	6	61265	6212	189110	28702	288108	59061	231779	27814
pAML3	1:1	7	60492	7822	203695	40458	310993	56278	249557	44369
pAML3	1:1	8	60232	6164	216221	47755	326310	50857	267681	50484
pAML3	1:1	9	60518	7563	225326	55164	334538	46317	274424	58802
pAML3	1:1	10	59472	7470	229487	63218	337118	38708	277682	67159
pAML3	1:1	11	59351	8653	231348	60991	339951	37616	280712	69801
pAML3	1:1	12	58614	8981	233469	62597	340214	38456	278257	70226
pAML3	1:1	13	58045	8457	232452	63694	337923	40004	273834	75001
pAML3	1:1	14	56364	8590	230905	58826	333105	39048	269932	72291
pAML3	1:1	15	55270	9421	227313	59089	328020	38106	264279	72318
pAML3	1:1	16	53744	9415	224262	58529	322573	34305	257591	75632
pAML3	1:1	17	51725	8950	219496	54219	316631	35147	251219	71994
pAML3	1:1	18	50763	9149	214232	55788	311921	35067	246799	74399
pAML3	1:1	19	49394	8876	210735	51467	305117	31176	237576	76125
pAML3	1:1	20	48094	8549	208073	50046	299844	30750	232906	72969
pAML3	1:1	21	46422	8225	203897	48794	295411	30793	227855	72688
pAML3	1:1	22	46562	6448	204648	40380	293864	36721	224722	70985

[0356]

细胞	E:T	时间(h)	仅 AML		WT1 T 细胞		G018436		G020845	
			平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
pAML3	1:1	23	46052	9503	200231	49006	281606	25580	215769	74244
pAML3	1:1	24	44138	8226	193355	41211	270499	30321	203219	65506
pAML3	5:1	0	1497	181	16645	4286	27783	7256	16759	5089
pAML3	5:1	1	1057	557	17905	8072	30772	16783	17292	937
pAML3	5:1	2	1365	689	23199	9299	45357	25362	25530	885
pAML3	5:1	3	1787	743	31499	12103	61927	33738	38169	469
pAML3	5:1	4	2038	587	42510	11975	81020	33648	56022	6991
pAML3	5:1	5	2242	301	51711	11057	101875	34759	74314	14516
pAML3	5:1	6	2197	121	58555	7821	111321	28866	85164	22043
pAML3	5:1	7	2117	38	61037	5875	116775	29067	89121	28320
pAML3	5:1	8	1914	40	60639	5195	114847	27811	88058	28205
pAML3	5:1	9	1780	67	60299	6339	112291	25298	86386	28286
pAML3	5:1	10	1591	112	58519	7213	107793	24110	81350	28741
pAML3	5:1	11	1470	121	56218	7214	104477	23765	77556	27804
pAML3	5:1	12	1327	83	53737	7027	100753	23126	72172	27358
pAML3	5:1	13	1217	153	52654	7676	96013	21370	66847	28562
pAML3	5:1	14	1093	140	50252	8369	92196	21792	63774	25036
pAML3	5:1	15	1025	139	47335	7062	87446	19476	60954	24853
pAML3	5:1	16	940	165	45286	7436	82553	16580	57709	25155
pAML3	5:1	17	867	151	43601	8013	80131	18965	54512	21754
pAML3	5:1	18	796	137	42304	7789	78147	17233	52507	22782
pAML3	5:1	19	743	157	41231	7661	77073	19461	50332	24037

[0357]

细胞	E:T	时间(h)	仅 AML		WT1 T 细胞		G018436		G020845	
			平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
pAML3	5:1	20	678	128	38692	6746	75269	18976	48458	22131
pAML3	5:1	21	641	85	37339	6557	72678	17533	46532	21236
pAML3	5:1	22	578	83	36893	7383	66802	11306	44382	22312
pAML3	5:1	23	513	112	34432	3912	64088	9368	43262	24830
pAML3	5:1	24	485	93	33681	5254	60961	10700	40655	22416

[0358] 实施例10-T细胞中的额外单引导物分析

[0359] 如实施例3中所概述制备T细胞。单引导物 (sgRNA) 在95℃温育2分钟并且冷却至室温。然后将sgRNA与Spy Cas9蛋白一起温育,以形成核糖核蛋白 (RNP) 复合物。对于经刺激的人类T细胞,用使用制造商的Amaya™ 96孔Shuttle™方案使用P3 Primary Cell 4D-

Nucleofector X试剂盒 (Lonza, 目录PB-P3-22500) 核转染的含有Spy Cas9 (3nM) 和个别sgRNA (6nM) 的RNP转染CD3⁺ T细胞。核转染后立即向细胞中添加T细胞培养基并培养。电穿孔两天后, 收集一部分细胞并且如实施例1中进行NGS。平均编辑百分比示于表13。

[0360] 表13-sgRNA编辑后T细胞中TIM3基因座处的平均编辑百分比 (n=2)

引导物	平均编辑%	SD
G015091	86.10	0.20
G015092	99.60	0.00
G016811	95.55	0.15
G016812	89.50	0.00
G016813	98.60	0.00

[0362] 实施例11-额外实施方案

[0363] 实施方案1是一种工程化细胞, 所述工程化细胞包含在人类TIM3序列中在chr5: 157085832-157109044的基因组坐标内的基因修饰。

[0364] 实施方案2是实施方案1的工程化细胞, 其中所述基因修饰选自插入、缺失和取代。

[0365] 实施方案3是实施方案1或2的工程化细胞, 其中所述基因修饰抑制所述TIM3基因的表达。

[0366] 实施方案4是实施方案1-3中任一项的工程化细胞, 其中所述基因修饰包括以下内的至少一个核苷酸的修饰: 选自以下的基因组坐标:

TIM 3 NO	基因组坐标 (hg38)
TIM3-1	chr5:157106867-157106887
TIM3-2	chr5:157106862-157106882
TIM3-3	chr5:157106803-157106823
TIM3-4	chr5:157106850-157106870
TIM3-5	chr5:157104726-157104746
TIM3-6	chr5:157106668-157106688
TIM3-7	chr5:157104681-157104701
TIM3-8	chr5:157104681-157104701
TIM3-9	chr5:157104680-157104700
TIM3-10	chr5:157106676-157106696
TIM3-11	chr5:157087271-157087291
TIM3-12	chr5:157095432-157095452
TIM3-13	chr5:157095361-157095381
TIM3-14	chr5:157095360-157095380
TIM3-15	chr5:157108945-157108965
TIM3-18	chr5:157106751-157106771
TIM3-19	chr5:157095419-157095439
TIM3-22	chr5:157104679-157104699
TIM3-23	chr5:157106824-157106844
TIM3-26	chr5:157087117-157087137

TIM3-29	chr5:157095379-157095399
TIM3-32	chr5:157106864-157106884
TIM3-42	chr5:157095405-157095425
TIM3-44	chr5:157095404-157095424
TIM3-56	chr5:157106888-157106908
TIM3-58	chr5:157087126-157087146
TIM3-59	chr5:157087253-157087273
TIM3-62	chr5:157106889-157106909
TIM3-63	chr5:157106935-157106955
TIM3-66	chr5:157106641-157106661
TIM3-69	chr5:157087084-157087104
TIM3-75	chr5:157104663-157104683
TIM3-82	chr5:157106875-157106895
TIM3-86	chr5:157087184-157087204
TIM3-87	chr5:157106936-157106956
TIM3-88	chr5:157104696-157104716

[0368] 任选地选自以下靶向的那些的基因组坐标:TIM3-1至TIM3-4、TIM3-6至TIM3-15、TIM3-18、TIM3-19、TIM3-22、TIM3-29、TIM3-42、TIM3-44、TIM3-58、TIM3-62、TIM3-69、TIM3-82、TIM3-86和TIM3-88;TIM3-1至TIM3-5、TIM3-7、TIM3-8、TIM3-12至TIM3-15、TIM3-23、TIM3-26、TIM3-32、TIM3-56、TIM3-59、TIM3-63、TIM3-66、TIM3-75和TIM3-87;TIM3-2、TIM3-4、TIM3-15、TIM3-23、TIM3-56、TIM3-59、TIM3-63、TIM3-75和TIM3-87;TIM3-1至TIM3-4;TIM3-2、TIM3-4和TIM3-15;TIM3-2、TIM3-4、TIM3-15、TIM3-63和TIM3-87;TIM3-2和TIM3-15;TIM3-63和TIM3-87;或TIM3-15。

[0369] 实施方案5是实施方案1-4中任一项的工程化细胞,其中所述工程化细胞包含内源T细胞受体(TCR)序列的基因组坐标内的基因修饰,其中所述基因修饰抑制所述TCR基因的表达。

[0370] 实施方案6是实施方案5的工程化细胞,其中所述TCR基因是TRAC或TRBC。

[0371] 实施方案7是实施方案6的工程化细胞,所述工程化细胞包含TRBC在选自以下的基因组坐标内的基因修饰:

[0372]

TRBC NO:	基因组坐标(hg38)
TRBC-1	chr7:142791996-142792016
TRBC-2	chr7:142792047-142792067
TRBC-3	chr7:142792008-142792028
TRBC-4	chr7:142791931-142791951
TRBC-5	chr7:142791930-142791950
TRBC-6	chr7:142791748-142791768
TRBC-7	chr7:142791720-142791740
TRBC-8	chr7:142792041-142792061
TRBC-9	chr7:142802114-142802134
TRBC-10	chr7:142792009-142792029
TRBC-11	chr7:142792697-142792717
TRBC-12	chr7:142791963-142791983
TRBC-13	chr7:142791976-142791996
TRBC-14	chr7:142791974-142791994
TRBC-15	chr7:142791970-142791990
TRBC-16	chr7:142791948-142791968

[0373]

TRBC NO:	基因组坐标(hg38)
TRBC-17	chr7:142791913-142791933
TRBC-18	chr7:142791961-142791981
TRBC-19	chr7:142792068-142792088
TRBC-20	chr7:142791975-142791995
TRBC-21	chr7:142791773-142791793
TRBC-22	chr7:142791919-142791939
TRBC-23	chr7:142791834-142791854
TRBC-24	chr7:142791878-142791898
TRBC-25	chr7:142802141-142802161
TRBC-26	chr7:142791844-142791864
TRBC-27	chr7:142801154-142801174
TRBC-28	chr7:142791961-142791981
TRBC-29	chr7:142792001-142792021
TRBC-30	chr7:142791979-142791999
TRBC-31	chr7:142792041-142792061
TRBC-32	chr7:142792003-142792023
TRBC-33	chr7:142791984-142792004
TRBC-34	chr7:142792002-142792022
TRBC-35	chr7:142791966-142791986
TRBC-36	chr7:142792007-142792027
TRBC-37	chr7:142791993-142792013
TRBC-38	chr7:142791902-142791922
TRBC-39	chr7:142791724-142791744
TRBC-40	chr7:142791973-142791993
TRBC-41	chr7:142791920-142791940
TRBC-42	chr7:142791994-142792014
TRBC-43	chr7:142791887-142791907
TRBC-44	chr7:142791907-142791927
TRBC-45	chr7:142791952-142791972
TRBC-46	chr7:142791721-142791741
TRBC-47	chr7:142792718-142792738
TRBC-48	chr7:142791729-142791749
TRBC-49	chr7:142791911-142791931
TRBC-50	chr7:142791867-142791887
TRBC-51	chr7:142791899-142791919
TRBC-52	chr7:142791727-142791747
TRBC-53	chr7:142791949-142791969
TRBC-54	chr7:142791933-142791953
TRBC-55	chr7:142791932-142791952
TRBC-56	chr7:142792057-142792077

[0374]

TRBC NO:	基因组坐标(hg38)
TRBC-57	chr7:142791940-142791960
TRBC-58	chr7:142791747-142791767
TRBC-59	chr7:142791881-142791901
TRBC-60	chr7:142791779-142791799
TRBC-61	chr7:142792054-142792074
TRBC-62	chr7:142792069-142792089
TRBC-63	chr7:142792712-142792732
TRBC-64	chr7:142791729-142791749
TRBC-65	chr7:142791821-142791841
TRBC-66	chr7:142792052-142792072
TRBC-67	chr7:142791916-142791936
TRBC-68	chr7:142791899-142791919
TRBC-69	chr7:142791772-142791792
TRBC-70	chr7:142792714-142792734
TRBC-71	chr7:142792042-142792062
TRBC-72	chr7:142791962-142791982
TRBC-73	chr7:142791988-142792008
TRBC-74	chr7:142791982-142792002
TRBC-75	chr7:142792049-142792069
TRBC-76	chr7:142791839-142791859
TRBC-77	chr7:142791893-142791913
TRBC-78	chr7:142791945-142791965
TRBC-79	chr7:142791964-142791984
TRBC-80	chr7:142791757-142791777
TRBC-81	chr7:142792048-142792068
TRBC-82	chr7:142791774-142791794
TRBC-83	chr7:142792048-142792068
TRBC-84	chr7:142791830-142791850
TRBC-85	chr7:142791909-142791929
TRBC-86	chr7:142791912-142791932
TRBC-87	chr7:142791766-142791786
TRBC-88	chr7:142791880-142791900
TRBC-89	chr7:142791919-142791939

[0375] 实施方案8是实施方案5-7中任一项的工程化细胞,所述工程化细胞包含TRAC在选自以下的基因组坐标内的基因修饰:

[0376]

TRAC NO:	基因组坐标(hg38)
TRAC-90	chr14:22547524-22547544
TRAC-91	chr14:22550581-22550601

[0377]

TRAC NO:	基因组坐标(hg38)
TRAC-92	chr14:22550608-22550628
TRAC-93	chr14:22550611-22550631
TRAC-94	chr14:22550622-22550642
TRAC-95	chr14:22547529-22547549
TRAC-96	chr14:22547512-22547532
TRAC-97	chr14:22547525-22547545
TRAC-98	chr14:22547536-22547556
TRAC-99	chr14:22547575-22547595
TRAC-100	chr14:22547640-22547660
TRAC-101	chr14:22547647-22547667
TRAC-102	chr14:22547777-22547797
TRAC-103	chr14:22549638-22549658
TRAC-104	chr14:22549646-22549666
TRAC-105	chr14:22550600-22550620
TRAC-106	chr14:22550605-22550625
TRAC-107	chr14:22550625-22550645
TRAC-108	chr14:22539116-22539136
TRAC-109	chr14:22539120-22539140
TRAC-110	chr14:22547518-22547538
TRAC-111	chr14:22539082-22539102
TRAC-112	chr14:22539061-22539081
TRAC-113	chr14:22539097-22539117
TRAC-114	chr14:22547697-22547717
TRAC-115	chr14:22550571-22550591
TRAC-116	chr14:22550631-22550651
TRAC-117	chr14:22550658-22550678
TRAC-118	chr14:22547712-22547732
TRAC-119	chr14:22550636-22550656
TRAC-120	chr14:22550636-22550656
TRAC-121	chr14:22550582-22550602
TRAC-122	chr14:22550606-22550626
TRAC-123	chr14:22550609-22550629
TRAC-124	chr14:22547691-22547711
TRAC-125	chr14:22547576-22547596
TRAC-126	chr14:22549648-22549668
TRAC-127	chr14:22549660-22549680
TRAC-128	chr14:22547716-22547736
TRAC-129	chr14:22547514-22547534
TRAC-130	chr14:22550662-22550682
TRAC-131	chr14:22550593-22550613

[0378]

TRAC NO:	基因组坐标(hg38)
TRAC-132	chr14:22550612-22550632
TRAC-133	chr14:22547521-22547541
TRAC-134	chr14:22547540-22547560
TRAC-135	chr14:22539121-22539141
TRAC-136	chr14:22547632-22547652
TRAC-137	chr14:22547674-22547694
TRAC-138	chr14:22549643-22549663
TRAC-139	chr14:22547655-22547675
TRAC-140	chr14:22547667-22547687
TRAC-141	chr14:22539085-22539105
TRAC-142	chr14:22549634-22549654
TRAC-143	chr14:22539064-22539084
TRAC-144	chr14:22547639-22547659
TRAC-145	chr14:22547731-22547751
TRAC-146	chr14:22547734-22547754
TRAC-147	chr14:22547591-22547611
TRAC-148	chr14:22547657-22547677
TRAC-149	chr14:22547519-22547539
TRAC-150	chr14:22549674-22549694
TRAC-151	chr14:22547678-22547698
TRAC-152	chr14:22539087-22539107
TRAC-153	chr14:22547595-22547615
TRAC-154	chr14:22547633-22547653
TRAC-155	chr14:22547732-22547752
TRAC-156	chr14:22547656-22547676
TRAC-157	chr14:22539086-22539106
TRAC-158	chr14:22547491-22547511
TRAC-159	chr14:22547618-22547638
TRAC-160	chr14:22549644-22549664
TRAC-161	chr14:22547522-22547542
TRAC-162	chr14:22539089-22539109
TRAC-163	chr14:22539062-22539082
TRAC-164	chr14:22547597-22547617
TRAC-165	chr14:22547677-22547697
TRAC-166	chr14:22549645-22549665
TRAC-167	chr14:22550610-22550630
TRAC-168	chr14:22547511-22547531
TRAC-169	chr14:22550607-22550627
TRAC-170	chr14:22550657-22550677
TRAC-171	chr14:22550604-22550624

[0379]

TRAC NO:	基因组坐标(hg38)
TRAC-172	chr14:22539132-22539152
TRAC-173	chr14:22550632-22550652
TRAC-174	chr14:22547571-22547591
TRAC-175	chr14:22547711-22547731
TRAC-176	chr14:22547666-22547686
TRAC-177	chr14:22547567-22547587
TRAC-178	chr14:22547624-22547644
TRAC-185	chr14:22547501-22547521
TRAC-213	chr14:22547519-22547539
TRAC-214	chr14:22547556-22547576
TRAC-215	chr14:22547486-22547506
TRAC-216	chr14:22547487-22547507
TRAC-217	chr14:22547493-22547513
TRAC-218	chr14:22547502-22547522

[0380] 任选地所述基因修饰在选自chr14:22547524-22547544、chr14:22547529-22547549、chr14:22547525-22547545、chr14:22547536-22547556、chr14:22547501-22547521、chr14:22547556-22547576和chr14:22547502-22547522的基因组坐标内。

[0381] 实施方案9是实施方案1-8中任一项的工程化细胞,其中所述细胞包含基因修饰,其中所述基因修饰抑制一种或多种MHC I类蛋白质的表达。

[0382] 实施方案10是实施方案9的工程化细胞,其中所述抑制一种或多种MHC I类蛋白质表达的基因修饰是B2M序列中的基因修饰,其中所述基因修饰在选自以下的基因组坐标内:

[0383]

基因组位置(hg38)	引导序列	SEQ ID NO:	B2M-#
chr15:44711469-44711494	UGGCUGGGCACGCGUUUAAUUAAG	412	B2M-1
chr15:44711472-44711497	CUGGGCACGCGUUUAAUAUAAGUGG	413	B2M-2
chr15:44711483-44711508	UUUAAUAUAAGUGGAGGCGUCGCGC	414	B2M-3
chr15:44711486-44	AAUAUAAGUGGAGGCGUCG	415	B2M-

[0384]

基因组位置(hg38)	引导序列	SEQ ID NO:	B2M-#
711511	CGCUGG		4
chr15:44711487-44711512	AUAUAAGUGGAGGCGUCGC GCUGGC	416	B2M-5
chr15:44711512-44711537	GGGCAUUCCUGAAGCUGAC AGCAUU	417	B2M-6
chr15:44711513-44711538	GGCAUUCCUGAAGCUGACA GCAUUC	418	B2M-7
chr15:44711534-44711559	AUUCGGGCCGAGAUGUCUC GCUCCG	419	B2M-8
chr15:44711568-44711593	CUGUGCUCGCGCUACUCUC UCUUUC	420	B2M-9
chr15:44711573-44711598	CUCGCGCUACUCUCUCUUU CUGGCC	421	B2M-10
chr15:44711576-44711601	GCGCUACUCUCUCUUUCUG GCCUGG	422	B2M-11
chr15:44711466-44711491	AUAUUAACGCGUGCCCAG CCAAUC	423	B2M-12
chr15:44711522-44711547	UCUCGGCCCCGAAUGCUGUC AGCUUC	424	B2M-13
chr15:44711544-44711569	GCUAAGGCCACGGAGCGAG ACAUCU	425	B2M-14
chr15:44711559-44711584	AGUAGCGCGAGCACAGCUA AGGCCA	426	B2M-15
chr15:44711565-44711590	AGAGAGAGUAGCGCGAGCA CAGCUA	427	B2M-16
chr15:44711599-44711624	GAGAGACUCACGCUGGAUA GCCUCC	428	B2M-17
chr15:44711611-44711636	GCGGGAGGGUAGGAGAGAC UCACGC	429	B2M-18
chr15:44715412-44715437	UAUUCCUCAGGUACUCCAA AGAUUC	430	B2M-19
chr15:44715440-44715465	UUUACUCACGUCAUCCAGC AGAGAA	431	B2M-20
chr15:44715473-44715498	CAAUUUCCUGAAUUGCUA UGUGUC	432	B2M-21
chr15:44715474-44715499	AAAUUUCCUGAAUUGCUAU GUGUCU	433	B2M-22
chr15:44715515-44715540	ACAUUGAAGUUGACUUACU GAAGAA	434	B2M-23
chr15:44715535-44	AAGAAUGGAGAGAGAAUUG	435	B2M-

[0385]

基因组位置(hg38)	引导序列	SEQ ID NO:	B2M-#
715560	AAAAAG		24
chr15:44715562-44715587	GAGCAUUCAGACUUGUCUUUCAGCA	436	B2M-25
chr15:44715567-44715592	UUCAGACUUGUCUUUCAGCAAGGAC	437	B2M-26
chr15:44715672-44715697	UUUGUCACAGCCCAAGAUAGUUAAG	438	B2M-27
chr15:44715673-44715698	UUGUCACAGCCCAAGAUAGUUAAGU	439	B2M-28
chr15:44715674-44715699	UGUCACAGCCCAAGAUAGUUAAGUG	440	B2M-29
chr15:44715410-44715435	AUCUUUGGAGUACCUGAGGAAUAUC	441	B2M-30
chr15:44715411-44715436	AAUCUUUGGAGUACCUGAGGAAUAU	442	B2M-31
chr15:44715419-44715444	UAAACCUGAAUCUUUGGAGUACCUG	443	B2M-32
chr15:44715430-44715455	GAUGACGUGAGUAAACCUGAAUCUU	444	B2M-33
chr15:44715457-44715482	GGAAAUUUGACUUUCCAUUCUCUGC	445	B2M-34
chr15:44715483-44715508	AUGAAACCCAGACACAUAAGCAAUUC	446	B2M-35
chr15:44715511-44715536	UCAGUAAGUCAACUUCAAUGUCGGA	447	B2M-36
chr15:44715515-44715540	UUCUUCAGUAAGUCAACUUCAAUGU	448	B2M-37
chr15:44715629-44715654	CAGGCAUACUCAUCUUUUUCAGUGG	449	B2M-38
chr15:44715630-44715655	GCAGGCAUACUCAUCUUUUUCAGUG	450	B2M-39
chr15:44715631-44715656	GGCAGGCAUACUCAUCUUUUUCAGU	451	B2M-40
chr15:44715632-44715657	CGGCAGGCAUACUCAUCUUUUUCAG	452	B2M-41
chr15:44715653-44715678	GACAAAGUCACAUGGUUCACACGGC	453	B2M-42
chr15:44715657-44715682	CUGUGACAAAGUCACAUGGUUCACA	454	B2M-43
chr15:44715666-44	UAUCUUGGGCUGUGACAAA	455	B2M-

[0386]

基因组位置(hg38)	引导序列	SEQ ID NO:	B2M-#
715691	GUCACA		44
chr15:44715685-44715710	AAGACUUACCCACUUAACUAUCUU	456	B2M-45
chr15:44715686-44715711	UAAGACUUACCCACUUAACUAUCU	457	B2M-46
chr15:44716326-44716351	AGAUCGAGACAUGUAAGCAGCAUCA	458	B2M-47
chr15:44716329-44716354	UCGAGACAUGUAAGCAGCAUCAUGG	459	B2M-48
chr15:44716313-44716338	AUGUCUCGAUCUAUGAAAAAGACAG	460	B2M-49
chr15:44717599-44717624	UUUUCAGGUUGAAGAUGC CGCAU	461	B2M-50
chr15:44717604-44717629	AGGUUGAAGAUGCCGCAU UUGGAU	462	B2M-51
chr15:44717681-44717706	CACUACACUUUAUGCACA AAAUGU	463	B2M-52
chr15:44717682-44717707	ACUACACUUUAUGCACAA AAUGUA	464	B2M-53
chr15:44717702-44717727	AUGUAGGGUUAUAUAUAUG UUAACA	465	B2M-54
chr15:44717764-44717789	GUCUCCAUGUUUGAUGUAU CUGAGC	466	B2M-55
chr15:44717776-44717801	GAUGUAUCUGAGCAGGUUG CUCCAC	467	B2M-56
chr15:44717786-44717811	AGCAGGUUGCUCACAGGU AGCUCU	468	B2M-57
chr15:44717789-44717814	AGGUUGCUCACAGGUAGC UCUAGG	469	B2M-58
chr15:44717790-44717815	GGUUGCUCACAGGUAGCU CUAGGA	470	B2M-59
chr15:44717794-44717819	GCUCCACAGGUAGCUCUAG GAGGGC	471	B2M-60
chr15:44717805-44717830	AGCUCUAGGAGGGCUGGCA ACUAG	472	B2M-61
chr15:44717808-44717833	UCUAGGAGGGCUGGCAACU UAGAGG	473	B2M-62
chr15:44717809-44717834	CUAGGAGGGCUGGCAACUU AGAGGU	474	B2M-63
chr15:44717810-44	UAGGAGGGCUGGCAACUUA	475	B2M-

基因组位置(hg38)	引导序列	SEQ ID NO:	B2M-#
717835	GAGGUG		64
chr15:44717846-44717871	AUUCUCUUAUCCAACAUCAACAUCU	476	B2M-65
chr15:44717945-44717970	CAAUUUACAUACUCUGCUUAGAAUU	477	B2M-66
chr15:44717946-44717971	AAUUUACAUACUCUGCUUAGAAUUU	478	B2M-67
chr15:44717947-44717972	AUUUACAUACUCUGCUUAGAAUUUG	479	B2M-68
chr15:44717948-44717973	UUUACAUACUCUGCUUAGAAUUUGG	480	B2M-69
chr15:44717973-44717998	GGGAAAAUUUAGAAUAUAUAUUGAC	481	B2M-70
chr15:44717981-44718006	UUAGAAAUAAUUGACAGGAUUAU	482	B2M-71
chr15:44718056-44718081	UACUUCUUAUACAUUUGAUAAAGUA	483	B2M-72
chr15:44718061-44718086	CUUAUACAUUUGAUAAAGUAAGGCA	484	B2M-73
chr15:44718067-44718092	CAUUUGAUAAAGUAAGGCAUGGUUG	485	B2M-74
chr15:44718076-44718101	AAGUAAGGCAUGGUUGUGGUAAUC	486	B2M-75
chr15:44717589-44717614	CUUCAAAACCUGAAAAGAAAAGAAAA	487	B2M-76
chr15:44717620-44717645	AUUUGGAAUUCAUCCAAUCCAAUG	488	B2M-77
chr15:44717642-44717667	UAUUAAAAAGCAAGCAAGCAGAAUU	489	B2M-78
chr15:44717771-44717796	GCAACCUGCUCAGAUACAUCAAACA	490	B2M-79
chr15:44717800-44717825	UUGCCAGCCCUCCUAGAGCUACCUG	491	B2M-80
chr15:44717859-44717884	UCAAUUCUGACCAAGAUGUUGAUGU	492	B2M-81
chr15:44717947-44717972	CAAAUUCUAAGCAGAGUAUGUAAAU	493	B2M-82
chr15:44718119-44718144	CAAGUUUUAUGAUUUUAUUUAACUUG	494	BM4-83

[0388] 实施方案11是实施方案9的工程化细胞,其中所述抑制一种或多种MHC I类蛋白质表达的基因修饰是HLA-A序列中的基因修饰,并且任选地其中所述基因修饰在选自以下的基因组坐标内:chr6:29942854至chr6:29942913和chr6:29943518至chr6:29943619,任选地选自以下的基因组坐标:chr6:29942864-29942884;chr6:29942868-29942888;chr6:29942876-29942896;chr6:29942877-29942897;chr6:29942883-29942903;chr6:

29943126-29943146;chr6:29943528-29943548;chr6:29943529-29943549;chr6:29943530-29943550;chr6:29943537-29943557;chr6:29943549-29943569;chr6:29943589-29943609;和chr6:29944026-29944046。

[0389] 实施方案12是前述实施方案中任一项的工程化细胞,其中所述细胞包含基因修饰,其中所述基因修饰抑制一种或多种MHC II类蛋白质的表达。

[0390] 实施方案13是实施方案12的工程化细胞,其中所述抑制一种或多种MHC II类蛋白质表达的基因修饰是CIITA序列中的基因修饰,其中所述基因修饰在选自以下的基因组坐标内:chr:16:10902171-10923242,任选地chr16:10902662-10923285、chr16:10906542-:10923285或chr16:10906542-:10908121,任选地chr16:10908132-10908152、chr16:10908131-10908151、chr16:10916456-10916476、chr16:10918504-10918524、chr16:10909022-10909042、chr16:10918512-10918532、chr16:10918511-10918531、chr16:10895742-10895762、chr16:10916362-10916382、chr16:10916455-10916475、chr16:10909172-10909192、chr16:10906492-10906512、chr16:10909006-10909026、chr16:10922478-10922498、chr16:10895747-10895767、chr16:10916348-10916368、chr16:10910186-10910206、chr16:10906481-10906501、chr16:10909007-10909027、chr16:10895410-10895430和chr16:10908130-10908150;任选地chr16:10918504-10918524、chr16:10923218-10923238、chr16:10923219-10923239、chr16:10923221-10923241、chr16:10906486-10906506、chr16:10906485-10906505、chr16:10903873-10903893、chr16:10909172-10909192、chr16:10918423-10918443、chr16:10916362-10916382、chr16:10916450-10916470、chr16:10922153-10922173、chr16:10923222-10923242、chr16:10910176-10910196、chr16:10895742-10895762、chr16:10916449-10916469、chr16:10923214-10923234、chr16:10906492-10906512和chr16:10906487-1090650;或任选地chr16:10916432-10916452、chr16:10922444-10922464、chr16:10907924-10907944、chr16:10906985-10907005、chr16:10908073-10908093、chr16:10907433-10907453、chr16:10907979-10907999、chr16:10907139-10907159、chr16:10922435-10922455、chr16:10907384-10907404、chr16:10907434-10907454、chr16:10907119-10907139、chr16:10907539-10907559、chr16:10907810-10907830、chr16:10907315-10907335、chr16:10916426-10916446、chr16:10909138-10909158、chr16:10908101-10908121、chr16:10907790-10907810、chr16:10907787-10907807、chr16:10907454-10907474、chr16:10895702-10895722、chr16:10902729-10902749、chr16:10918492-10918512、chr16:10907932-10907952、chr16:10907623-10907643、chr16:10907461-10907481、chr16:10902723-10902743、chr16:10907622-10907642、chr16:10922441-10922461、chr16:10902662-10902682、chr16:10915626-10915646、chr16:10915592-10915612、chr16:10907385-10907405、chr16:10907030-10907050、chr16:10907935-10907955、chr16:10906853-10906873、chr16:10906757-10906777、chr16:10907730-10907750和chr16:10895302-10895322。

[0391] 实施方案14是实施方案12或13的工程化细胞,其中所述抑制一种或多种MHC II类蛋白质表达的基因修饰包括CIITA剪接位点的至少一个核苷酸的修饰,任选地

[0392] a)CIITA剪接供体位点的至少一个核苷酸的修饰;和/或

[0393] b) CIITA剪接位点边界核苷酸的修饰。

[0394] 实施方案15是实施方案1-14中任一项的工程化细胞,其中所述细胞的TIM3蛋白的细胞表面表达减少。

[0395] 实施方案16是实施方案1-15中任一项的工程化细胞,其中所述细胞的TIM3蛋白的细胞表面表达减少并且TRAC蛋白的细胞表面表达减少。

[0396] 实施方案17是实施方案15或16的工程化细胞,所述工程化细胞还包括TRBC蛋白的细胞表面表达减少。

[0397] 实施方案18是实施方案16或17中任一项的工程化细胞,其中TIM3的细胞表面表达低于检测水平。

[0398] 实施方案19是实施方案16-18中任一项的工程化细胞,其中TRAC和TRBC中至少一者的细胞表面表达低于检测水平。

[0399] 实施方案20是实施方案19的工程化细胞,其中TIM3、TRAC和TRBC中的每一者的细胞表面表达低于检测水平。

[0400] 实施方案21是前述实施方案中任一项的工程化细胞,所述工程化细胞包含在人类2B4/CD244序列中在chr1:160830160-160862887的基因组坐标内的基因修饰。

[0401] 实施方案22是实施方案21的工程化细胞,其中2B4/CD244中的基因修饰在选自以下的基因组坐标内:

[0402]	2B4 NO	基因组坐标(hg38)
	2B4-1	chr1:160841611-160841631
	2B4-2	chr1:160841865-160841885
	2B4-3	chr1:160862624-160862644
	2B4-4	chr1:160862671-160862691
	2B4-5	chr1:160841622-160841642
	2B4-6	chr1:160841819-160841839
	2B4-7	chr1:160841823-160841843
	2B4-8	chr1:160841717-160841737
	2B4-9	chr1:160841859-160841879
	2B4-10	chr1:160841806-160841826

[0403]

2B4 NO	基因组坐标(hg38)
2B4-11	chr1:160841834-160841854
2B4-12	chr1:160841780-160841800
2B4-13	chr1:160841713-160841733
2B4-14	chr1:160841631-160841651
2B4-15	chr1:160841704-160841724
2B4-16	chr1:160841584-160841604
2B4-17	chr1:160841679-160841699
2B4-18	chr1:160841874-160841894
2B4-19	chr1:160841750-160841770
2B4-20	chr1:160841577-160841597
2B4-21	chr1:160841459-160841479
2B4-22	chr1:160841466-160841486
2B4-23	chr1:160841461-160841481
2B4-24	chr1:160841460-160841480
2B4-25	chr1:160841360-160841380
2B4-26	chr1:160841304-160841324
2B4-27	chr1:160841195-160841215
2B4-28	chr1:160841305-160841325

[0404] 任选地选自2B4-1至2B4-5;2B4-1和2B4-2;或2B4-3、2B4-4、2B4-10和2B4-17所靶向的那些的基因组坐标。

[0405] 实施方案23是前述实施方案中任一项的工程化细胞,所述工程化细胞包含在人类LAG3序列中在chr12:6772483-6778455的基因组坐标内的基因修饰。

[0406] 实施方案24是实施方案23的工程化细胞,其中LAG3中的基因修饰在选自以下的基因组坐标内:

[0407]

LAG 3 NO	基因组坐标(hg38)
LAG3-1	chr12:6773938-6773958
LAG3-2	chr12:6774678-6774698
LAG3-3	chr12:6772894-6772914
LAG3-4	chr12:6774816-6774836
LAG3-5	chr12:6774742-6774762
LAG3-6	chr12:6775380-6775400
LAG3-7	chr12:6774727-6774747
LAG3-8	chr12:6774732-6774752

[0408]	LAG 3 NO	基因组坐标(hg38)
	LAG3- 9	chr12:6777435-6777455
	LAG3- 10	chr12:6774771-6774791
	LAG3- 11	chr12:6772909-6772929
	LAG3- 12	chr12:6774735-6774755
	LAG3- 13	chr12:6773783-6773803
	LAG3- 14	chr12:6775292-6775312
	LAG3- 15	chr12:6777433-6777453
	LAG3- 16	chr12:6778268-6778288
	LAG3- 17	chr12:6775444-6775464
	LAG3-24	chr12:6777783-6777803
	LAG3-26	chr12:6777784-6777804
	LAG3-41	chr12:6778252-6778272
	LAG3-59	chr12:6777325-6777345
	LAG3-83	chr12:6777329-6777349

[0409] 任选地选自LAG3-1至LAG3-15;LAG3-1至LAG3-11;LAG3-1至LAG3-4;或LAG3-1、LAG3-4、LAG3-5和LAG3-9所靶向的那些的基因组坐标。

[0410] 实施方案25是实施方案1-24中任一项的工程化细胞,所述工程化细胞包含在人类PD-1序列中在chr2:241849881-241858908的基因组坐标内的基因修饰。

[0411] 实施方案26是实施方案21-25中任一项的工程化细胞,其中所指示基因组坐标中的基因修饰选自插入、缺失和取代。

[0412] 实施方案27是实施方案21-26中任一项的工程化细胞,其中所述基因修饰抑制存在所述基因修饰的基因的表达。

[0413] 实施方案28是实施方案1-27中任一项的工程化细胞,其中所述基因修饰包括插入/缺失。

[0414] 实施方案29是实施方案1-28中任一项的工程化细胞,其中所述基因修饰包括插入异源编码序列。

[0415] 实施方案30是实施方案1-27和29中任一项的工程化细胞,其中所述基因修饰包括取代。

[0416] 实施方案31是实施方案30的工程化细胞,其中所述取代包括C至T取代或A至G取代。

[0417] 实施方案32是实施方案1-31中任一项的工程化细胞,其中所述基因修饰导致核酸序列的改变,其阻止具有全长蛋白质的氨基酸序列的全长蛋白质在基因修饰前的翻译。

[0418] 实施方案33是实施方案32的工程化细胞,其中所述基因修饰导致核酸序列的改变,其在所述全长蛋白质的编码序列中产生过早终止密码子。

[0419] 实施方案34是实施方案32的工程化细胞,其中所述基因修饰导致核酸序列的改变,其导致前mRNA从基因组基因座的剪接改变。

[0420] 实施方案35是实施方案1-34中任一项的工程化细胞,其中所述抑制导致来自包含基因修饰的基因的蛋白质的细胞表面表达减少。

[0421] 实施方案36是实施方案1-34中任一项的工程化细胞,其中所述抑制导致由包含基因修饰的基因调控的蛋白质的细胞表面表达减少。

[0422] 实施方案37是实施方案1-36中任一项的工程化细胞,其中所述细胞包含编码在所述工程化细胞的表面上表达的靶向受体的外源核酸。

[0423] 实施方案38是实施方案37的工程化细胞,其中所述靶向受体是CAR。

[0424] 实施方案39是实施方案37的工程化细胞,其中所述靶向受体是TCR。

[0425] 实施方案40是实施方案39的工程化细胞,其中所述靶向受体是WT1 TCR。

[0426] 实施方案41是实施方案1-40中任一项的工程化细胞,其中所述工程化细胞是免疫细胞。

[0427] 实施方案42是实施方案41的工程化细胞,其中所述工程化细胞是单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、树突状细胞或颗粒细胞。

[0428] 实施方案43是实施方案41的工程化细胞,其中所述工程化细胞是淋巴细胞。

[0429] 实施方案44是实施方案43的工程化细胞,其中所述工程化细胞是T细胞。

[0430] 实施方案45是一种药物组合物,所述药物组合物包含实施方案1-44中任一项的工程化细胞。

[0431] 实施方案46是一种细胞群体,所述细胞群体包含实施方案1-44中任一项的工程化细胞。

[0432] 实施方案47是一种包含细胞群体的药物组合物,其中所述细胞群体包含实施方案1-44中任一项的工程化细胞。

[0433] 实施方案48是一种将前述实施方案中任一项的工程化细胞、细胞群体或药物组合物施用于有需要的受试者的方法。

[0434] 实施方案49是一种将前述实施方案中任一项的工程化细胞、细胞群体或药物组合物作为过继性细胞转移(ACT)疗法施用于受试者的方法。

[0435] 实施方案50是前述实施方案中任一项的工程化细胞、细胞群体或药物组合物,其用作ACT疗法。

[0436] 实施方案51是一种TIM3引导RNA,所述TIM3引导RNA与TIM3序列特异性杂交,所述TIM3序列包含选自以下的核苷酸序列:

[0437] a. 包含选自SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88的核苷酸序列的引导序列;

[0438] b. 包含选自SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88的序列的核苷酸序列的至少17、18、19或20个连续核苷酸的核苷酸序列的引导序列;

[0439] c. 包含与选自SEQ ID No:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88的核苷酸序列至少95%同一或至少90%同一的核苷酸序列的引导序列;

[0440] d. 包含选自SEQ ID NO:1-4、6-15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86和88的核苷酸序列的引导序列;

[0441] e. 包含选自SEQ ID No:1-5、7、8、12-15、23、26、32、56、59、63、66、75和87的核苷酸序列的引导序列;

[0442] f. 包含选自SEQ ID NO:2、4、15、23、56、59、63、75和87的核苷酸序列的引导序列;

[0443] g. 包含选自SEQ ID NO:1-4的核苷酸序列的引导序列;

- [0444] h. 包含选自SEQ ID NO:2、4和15的核苷酸序列的引导序列；
- [0445] i. 包含选自SEQ ID NO:2、4、15、63和87的核苷酸序列的引导序列；
- [0446] j. 包含选自SEQ ID NO:2和15的核苷酸序列的引导序列；
- [0447] k. 包含选自SEQ ID NO:63和87的核苷酸序列的引导序列；和
- [0448] l. 包含核苷酸序列SEQ ID NO:15的引导序列。
- [0449] 实施方案52是一种TIM3引导RNA,其包含的引导序列将经RNA引导的DNA结合剂引导至以下基因组坐标内的染色体位置,所述基因组坐标选自由SEQ ID NO:1-15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87和88所靶向的基因组坐标;任选地基因组坐标选自由SEQ ID NO:1-4、6-15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86和88所靶向的基因组坐标;任选地选自由SEQ ID NO:1-5、7、8、12-15、23、26、32、56、59、63、66、75和87所靶向的基因组坐标;任选地选自由SEQ ID NO:2、4、15、23、56、59、63、75和87所靶向的基因组坐标;任选地选自由SEQ ID NO:1-4所靶向的基因组坐标;任选地选自由SEQ ID NO:2、4和15所靶向的基因组坐标;任选地选自由SEQ ID NO:2、4、15、63和87所靶向的基因组坐标;任选地选自由SEQ ID NO:2和15所靶向的基因组坐标;任选地由SEQ ID NO:63和87所靶向的基因组坐标;或任选地由SEQ ID NO:15所靶向的基因组坐标。
- [0450] 实施方案53是实施方案51或52的引导RNA,其中所述引导RNA是双引导RNA(dgRNA)。
- [0451] 实施方案54是实施方案51或52的引导RNA,其中所述引导RNA是单引导RNA(sgRNA)。
- [0452] 实施方案55是实施方案54的引导RNA,所述引导RNA还包含所述引导序列的3'的核苷酸序列SEQ ID NO:400,其中所述引导RNA包含5'端修饰或3'端修饰。
- [0453] 实施方案56是实施方案54的引导RNA,所述引导RNA还包含5'端修饰或3'端修饰和gRNA的保守部分,所述保守部分包含以下中的一者或多者:
- [0454] A. 缩短的发夹1区或经取代且任选地缩短的发夹1区,其中
- [0455] 1. 以下核苷酸对中的至少一者在所述经取代且任选地缩短的发夹1中被Watson-Crick配对核苷酸取代:H1-1和H1-12、H1-2和H1-11、H1-3和H1-10、或H1-4和H1-9,并且所述发夹1区任选地缺乏
- [0456] a. H1-5至H1-8中的任一者或两者,
- [0457] b. 以下核苷酸对中的一者、两者或三者:H1-1和H1-12、H1-2和H1-11、H1-3和H1-10、和H1-4和H1-9,或
- [0458] c. 发夹1区的1-8个核苷酸;或
- [0459] 2. 所述缩短的发夹1区缺乏4-8个核苷酸,优选4-6个核苷酸;并且
- [0460] a. 位置H1-1、H1-2或H1-3中的一者或多者缺失或相对于SEQ ID NO:400被取代,或
- [0461] b. 位置H1-6至H1-10中的一者或多者相对于SEQ ID NO:400被取代;或
- [0462] 3. 所述缩短的发夹1区缺乏5-10个核苷酸,优选5-6个核苷酸,并且位置N18、H1-12或n中的一者或多者相对于SEQ ID NO:400被取代;或
- [0463] B. 缩短的上茎区,其中所述缩短的上茎区缺乏1-6个核苷酸并且其中所述缩短的上茎区的6、7、8、9、10或11个核苷酸相对于SEQ ID NO:400包括少于或等于4个取代;或
- [0464] C. 在LS6、LS7、US3、US10、B3、N7、N15、N17、H2-2和H2-14中的任一者或多者处相对

于SEQ ID NO:400的取代,其中取代基核苷酸既不是嘧啶后接腺嘌呤,也不是腺嘌呤前接嘧啶;或

[0465] D.上茎区,其中上茎修饰包含所述上茎区中US1-US12中的任一者或多者相对于SEQ ID NO:400的修饰。

[0466] 实施方案57是实施方案54的引导RNA,所述引导RNA还包含所述引导序列的3'的核苷酸序列GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO:200)。

[0467] 实施方案58是实施方案54的引导RNA,所述引导RNA还包含所述引导序列的3'的核苷酸序列GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA GUCGGUGC (SEQ ID NO:201),任选地所述引导序列的3'的GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO:202)。

[0468] 实施方案59是实施方案57或58的引导RNA,其中所述引导RNA根据mN*mN*mN*NNNN NNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 300)的模式进行修饰,其中“N”可以是任何天然或非天然核苷酸,m是2'-O-甲基修饰的核苷酸,并且*是核苷酸残基之间的硫代磷酸酯键联;并且其中N统称为任何前述实施方案的引导序列的核苷酸序列。

[0469] 实施方案60是实施方案59的引导RNA,其中每个N独立地是任何天然或非天然核苷酸并且所述引导序列将Cas9靶向所述TIM3基因。

[0470] 实施方案61是实施方案53-60中任一项的引导RNA,其中所述引导RNA包含修饰。

[0471] 实施方案62是实施方案61的引导RNA,其中所述修饰包含2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰核苷酸或2'-F修饰核苷酸。

[0472] 实施方案63是实施方案61或62的引导RNA,其中所述修饰包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键。

[0473] 实施方案64是实施方案61-63中任一项的引导RNA,其中所述引导RNA是sgRNA并且所述修饰包括在所述引导RNA的5'端的五个核苷酸中的一者或多者处的修饰。

[0474] 实施方案65是实施方案61-64中任一项的引导RNA,其中所述引导RNA是sgRNA并且所述修饰包括在所述引导RNA的3'端的五个核苷酸中的一者或多者处的修饰。

[0475] 实施方案66是实施方案61-65中任一项的引导RNA,其中所述引导RNA是sgRNA并且所述修饰包括在所述引导RNA的5'端的四个核苷酸各自之间的PS键。

[0476] 实施方案67是实施方案61-66中任一项的引导RNA,其中所述引导RNA是sgRNA并且所述修饰包括所述引导RNA的3'端的四个核苷酸各自之间的PS键。

[0477] 实施方案68是实施方案61-67中任一项的引导RNA,其中所述引导RNA是sgRNA并且所述修饰包括在所述引导RNA的5'端的前三个核苷酸中的每一者处的2'-O-Me修饰核苷酸。

[0478] 实施方案69是实施方案61-68中任一项的引导RNA,其中所述引导RNA是sgRNA并且所述修饰包括在所述引导RNA的3'端的后三个核苷酸中的每一者处的2'-O-Me修饰核苷酸。

[0479] 实施方案70是一种组合物,所述组合物包含实施方案53-69中任一项的引导RNA和经RNA引导的DNA结合剂,其中所述经RNA引导的DNA结合剂是多肽RNA引导的DNA结合剂或编码经RNA引导的DNA结合剂多肽的核酸,任选地所述经RNA引导的DNA结合剂是Cas9核酸酶。

[0480] 实施方案71是实施方案70的组合物,其中所述经RNA引导的DNA结合剂是能够在

DNA序列内进行修饰的多肽。

[0481] 实施方案72是实施方案71的组合物,其中所述经RNA引导的DNA结合剂是化脓性葡萄球菌Cas9核酸酶。

[0482] 实施方案73是实施方案70-72中任一项的组合物,其中所述核酸酶选自裂解酶、切口酶和死核酸酶的组。

[0483] 实施方案74是实施方案70的组合物,其中所述编码经RNA引导的DNA结合剂的核酸选自:

[0484] a. DNA编码序列;

[0485] b. 具有开放阅读框(ORF)的mRNA;

[0486] c. 表达载体中的编码序列;

[0487] d. 病毒载体中的编码序列。

[0488] 实施方案75是实施方案70-74中任一项的组合物,所述组合物还包含与选自以下的基因组坐标特异性杂交的引导RNA:

[0489]

TRAC NO:	基因组坐标(hg38)
TRAC-90	chr14:22547524-22547544
TRAC-91	chr14:22550581-22550601
TRAC-92	chr14:22550608-22550628
TRAC-93	chr14:22550611-22550631
TRAC-94	chr14:22550622-22550642
TRAC-95	chr14:22547529-22547549
TRAC-96	chr14:22547512-22547532
TRAC-97	chr14:22547525-22547545
TRAC-98	chr14:22547536-22547556
TRAC-99	chr14:22547575-22547595
TRAC-100	chr14:22547640-22547660

[0490]

TRAC NO:	基因组坐标(hg38)
TRAC-101	chr14:22547647-22547667
TRAC-102	chr14:22547777-22547797
TRAC-103	chr14:22549638-22549658
TRAC-104	chr14:22549646-22549666
TRAC-105	chr14:22550600-22550620
TRAC-106	chr14:22550605-22550625
TRAC-107	chr14:22550625-22550645
TRAC-108	chr14:22539116-22539136
TRAC-109	chr14:22539120-22539140
TRAC-110	chr14:22547518-22547538
TRAC-111	chr14:22539082-22539102
TRAC-112	chr14:22539061-22539081
TRAC-113	chr14:22539097-22539117
TRAC-114	chr14:22547697-22547717
TRAC-115	chr14:22550571-22550591
TRAC-116	chr14:22550631-22550651
TRAC-117	chr14:22550658-22550678
TRAC-118	chr14:22547712-22547732
TRAC-119	chr14:22550636-22550656
TRAC-120	chr14:22550636-22550656
TRAC-121	chr14:22550582-22550602
TRAC-122	chr14:22550606-22550626
TRAC-123	chr14:22550609-22550629
TRAC-124	chr14:22547691-22547711
TRAC-125	chr14:22547576-22547596
TRAC-126	chr14:22549648-22549668
TRAC-127	chr14:22549660-22549680
TRAC-128	chr14:22547716-22547736
TRAC-129	chr14:22547514-22547534
TRAC-130	chr14:22550662-22550682
TRAC-131	chr14:22550593-22550613
TRAC-132	chr14:22550612-22550632
TRAC-133	chr14:22547521-22547541
TRAC-134	chr14:22547540-22547560
TRAC-135	chr14:22539121-22539141
TRAC-136	chr14:22547632-22547652
TRAC-137	chr14:22547674-22547694
TRAC-138	chr14:22549643-22549663
TRAC-139	chr14:22547655-22547675
TRAC-140	chr14:22547667-22547687

[0491]

TRAC NO:	基因组坐标(hg38)
TRAC-141	chr14:22539085-22539105
TRAC-142	chr14:22549634-22549654
TRAC-143	chr14:22539064-22539084
TRAC-144	chr14:22547639-22547659
TRAC-145	chr14:22547731-22547751
TRAC-146	chr14:22547734-22547754
TRAC-147	chr14:22547591-22547611
TRAC-148	chr14:22547657-22547677
TRAC-149	chr14:22547519-22547539
TRAC-150	chr14:22549674-22549694
TRAC-151	chr14:22547678-22547698
TRAC-152	chr14:22539087-22539107
TRAC-153	chr14:22547595-22547615
TRAC-154	chr14:22547633-22547653
TRAC-155	chr14:22547732-22547752
TRAC-156	chr14:22547656-22547676
TRAC-157	chr14:22539086-22539106
TRAC-158	chr14:22547491-22547511
TRAC-159	chr14:22547618-22547638
TRAC-160	chr14:22549644-22549664
TRAC-161	chr14:22547522-22547542
TRAC-162	chr14:22539089-22539109
TRAC-163	chr14:22539062-22539082
TRAC-164	chr14:22547597-22547617
TRAC-165	chr14:22547677-22547697
TRAC-166	chr14:22549645-22549665
TRAC-167	chr14:22550610-22550630
TRAC-168	chr14:22547511-22547531
TRAC-169	chr14:22550607-22550627
TRAC-170	chr14:22550657-22550677
TRAC-171	chr14:22550604-22550624
TRAC-172	chr14:22539132-22539152
TRAC-173	chr14:22550632-22550652
TRAC-174	chr14:22547571-22547591
TRAC-175	chr14:22547711-22547731
TRAC-176	chr14:22547666-22547686
TRAC-177	chr14:22547567-22547587
TRAC-178	chr14:22547624-22547644
TRAC-185	chr14:22547501-22547521
TRAC-213	chr14:22547519-22547539

[0492]

TRAC NO:	基因组坐标(hg38)
TRAC-214	chr14:22547556-22547576
TRAC-215	chr14:22547486-22547506
TRAC-216	chr14:22547487-22547507
TRAC-217	chr14:22547493-22547513
TRAC-218	chr14:22547502-22547522

[0493] 任选地所述基因修饰在选自chr14:22547524-22547544、chr14:22547529-22547549、chr14:22547525-22547545、chr14:22547536-22547556、chr14:22547501-22547521、chr14:22547556-22547576和chr14:22547502-22547522的基因组坐标内。

[0494] 实施方案76是实施方案70-75中任一项的组合物,所述组合物还包含与选自以下的基因组坐标特异性杂交的引导RNA:

[0495]

TRBC NO:	基因组坐标(hg38)
TRBC-1	chr7:142791996-142792016
TRBC-2	chr7:142792047-142792067
TRBC-3	chr7:142792008-142792028
TRBC-4	chr7:142791931-142791951
TRBC-5	chr7:142791930-142791950
TRBC-6	chr7:142791748-142791768
TRBC-7	chr7:142791720-142791740
TRBC-8	chr7:142792041-142792061
TRBC-9	chr7:142802114-142802134
TRBC-10	chr7:142792009-142792029
TRBC-11	chr7:142792697-142792717
TRBC-12	chr7:142791963-142791983
TRBC-13	chr7:142791976-142791996
TRBC-14	chr7:142791974-142791994
TRBC-15	chr7:142791970-142791990
TRBC-16	chr7:142791948-142791968
TRBC-17	chr7:142791913-142791933
TRBC-18	chr7:142791961-142791981
TRBC-19	chr7:142792068-142792088
TRBC-20	chr7:142791975-142791995
TRBC-21	chr7:142791773-142791793
TRBC-22	chr7:142791919-142791939
TRBC-23	chr7:142791834-142791854

[0496]

TRBC NO:	基因组坐标(hg38)
TRBC-24	chr7:142791878-142791898
TRBC-25	chr7:142802141-142802161
TRBC-26	chr7:142791844-142791864
TRBC-27	chr7:142801154-142801174
TRBC-28	chr7:142791961-142791981
TRBC-29	chr7:142792001-142792021
TRBC-30	chr7:142791979-142791999
TRBC-31	chr7:142792041-142792061
TRBC-32	chr7:142792003-142792023
TRBC-33	chr7:142791984-142792004
TRBC-34	chr7:142792002-142792022
TRBC-35	chr7:142791966-142791986
TRBC-36	chr7:142792007-142792027
TRBC-37	chr7:142791993-142792013
TRBC-38	chr7:142791902-142791922
TRBC-39	chr7:142791724-142791744
TRBC-40	chr7:142791973-142791993
TRBC-41	chr7:142791920-142791940
TRBC-42	chr7:142791994-142792014
TRBC-43	chr7:142791887-142791907
TRBC-44	chr7:142791907-142791927
TRBC-45	chr7:142791952-142791972
TRBC-46	chr7:142791721-142791741
TRBC-47	chr7:142792718-142792738
TRBC-48	chr7:142791729-142791749
TRBC-49	chr7:142791911-142791931
TRBC-50	chr7:142791867-142791887
TRBC-51	chr7:142791899-142791919
TRBC-52	chr7:142791727-142791747
TRBC-53	chr7:142791949-142791969
TRBC-54	chr7:142791933-142791953
TRBC-55	chr7:142791932-142791952
TRBC-56	chr7:142792057-142792077
TRBC-57	chr7:142791940-142791960
TRBC-58	chr7:142791747-142791767
TRBC-59	chr7:142791881-142791901
TRBC-60	chr7:142791779-142791799
TRBC-61	chr7:142792054-142792074
TRBC-62	chr7:142792069-142792089
TRBC-63	chr7:142792712-142792732

[0497]

TRBC NO:	基因组坐标(hg38)
TRBC-64	chr7:142791729-142791749
TRBC-65	chr7:142791821-142791841
TRBC-66	chr7:142792052-142792072
TRBC-67	chr7:142791916-142791936
TRBC-68	chr7:142791899-142791919
TRBC-69	chr7:142791772-142791792
TRBC-70	chr7:142792714-142792734
TRBC-71	chr7:142792042-142792062
TRBC-72	chr7:142791962-142791982
TRBC-73	chr7:142791988-142792008
TRBC-74	chr7:142791982-142792002
TRBC-75	chr7:142792049-142792069
TRBC-76	chr7:142791839-142791859
TRBC-77	chr7:142791893-142791913
TRBC-78	chr7:142791945-142791965
TRBC-79	chr7:142791964-142791984
TRBC-80	chr7:142791757-142791777
TRBC-81	chr7:142792048-142792068
TRBC-82	chr7:142791774-142791794
TRBC-83	chr7:142792048-142792068
TRBC-84	chr7:142791830-142791850
TRBC-85	chr7:142791909-142791929
TRBC-86	chr7:142791912-142791932
TRBC-87	chr7:142791766-142791786
TRBC-88	chr7:142791880-142791900
TRBC-89	chr7:142791919-142791939

[0498] 实施方案77是实施方案70-76中任一项的组合物,所述组合物还包含与选自以下的基因组坐标特异性杂交的引导RNA:chr:16:10902171-10923242,任选地chr16:10902662-chr16:10923285.chr16:10906542-chr16:10923285或chr16:10906542-chr16:10908121,任选地chr16:10908132-10908152、chr16:10908131-10908151、chr16:10916456-10916476、chr16:10918504-10918524、chr16:10909022-10909042、chr16:10918512-10918532、chr16:10918511-10918531、chr16:10895742-10895762、chr16:10916362-10916382、chr16:10916455-10916475、chr16:10909172-10909192、chr16:10906492-10906512、chr16:10909006-10909026、chr16:10922478-10922498、chr16:10895747-10895767、chr16:10916348-10916368、chr16:10910186-10910206、chr16:10906481-10906501、chr16:10909007-10909027、chr16:10895410-10895430和chr16:10908130-10908150;任选地chr16:10918504-10918524、chr16:10923218-10923238、chr16:10923219-10923239、chr16:10923221-10923241、chr16:10906486-10906506、chr16:10906485-10906505、chr16:10903873-10903893、chr16:10909172-10909192、chr16:10918423-10918443、chr16:10916362-10916382、chr16:10916450-10916470、chr16:10922153-10922173、chr16:10923222-10923242、chr16:10910176-10910196、chr16:10895742-10895762、chr16:10916449-10916469、chr16:10923214-10923234、

chr16:10906492-10906512和chr16:10906487-1090650;或任选地chr16:10916432-10916452、chr16:10922444-10922464、chr16:10907924-10907944、chr16:10906985-10907005、chr16:10908073-10908093、chr16:10907433-10907453、chr16:10907979-10907999、chr16:10907139-10907159、chr16:10922435-10922455、chr16:10907384-10907404、chr16:10907434-10907454、chr16:10907119-10907139、chr16:10907539-10907559、chr16:10907810-10907830、chr16:10907315-10907335、chr16:10916426-10916446、chr16:10909138-10909158、chr16:10908101-10908121、chr16:10907790-10907810、chr16:10907787-10907807、chr16:10907454-10907474、chr16:10895702-10895722、chr16:10902729-10902749、chr16:10918492-10918512、chr16:10907932-10907952、chr16:10907623-10907643、chr16:10907461-10907481、chr16:10902723-10902743、chr16:10907622-10907642、chr16:10922441-10922461、chr16:10902662-10902682、chr16:10915626-10915646、chr16:10915592-10915612、chr16:10907385-10907405、chr16:10907030-10907050、chr16:10907935-10907955、chr16:10906853-10906873、chr16:10906757-10906777、chr16:10907730-10907750和chr16:10895302-10895322。

[0499] 实施方案78是实施方案70-77中任一项的组合物,所述组合物还包含与选自以下的基因组坐标特异性杂交的引导RNA:chr6:29942854-29942913和chr6:29943518-29943619,任选地选自以下的基因组坐标:chr6:29942864-29942884;chr6:29942868-29942888;chr6:29942876-29942896;chr6:29942877-29942897;chr6:29942883-29942903;chr6:29943126-29943146;chr6:29943528-29943548;chr6:29943529-29943549;chr6:29943530-29943550;chr6:29943537-29943557;chr6:29943549-29943569;chr6:29943589-29943609;和chr6:29944026-29944046。

[0500] 实施方案79是实施方案51-69中任一项的引导RNA或实施方案70-78中任一项的组合物,其中所述组合物还包含药学上可接受的赋形剂。

[0501] 实施方案80是实施方案79的引导物或组合物,其中所述组合物为非热原的。

[0502] 实施方案81是实施方案51-69中任一项的引导RNA或实施方案70-80中任一项的组合物,其中所述引导RNA与脂质纳米粒子(LNP)相缔合。

[0503] 实施方案82是在细胞内对TIM3序列进行基因修饰的方法,所述方法包括使所述细胞与实施方案51-81中任一项的引导RNA或组合物接触。

[0504] 实施方案83是实施方案82的方法,所述方法还包括对TCR序列进行基因修饰以抑制TCR基因的表达。

[0505] 实施方案84是一种制备用于免疫疗法的细胞群体的方法,所述方法包括:

[0506] a. 用实施方案51-81中任一项的TIM3引导RNA或组合物对所述群体细胞中的TIM3序列进行基因修饰;

[0507] b. 对所述群体细胞中的TCR序列进行基因修饰,以减少所述群体细胞的表面上TCR蛋白的表达;

[0508] c. 扩增培养中的所述细胞群体。

[0509] 实施方案85是实施方案84的方法,其中所述细胞表面上的所述TCR蛋白的表达降至低于所述群体中至少40%、45%、50%、55%、60%、65%,优选至少70%、75%、80%、

85%、90%或95%的细胞中的检测水平。

[0510] 实施方案86是实施方案84或85的方法,其中对所述群体细胞中TCR序列的基因修饰包括对两个或更多个TCR序列的修饰。

[0511] 实施方案87是实施方案86的方法,其中所述两个或更多个TCR序列包含TRAC和TRBC。

[0512] 实施方案88是实施方案84-87中任一项的方法,所述方法包括插入编码在所述工程化细胞表面表达的靶向受体(例如TCR或CAR)的外源核酸,任选地在TRAC基因座处。

[0513] 实施方案89是实施方案84-88中任一项的方法,所述方法还包括使所述细胞与包含所述TIM3引导RNA的LNP组合物接触。

[0514] 实施方案90是实施方案89的方法,所述方法包括使所述细胞与包含引导RNA的第二LNP组合物接触。

[0515] 实施方案91是一种通过实施方案82-90中任一项的方法制备的细胞群体。

[0516] 实施方案92是实施方案91的细胞群体,其中所述细胞群体是离体改变的。

[0517] 实施方案93是一种药物组合物,所述药物组合物包含实施方案91或92的细胞群体。

[0518] 实施方案94是一种将实施方案91或92的细胞群体或实施方案93的药物组合物施用于有需要的受试者的方法。

[0519] 实施方案95是一种将实施方案91或92的细胞群体或实施方案93的药物组合物作为过继性细胞转移(ACT)疗法施用于受试者的方法。

[0520] 实施方案96是实施方案91或92的细胞群体或实施方案91的药物组合物,其用作ACT疗法。

[0521] 实施方案97是包含TIM3基因的基因修饰的细胞群体,其中所述群体中至少40%、45%、50%、55%、60%、65%,优选至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。

[0522] 实施方案98是实施方案97的细胞群体,其中所述基因修饰如实施方案1-4中任一项所定义。

[0523] 实施方案99是实施方案97或98的细胞群体,其中TIM3的表达与例如其中所述TIM3基因未经修饰的合适对照相比降低至少40%、45%、50%、55%、60%、65%,优选至少70%、75%、80%、85%、90%、95%,或降至低于测定法的检测限。

[0524] 实施方案100是实施方案97-99中任一项的细胞群体,所述细胞群体包含TCR基因的基因修饰,其中至少40%、45%、50%、55%、60%、65%,优选至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的细胞包含选自内源TCR基因序列中的插入、缺失和取代的修饰。

[0525] 实施方案101是实施方案100的细胞群体,其中所述基因修饰如实施方案5-8中任一项所定义。

[0526] 实施方案102是实施方案100或101的细胞群体,其中TCR的表达与例如其中所述TCR基因未经修饰的合适对照相比降低至少40%、45%、50%、55%、60%、65%,优选至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%,或降至低于测定法的检测限。

[0527] 实施方案103是实施方案97-102中任一项的细胞群体,其中所述群体包括至少

10^3 、 10^4 、 10^5 或 10^6 个细胞,优选 10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 或 10^8 个细胞。

[0528] 实施方案104是实施方案97-103中任一项的细胞群体,其中所述群体中至少70%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。

[0529] 实施方案105是实施方案97-104中任一项的细胞群体,其中所述群体中至少80%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。

[0530] 实施方案106是实施方案97-105中任一项的细胞群体,其中所述群体中至少90%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。

[0531] 实施方案107是实施方案97-106中任一项的细胞群体,其中所述群体中至少95%的细胞包含选自内源TIM3序列中的插入、缺失和取代的修饰。

[0532] 实施方案108是实施方案97-107中任一项的细胞群体,其中TIM3的表达与其中TIM3基因未经修饰的合适对照相比降低至少70%,或降至低于测定法的检测限。

[0533] 实施方案109是实施方案97-108中任一项的细胞群体,其中TIM3的表达与其中TIM3基因未经修饰的合适对照相比降低至少80%,或降至低于测定法的检测限。

[0534] 实施方案110是实施方案97-109中任一项的细胞群体,其中TIM3的表达与其中TIM3基因未经修饰的合适对照相比降低至少90%,或降至低于测定法的检测限。

[0535] 实施方案111是实施方案97-110中任一项的细胞群体,其中TIM3的表达与其中TIM3基因未经修饰的合适对照相比降低至少95%,或降至低于测定法的检测限。

[0536] 实施方案112是一种药物组合物,所述药物组合物包含实施方案97-111中任一项的细胞群体。

[0537] 实施方案113是实施方案97-111中任一项的细胞群体或实施方案112的药物组合物,其用作ACT疗法。

[0538] 实施方案114是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106867-157106887的基因组坐标内。

[0539] 实施方案115是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:1571066862-1571066882的基因组坐标内。

[0540] 实施方案116是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106803-157106823的基因组坐标内。

[0541] 实施方案117是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106850-157106870的基因组坐标内。

[0542] 实施方案118是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157104726-157104746的基因组坐标内。

[0543] 实施方案119是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106668-157106688的基因组坐标内。

[0544] 实施方案120是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157104681-157104701的基因组坐标内。

[0545] 实施方案121是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157104681-157104701的基因组坐标内。

[0546] 实施方案122是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157104680-157104700的基因组坐标内。

[0547] 实施方案123是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106676-157106696的基因组坐标内。

[0548] 实施方案124是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157087271-157087291的基因组坐标内。

[0549] 实施方案125是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157095432-157095452的基因组坐标内。

[0550] 实施方案126是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157095361-157095381的基因组坐标内。

[0551] 实施方案127是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157095360-157095380的基因组坐标内。

[0552] 实施方案128是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157108945-157108965的基因组坐标内。

[0553] 实施方案129是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106751-157106771的基因组坐标内。

[0554] 实施方案130是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157095419-157095439的基因组坐标内。

[0555] 实施方案131是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157104679-157104699的基因组坐标内。

[0556] 实施方案132是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106824-157106844的基因组坐标内。

[0557] 实施方案133是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157087117-157087137的基因组坐标内。

[0558] 实施方案134是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157095379-157095399的基因组坐标内。

[0559] 实施方案135是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106864-157106884的基因组坐标内。

[0560] 实施方案136是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157095405-157095425的基因组坐标内。

[0561] 实施方案137是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157095404-157095424的基因组坐标内。

[0562] 实施方案138是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106888-157106908的基因组坐标内。

[0563] 实施方案139是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106889-157106909的基因组坐标内。

[0564] 实施方案140是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106935-157106955的基因组坐标内。

[0565] 实施方案141是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106641-157106661的基因组坐标内。

[0566] 实施方案142是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106641-157106661的基因组坐标内。

物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157087084-157087104的基因组坐标内。

[0567] 实施方案143是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157104663-157104683的基因组坐标内。

[0568] 实施方案144是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106875-157106895的基因组坐标内。

[0569] 实施方案145是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157087184-157087204的基因组坐标内。

[0570] 实施方案146是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157106936-157106956的基因组坐标内。

[0571] 实施方案147是前述实施方案中任一项的工程化细胞、引导RNA、组合物、药物组合物或方法,其中所述基因修饰在chr5:157104696-157104716的基因组坐标内。

[0572] 实施方案148是实施方案25的工程化细胞,其中所述基因修饰包括以下内的至少一个核苷酸的修饰:选自以下的基因组坐标:

[0573]	PD1 NO.	基因组坐标(hg38)
	PD1-29	chr2:241852703-241852723
	PD1-43	chr2:241858807-241858827
	PD1-5	chr2:241858789-241858809
	PD1-6	chr2:241858788-241858808
	PD1-8	chr2:241858755-241858775
	PD1-11	chr2:241852919-241852939
	PD1-12	chr2:241852915-241852935
	PD1-22	chr2:241852755-241852775
	PD1-23	chr2:241852751-241852771
	PD1-24	chr2:241852750-241852770
	PD1-36	chr2:241852264-241852284
	PD1-57	chr2:241852201-241852221
	PD1-58	chr2:241852749-241852769
	PD1-17	chr2:241852821-241852841
	PD1-38	chr2:241852265-241852285
	PD1-56	chr2:241851221-241851241
	PD1-41	chr2:241852188-241852208

[0574] 或

[0575] 分别选自以下的基因组坐标:chr2:241852919-241852939、chr2:241852915-241852935、chr2:241852750-241852770、chr2:241852264-241852284、chr2:241852265-241852285、chr2:241858807-241858827、chr2:241852201-241852221、chr2:241858789-241858809、chr2:241858788-241858808、chr2:241858755-241858775、chr2:241852755-241852775、chr2:241852751-241852771和chr2:241852703-241852723;或

[0576] 分别选自以下的基因组坐标:chr2:241858788-241858808、chr2:241858755-241858775、chr2:241852919-241852939、chr2:241852915-241852935、chr2:241852751-

241852771、chr2:241858807-241858827和chr2:241852703-241852723;或

[0577] 分别选自以下的基因组坐标:chr2:241858789-241858809、chr2:241852919-241852939、chr2:241852915-241852935、chr2:241852755-241852775、chr2:241852751-241852771和chr2:241858807-241858827;或

[0578] 分别选自以下的基因组坐标:chr2:241858788-241858808、chr2:241858755-241858775、chr2:241852751-241852771和chr2:241852703-241852723;或

[0579] 分别选自以下的基因组坐标:chr2:241858788-241858808和chr2:241852703-241852723;或

[0580] 分别选自以下的基因组坐标:chr2:241858788-241858808、chr2:241852751-241852771、chr2:241852703-241852723、chr2:241852188-241852208和chr2:241852201-241852221;或

[0581] 分别选自以下的基因组坐标:chr2:241858788-241858808、chr2:241852703-241852723和chr2:241852201-241852221;或chr2:241858807-241858827的基因组坐标。

[0582] 表14. 额外序列

[0583]

描述	SEQ ID NO:	序列
CR003187	210	GACCCCCUCCACCCCGCCUCGUUUUA GAGCUAUGCUGUUUUG
CR000961	211	AGAGUCUCUCAGCUGGUACAGUUUUA GAGCUAUGCUGUUUUG
G016239	212	mG*mG*mC*CUCGGCGCUGACGAUCU GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU
G013006	213	mC*mU*mC*UCAGCUGGUACACGGCA GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU
G000294	214	GACCCCCUCCACCCCGCCUCGUUUUA GAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
G000739	215	mG*mA*mU*CACGUCGGCCGUUGGCG GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU
G018438	216	mA*mG*mU*UGGGCAGAUAACACUUG GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU

[0584]

G018434	217	mG*mC*mG*GUCCCUGAGGUGCACCG GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU
G021215	218	mC*mU*mG*AACUUUUCAGAUUAUAC GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU
G021216	219	mU*mG*mA*CCAUGUGGUUAGCAUCU GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU
引导支架	200	GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
引导支架	201	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
引导支架	202	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU
引导支架	300	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNN GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU
引导支架	400	GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGC
引导支架 81	401	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA

[0585]

		CGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC
引导支架 181	402	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAA AGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
引导支架 94	403	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGGCACCGAGUCGGUGC
引导支架 194	404	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
引导支架 95	405	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGGCACCGAGUCGGUGC
引导支架 195	406	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
引导支架 871	407	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC
引导支架 971	408	mN*mN*mN*(N)17mGUUUfUAGmAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAm AGUfUmAfAmAfAmUAmAmGmGmCmU mAGUmCmCGUfUAmUmCmCmGmAm AmAmGmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmG*mU*mG*mC
引导支架 872	409	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC
引导支架 972	410	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAA AGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
tracrRNA	411	AACAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU
重组 Cas9-NLS 氨基酸序 列	800	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSG ETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFHRL EESFLVEEDKK

[0586]

HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRK
KLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHF
LIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENL
IAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKS
NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQ
IGDQYADLFLAAKNLSDAILLSILRVNT
EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
VRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGG
ASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNR
EDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILR
RQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVG
PLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEV
VDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLP
KHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRK
PAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQL
KEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGT
YHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLT
LTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMK
QLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGK
TILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKE
DIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIK
KGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIE
MARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIK
ELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ
NGRDMYVDQELDINRLSDYDVHDHVPQ
SFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPS
EEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN
LTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT
KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVRINNYHHA
HDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYG
DYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFF
YSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGE
TGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNI
KKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKK
DWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEK
GKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPID
FLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEFENG
RKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHK
HYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVLS
AYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAP

[0587]

		AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIH QSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKR KV
编码 Sp. Cas9 的 ORF	801	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACT GGACATCGGAACAAACAGCGTCGGAT GGGCAGTCATCACAGACGAATACAAG GTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTG GGAAACACAGACAGACACAGCATCAA GAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTT CGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAA CAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGA AGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAT CTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAA CGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCT TCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAA AGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTC GACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTA CCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGA AGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTG GCACACATGATCAAGTTCAGAGGACA CTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGT TCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACC AGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAAC GCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAAT CCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCA GAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAG CTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACT GTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCT GGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCA ACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAG CTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGA CGACGACCTGGACAACCTGCTGGCAC AGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTG TTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGA CGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAG AGTCAACACAGAAATCACAAAGGCAC CGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGA TACGACGAACACCACCAGGACCTGAC ACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGC AGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATC

[0588]

TTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATAC
GCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAG
CCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAA
GCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAAC
AGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAG
AACATTTCGACAACGGAAGCATCCCCG
ACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCAC
GCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTT
CTACCCGTTCTGAAGGACAACAGAG
AAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTC
AGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTG
GCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATG
GATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAA
TCACACCGTGGAAGTTTGAAGAAGTCG
TCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGC
TTCATCGAAAGAATGACAACTTCGAC
AAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCT
GCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAAT
ACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAA
AGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATG
AGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGA
ACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGC
TGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACA
GTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTT
CAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCG
TCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGA
TTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCAC
GACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAA
GGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACG
AAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGA
CACTGACACTGTTTGAAGACAGAGAA
ATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCAT
GAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACA
CAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAG
CTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCA
GAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCT
GAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAA
ACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACA
GCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAG
AAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGA
CAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCT

[0589]

GGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGG
GAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCG
ACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGA
CACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGA
AATGGCAAGAGAAAACCAGACAACAC
AGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGA
AAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAA
TCAAGGAAGTGGGAAGCCAGATCCTG
AAGGAACACCCGGTCGAAAACACACA
GCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGT
ACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATG
TACGTCGACCAGGAAGTGGACATCAA
CAGACTGAGCGACTACGACGTCGACC
ACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGG
ACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTG
ACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAA
GAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAG
TCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGG
AGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGAT
CACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGA
CAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGC
GAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAA
GAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGA
TCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGG
ACAGCAGAATGAACACAAAGTACGAC
GAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGT
CAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGC
TGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCC
AGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAAC
AACTACCACCACGCACACGACGCATA
CCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACT
GATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAA
GCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAG
GTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGC
AAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGG
CAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCA
ACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAA
TCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGA
AAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGG
AGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACA
AGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGA
AAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAA
CATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGA

[0590]

		CAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATC CTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCT GATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACC CGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGC CCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTC GTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAG CAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGA AGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGA CTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGG AAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAG CTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTG GAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGC AAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAA ACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTAC GTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCAC TACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGA AGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCG TCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGAC GAAATCATCGAACAGATCAGCGAATT CAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG CAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCA TACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAT CAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCC ACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAG CACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACA CAACAATCGACAGAAAGAGATACACA AGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAAC ACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACT GTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCC AGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC CCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG
编码 Sp. Cas9 的 ORF	802	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTG GACATCGGCACCAACTCCGTGGGCTGG GCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGT GCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGG CAACACCGACCGGCACTCCATCAAGA AGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCG ACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACC CGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCG GTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCT GCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACG AGATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCT

[0591]

TCCACCGGCTGGAGGAGTCCTTCCTGG
TGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGG
CACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGAC
GAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCC
CACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCT
GGTGGACTCCACCGACAAGGCCGACC
TGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCC
ACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCC
TGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGAC
AACTCCGACGTGGACAAGCTGTTCATC
CAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTG
TTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCC
GGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCC
GCCCCGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTG
GAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGC
GAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAA
CCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCCTGAC
CCCCAACTTCAAGTCCAACCTTCGACCT
GGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGT
CCAAGGACACCTACGACGACGACCTG
GACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCCGA
CCAGTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGC
CAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCT
GTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGA
GATACCAAGGCCCCCCTGTCCGCCTC
CATGATCAAGCGGTACGACGAGCACC
ACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCC
TGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAG
TACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCC
AAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGA
CGGCGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTCTA
CAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAA
GATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGG
TGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTG
CGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGG
CTCCATCCCCCACCAGATCCACCTGGG
CGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCA
GGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGA
CAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCC
TGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGG
GCCCCCTGGCCCGGGGCAACTCCCGGT
TCGCCTGGATGACCCGGAAGTCCGAG
GAGACCATCACCCCCTGGAACCTTCGAG

[0592]

GAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGC
CCAGTCCTTCATCGAGCGGATGACCAA
CTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGT
ACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGC
TGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGTCC
GGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGA
CCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACT
ACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACT
CCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGAC
CGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACCTAC
CACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGA
CAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGA
ACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTG
CTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGG
GAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGAC
CTACGCCCACCTGTTCGACGACAAGGT
GATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGT
ACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGG
AAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAA
GCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTT
CCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCG
GAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGA
CTCCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCA
GAAGGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCG
ACTCCCTGCACGAGCACATCGCCAACC
TGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAGG
GCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTG
GACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCG
GCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCG
AGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACC
CAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCGGGA
GCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCA
TCAAGGAGCTGGGCTCCCAGATCCTGA
AGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAG
CTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTAC
TACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTA
CGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACC
GGCTGTCCGACTACGACGTGGACCACA
TCGTGCCCCAGTCCTTCCTGAAGGACG
ACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCC

[0593]

GGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTCC
GACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGT
GAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGC
AGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCC
AGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAG
GCCGAGCGGGGCGGCCTGTCCGAGCT
GGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGC
AGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACC
AAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACTCC
CGGATGAACACCAAGTACGACGAGAA
CGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGG
TGATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGT
CCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCT
ACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTAC
CACCACGCCCACGACGCCTACCTGAAC
GCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAG
AAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTC
GTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGA
CGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCG
AGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCC
AAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATG
AACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTG
GCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCC
CCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCG
GCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGG
GACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTG
TCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAG
AAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTT
CTCCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCG
GAACTCCGACAAGCTGATCGCCCGGA
AGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTAC
GGCGGCTTCGACTCCCCCACCCTGGCC
TACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTG
GAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAA
GTCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCAC
CATCATGGAGCGGTCCTCCTTCGAGAA
GAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAA
GGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACC
TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCC
TGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAG
CGGATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTG
CAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCC
CTCCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCT

[0594]

		GGCCTCCCACTACGAGAAGCTGAAGG GCTCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAG CAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCA CTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGAT CTCCGAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCT GGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGC TGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGAC AAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAA CATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAA CCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTA CTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCG GTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGG ACGCCACCCTGATCCACCAGTCCATCA CCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACC TGTCCCAGCTGGGCGGGCGACGGCGGC GGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGT GTGA
具有 Hibit 标签的 Cas9 的开 放阅读框	803	AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCU GGACAUCGGCACCAACUCCGUGGGCU GGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAG GUGCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCU GGGCAACACCGACCGGCACUCCAUCA AGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUG UUCGACUCCGGCGAGACCGCCGAGGC CACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGC GGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGG AUCUGCUACCUGCAGGAGAUUCUUCUC CAACGAGAUUGGCAAGGUGGACGACU CCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCC UUCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCA CGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACA UCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAG AAGUACCCACCAUCUACCACCUGCG GAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACA AGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUG GCCUGGCCCACAUGAUCUAGUUCG GGGCCACUUCUGAUCGAGGGCGACC UGAACCCCGACAACUCCGACGUGGAC AAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAGAC CUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACC CCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCC AAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUC CAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUGA

[0595]

UCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAG
AACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGC
CCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACU
UCAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAG
GACGCCAAGCUGCAGCUGUCCAAGGA
CACCUACGACGACGACCUGGACAACC
UGCUGGCCCAGAUCCGGCGACCAGUAC
GCCGACCUGUUCUGGCCGCCAAGAA
CCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCG
ACAUCCUGCGGGUGAACACCGAGAUC
ACCAAGGCCCCCUGUCCGCCUCCAU
GAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACC
AGGACCUGACCCUGCUGAAGGCCUG
GUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUA
CAAGGAGAUUCUUCUUCGACCAGUCCA
AGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGAC
GGCGGCGCCUCCCAGGAGGAGUUCUA
CAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGA
AGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUG
GUGAAGCUGAACCAGGAGGACCUGCU
GCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACG
GCUCCAUCCCCACCAGAUCCACCUG
GGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCG
GCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGA
AGGACAACCAGGAGAGAAGAUCCGAGAAG
AUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUA
CGUGGGCCCCCUGGCCCGGGGCAACU
CCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAG
UCCGAGGAGACCAUCACCCCUUGGAA
CUUCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCG
CCUCCGCCCAGUCCUUCAUCGAGCGG
AUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCC
CAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACU
CCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUG
UACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUA
CGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCG
CCUUCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAG
GCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGAC
CAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCAGC
UGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGAUC
GAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUC
CGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCU
CCCUGGGCACCACACGACCUGCUG

[0596]

AAGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCU
GGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCC
UGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACC
CUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGA
GGAGCGGCUGAAGACCUACGCCCACC
UGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAG
CUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUG
GGGCCGCGCUGUCCCGGAAGCUGAUC
ACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGC
AAGACCAUCCUGGACUCCUGAAGUC
CGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUC
UGCAGCUGAUCCACGACGACUCCUG
ACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGC
CCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCC
UGCACGAGCACAUCCGCCAACCGGGC
GGCUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAU
CCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACG
AGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCAC
AAGCCCGAGAACAUCGUGAUCGAGAU
GGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGA
AGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGG
AUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAA
GGAGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAAGG
AGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUG
CAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUA
CCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACG
UGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGG
CUGUCCGACUACGACGUGGACCACAU
CGUGCCCCAGUCCUCCUGAAGGACG
ACUCCAUCGACAACAAGGUGCUGACC
CGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUC
CGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGG
UGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGCG
GCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUC
CCCAGCGGAAGUUCGACAACCGUACC
AAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCGA
GCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGC
GGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAU
ACCAAGCACGUGGCCCCAGAUCCUGGA
CUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACG
AGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUG
AAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGCU
GGUGUCCGACUCCCGGAAGGACUCC

[0597]

AGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAAC
AACUACCACACGCCCACGACGCCUA
CCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCC
UGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAG
UCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAA
GGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCG
CCAAGUCCGAGCAGGAGAUCCGCAAG
GCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUC
CAACAUCAUGAACUUCUUAAGACCG
AGAUACCCUGGCCAACGGCGAGAU
CGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAA
CGGCGAGACCGGCGAGAUUGUGUGG
ACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGUG
CGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGU
GAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGC
AGACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCC
AUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAA
GCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGG
ACCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGAC
UCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCU
GGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGC
AAGUCCAAGAAGCUGAAGUCCGUGAA
GGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGG
AGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCC
AUCGACUUCUGGAGGCCAAGGGCUA
CAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCA
UCAAGCUGCCCAAGUACUCCCUGUUC
GAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAU
GCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGA
AGGGCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCC
AAGUACGUGAACUUCUGUACCUGGC
CUCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCU
CCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAG
CUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUA
CCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUUC
CCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCUG
GCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCU
GUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACA
AGCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAAC
AUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAA
CCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUAAGU
ACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAG
CGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCU

[0598]

		GGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCA UCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUC GACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACGG CGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGA AGGUGUCCGAGUCCGCCACCCCCGAG UCCGUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAA GAAGAUCUCCUGA
包括 ITR 的 HD1 TCR 插入	1001	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA GGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCG GGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATC ACTAGGGGTTCTAGATCTTGCCAACA TACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATG CCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCC AGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTG CTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTA CTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTT TTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAG AATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTG CATTTAGGTTTCTTGAGTGGCAGGC CAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAA ATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATA GCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTC CATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATG CTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCG TGA CTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGC CCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTC CAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAA ATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCT CTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTG ACCCTGCGGCTCCGGTGCCCGTCAGTG GGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCC CCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGC AATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTG GCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATG TCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGA GGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTG CAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTC GCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAG GTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGG CCTGGCCTCTTTACGGGTATGGCCCT TGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCC

[0599]

CTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC
CGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGG
AGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAG
CCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGG
CCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCG
TGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCT
GTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAG
CCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTG
CGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTC
TTGTAAATGCGGGCCAAGATGTGCACA
CTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCCG
GCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAG
CGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCT
GCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGAC
GGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTG
CTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGT
GTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGC
TGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTGCGTGAG
CGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTG
CTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACG
CGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGA
GTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCT
TTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTG
ACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCA
GGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTT
GGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGG
AGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCC
ACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTT
AGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTC
TCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTG
GATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGA
CAGTGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATT
TCAGGTGTCGTGATGCGGCCGCCACCA
TGGGATCTTGGACACTGTGTTGCGTGT
CCCTGTGCATCCTGGTGGCCAAGCACA
CAGATGCCGGCGTGATCCAGTCTCCTA
GACACGAAGTGACCGAGATGGGCCAA
GAAGTGACCCTGCGCTGCAAGCCTATC
AGCGGCCACGATTACCTGTTCTGGTAC
AGACAGACCATGATGAGAGGCCTGGA
ACTGCTGATCTACTTCAACAACAACGT
GCCCATCGACGACAGCGGCATGCCCC
AGGATAGATTCAGCGCCAAGATGCCC

[0600]

AACGCCAGCTTCAGCACCCCTGAAGATC
CAGCCTAGCGAGCCCAGAGATAGCGC
CGTGTACTTCTGCGCCAGCAGAAAGAC
AGGCGGCTACAGCAATCAGCCCCAGC
ACTTTGGAGATGGCACCCGGCTGAGCA
TCCTGGAAGATCTGAAGAACGTGTTCC
CACCTGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTT
CTGAGGCCGAGATCAGCCACACACAG
AAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCCACC
GGCTTCTATCCCGATCACGTGGAAGT
TCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGT
GCACAGCGGCGTCAGCACCGATCCTCA
GCCTCTGAAAGAGCAGCCCCTCTGAA
CGACAGCAGATACTGCCTGAGCAGCA
GACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGC
AGAACCCAGAAACCACTTCAGATGC
CAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAG
AACGATGAGTGGACCCAGGATAGAGC
CAAGCCTGTGACACAGATCGTGTCTGC
CGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTG
GCTTTACCAGCGAGAGCTACCAGCAG
GGCGTGCTGTCTGCCACAATCCTGTAC
GAGATCCTGCTGGGCAAAGCCACTCTG
TACGCCGTGCTGGTGTCTGCCCTGGTG
CTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGA
TAGCAGGGGCGGCTCCGGTGCCACAA
ACTTCTCCCTGCTCAAGCAGGCCGGAG
ATGTGGAAGAGAACCCTGGCCCTATG
GAAACCCTGCTGAAGGTGCTGAGCGG
CACACTGCTGTGGCAGCTGACATGGGT
CCGATCTCAGCAGCCTGTGCAGTCTCC
TCAGGCCGTGATTCTGAGAGAAGGCG
AGGACGCCGTGATCAACTGCAGCAGC
TCTAAGGCCCTGTACAGCGTGCACTGG
TACAGACAGAAGCACGGCGAGGCCCC
TGTGTTCTGATGATCCTGCTGAAAGG
CGGCGAGCAGAAGGGCCACGAGAAGA
TCAGCGCCAGCTTCAACGAGAAGAAG
CAGCAGTCCAGCCTGTACCTGACAGCC
AGCCAGCTGAGCTACAGCGGCACCTA
CTTTTGTGGCACCGCCTGGATCAACGA
CTACAAGCTGTCTTTCGGAGCCGGCAC
CACAGTGACAGTGCGGGCCAATATTCA

[0601]

GAACCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCT
GAGAGACAGCAAGAGCAGCGACAAGA
GCGTGTGCCTGTTACCGACTTCGACA
GCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAG
GACAGCGACGTGTACATCACCGATAA
GACTGTGCTGGACATGCGGAGCATGG
ACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCT
GGTCCAACAAGAGCGATTTTCGCCTGCG
CCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCC
CCGAGGACACATTCTTCCCAAGTCCTG
AGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTG
GAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAA
CCTGAACTTCCAGAACCTGAGCGTGAT
CGGCTTCAGAATCCTGCTGCTCAAGGT
GGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCT
GAGACTGTGGTCCAGCTAACCTCGACT
GTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTT
GTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGA
CCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCC
TTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCAT
CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTA
TTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGAC
AGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAA
TAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGG
GCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAA
CCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCC
ACTAGTCGTGTACCAGCTGAGAGACTC
TAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCT
ATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAA
TGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGT
GTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGA
CATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAA
CAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATC
TGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAA
CAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTT
CTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTT
TGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCT
TCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAG
CTCTGGTCAATGATGTCTAAACTCCT
CTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCAT
TGCCACCAAAACCCTCTTTTTACTAAG
AAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCC
AGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGA

[0602]

		TGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCA CGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTAGATCT AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCC ACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGG GCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAG AGGGAGTGGCCAA

序列表

<110>	因特利亚治疗公司 (INTELLIA THERAPEUTICS, INC.)	
<120>	用于免疫疗法的T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域3 (TIM3)组合物和方法	
<130>	01155-0041-00PCT	
<150>	US 63/147,221	
<151>	2021-02-08	
<160>	1001	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	1	
	gacgggcacg agguuccug	20
<210>	2	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	2	
	aaccucgugc ccgucugcug	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	3	
	ggugcucagg acugaugaaa	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	

<400> 4	
gcuccuuugc cccagcagac	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 5	
agucggugca ggggugaccu	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 6	
uuauGCCUGG GAUUUGGAUC	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 7	
UCCAAGGAU GCUUACCACC	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 8	
GGUGGUAAGC AUCCUUGGAA	20
<210> 9	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	

<223> 合成	
<400> 9	
uccaaggaug cuuaccacca	20
<210> 10	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 10	
ugcugccgga uccaaaucce	20
<210> 11	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 11	
ggagguuggc caaagagaug	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 12	
ccacauuggc caaugaguua	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 13	
auaggcaucu acaucggagc	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

<220>		
<223>	合成	
<400>	14	
uaggcaucua caucggagca		20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	15	
agcagcagga cacagucaaa		20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	16	
ccguaacuca uuggccaaug		20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	17	
ucuagagucc cguaacucau		20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	18	
cuaaaugggg auuuccgcaa		20
<210>	19	
<211>	20	
<212>	RNA	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 19	
ugaguuacgg gacucuagau	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 20	
uccagagucc cguaagucan	20
<210> 21	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 21	
agacgggcac gagguuccu	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 22	
ccaaggauac uuaccaccag	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 23	
uguguuugaa uguggcaacg	20
<210> 24	
<211> 20	

<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	24	
cauccagaua	cuggcuaaaau	20
<210>	25	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	25	
gccaaugacu	uacgggacuc	20
<210>	26	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	26	
cgacaaccca	aagguuguga	20
<210>	27	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	27	
guuguuucug	acauuagcca	20
<210>	28	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	28	
cugccccaug	cauaguuacc	20
<210>	29	

<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	29	
ucuggagcaa ccaucagaa		20
<210>	30	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	30	
gaaccucgug cccgucugcu		20
<210>	31	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	31	
gcgacaaccc aaagguugug		20
<210>	32	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	32	
ggaaccucgu gcccgucugc		20
<210>	33	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	33	
cugguuugau gaccaacuuc		20

<210>	34	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	34	
cagacgggca	cgagguuccc	20
<210>	35	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	35	
gcagcaaccc	ucacaaccuu	20
<210>	36	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	36	
aauguggcaa	cguggugcuc	20
<210>	37	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	37	
auugcaaagc	gacaacccaa	20
<210>	38	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	38	

uucuacaccc cagccgcccc	20
<210> 39	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 39	
auccccaauuu agccaguauc	20
<210> 40	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 40	
cuuacuguua gauuuauauc	20
<210> 41	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 41	
gauguagaug ccuaauucuga	20
<210> 42	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 42	
cuagauuggc caaugacuua	20
<210> 43	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	

<400> 43	
cacauuggcc aaugaguac	20
<210> 44	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 44	
uagauuggcc aaugacuuac	20
<210> 45	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 45	
acguugccac auucaaacac	20
<210> 46	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 46	
augcuuacca ccaggggaca	20
<210> 47	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 47	
guggaauaca gagcggaggu	20
<210> 48	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	

<223> 合成	
<400> 48	
ucuacacccc agccgccccca	20
<210> 49	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 49	
cuguuagauu uauaucaggg	20
<210> 50	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 50	
ccccuggugg uaagcauccu	20
<210> 51	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 51	
aucggagcag ggaucugugc	20
<210> 52	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 52	
uggugcucag gacugaugaa	20
<210> 53	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

<220>		
<223>	合成	
<400>	53	
uccauagcaa	auauccacau	20
<210>	54	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	54	
caugcaaaug	uccacucacc	20
<210>	55	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	55	
caaccucccu	cccucaggau	20
<210>	56	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	56	
ggcggcuggg	guguagaagc	20
<210>	57	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	57	
aucagaauag	gcaucuacau	20
<210>	58	
<211>	20	
<212>	RNA	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 58	
cagcaacccu cacaaccuuu	20
<210> 59	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 59	
uugccaaucc ugagggaggg	20
<210> 60	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 60	
auuauugcua ugucagcagc	20
<210> 61	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 61	
acgagguucc cuggggcggc	20
<210> 62	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 62	
gcggcuggggg uguagaagca	20
<210> 63	
<211> 20	

<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	63	
agaaguggaa	uacagagcgg	20
<210>	64	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	64	
ucggagcagg	gaucugugcu	20
<210>	65	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	65	
acagugggau	cuacugcugc	20
<210>	66	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	66	
ugaaaaauuu	aaccugaagu	20
<210>	67	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	67	
ugccccagca	gacgggcacg	20
<210>	68	

<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	68	
cuaugcaggg uccucagaag		20
<210>	69	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	69	
aaauaaggug guuggaucua		20
<210>	70	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	70	
cauuugccaa uccugaggga		20
<210>	71	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	71	
ucagggacac aucuccuuug		20
<210>	72	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	72	
uuggcaaaug caguagcaga		20

<210>	73	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	73	
uuuucaucau ucauuauGCC		20
<210>	74	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	74	
auccagauac uggcuaaaug		20
<210>	75	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	75	
accugggccca uguccccugg		20
<210>	76	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	76	
gcauuugcca auccugaggg		20
<210>	77	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	77	

cagcagcagg acacagucaa	20
<210> 78	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 78	
guuaccuggg ccaugucccc	20
<210> 79	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 79	
gccacauuca aacacaggac	20
<210> 80	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 80	
acauccagau acuggcuaaa	20
<210> 81	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 81	
gccuguccug uguuugaaug	20
<210> 82	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	

<400> 82	
cgagguuccc uggggcggcu	20
<210> 83	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 83	
uacugcauuu gccaauccug	20
<210> 84	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 84	
gagguucccu ggggcggcug	20
<210> 85	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 85	
cauucuuau gccugggauu	20
<210> 86	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 86	
agagaacgua uaugaagugg	20
<210> 87	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	

<223> 合成	
<400> 87	
cgcucuguau uccacuucug	20
<210> 88	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 88	
acuucacugc agccuuucca	20
<210> 89	
<211> 100	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 89	
uguguuugaa uguggcaacg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210> 90	
<211> 100	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 90	
cgacaaccca aagguuguga guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210> 91	
<211> 100	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 91	
ggaaccucgu gcccgucugc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210> 92	

<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	92	
ggcggcuggg guguagaagc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc		60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu		100
<210>	93	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	93	
uugccaaucc ugagggaggg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc		60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu		100
<210>	94	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	94	
agaaguggaa uacagagcgg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc		60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu		100
<210>	95	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	95	
ugaaaaauuu aaccugaagu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc		60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu		100
<210>	96	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	

<220>		
<223>	合成	
<400>	96	
agucggugca	ggggugaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac	uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210>	97	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	97	
accugggcca	ugucuccugg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac	uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210>	98	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	98	
cgcucuguau	uccacuucug guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac	uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210>	99	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	99	
auaggcaucu	acaucggagc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac	uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210>	100	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	100	

ccacauuggc caaugaguua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210> 101	
<211> 100	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 101	
uaggcaucua caucggagca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210> 102	
<211> 100	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 102	
agcagcagga cacagucaaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210> 103	
<211> 100	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 103	
gcuccuuugc cccagcagac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210> 104	
<211> 100	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 104	
ggugguaagc auccuuggaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210> 105	

<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	105	
uuccaaggau	gcuuaccacc	guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguuaucaac	uugaaaaagu	ggcaccgagu cggugcuuuu 100
<210>	106	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	106	
aaccucgugc	ccgucugcug	guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguuaucaac	uugaaaaagu	ggcaccgagu cggugcuuuu 100
<210>	107	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	107	
gacgggcacg	agguuuccug	guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguuaucaac	uugaaaaagu	ggcaccgagu cggugcuuuu 100
<210>	108	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	108	
ggugcucagg	acugaugaaa	guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguuaucaac	uugaaaaagu	ggcaccgagu cggugcuuuu 100
<210>	109	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	

<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<400>	109	
	agcagcagga cacagucaaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc	60
	cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210>	110	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<400>	110	
	gcuccuuugc cccagcagac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc	60
	cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210>	111	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<400>	111	
	aaccucgugc ccgucugcug guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc	60
	cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210>	112	
<211>	4140	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	

<220>

<223> 合成

<400> 112

auggacaaga	aguacuccau	cggccuggac	aucggcacca	acuccguggg	cugggccgug	60
aucaccgacg	aguacaaggu	gcccuccaag	aaguucaagg	ugcuggggcaa	caccgaccgg	120
cacuccauca	agaagaaccu	gaucggcgcc	cugcuguuucg	acuccggcga	gaccgccgag	180
gccacccggc	ugaagcggac	cgcccggcgg	cgguacaccc	ggcgggaagaa	ccggaucugc	240
uaccugcagg	agaucuuuc	caacgagaug	gccaaaggugg	acgacuccuu	cuuccaccgg	300
cuggaggagu	ccuuccuggu	ggaggaggac	aagaagcacg	agcggcaccc	caucuucggc	360
aacaucgugg	acgagguggc	cuaccacgag	aaguacccca	ccaucuacca	ccugcggaag	420
aagcuggugg	acuccaccga	caaggccgac	cugcggcuga	ucuaccuggc	ccuggcccac	480
augaucaagu	uccggggcca	cuuccugauc	gagggcgacc	ugaaccccga	caacuccgac	540
guggacaagc	uguucaucca	gcuggugcag	accuacaacc	agcuguucga	ggagaacccc	600
aucaacgccu	ccggcgugga	cgccaaggcc	auccuguccg	cccggcuguc	caagucccgg	660
cggcuggaga	accugaucgc	ccagcugccc	ggcgagaaga	agaacggccu	guucggcaac	720
cugaucgccc	ugucccuggg	ccugaccccc	aacuucaagu	ccaacuucga	ccuggccgag	780
gacgccaagc	ugcagcuguc	caaggacacc	uacgacgacg	accuggacaa	ccugcuggcc	840
cagaucggcg	accaguacgc	cgaccuguuc	cuggccgcca	agaaccuguc	cgacgccauc	900
cugcuguuccg	acauccugcg	ggugaacacc	gagaucacca	aggccccccu	guccgccucc	960
augaucaagc	gguacgacga	gcaccaccag	gaccugaccc	ugcugaaggc	ccuggugcgg	1020
cagcagcugc	ccgagaagua	caaggagau	uuuucgacc	aguccaagaa	cggcuacgcc	1080
ggcuacaucg	acggcggcgc	cucccaggag	gaguucuaca	aguucaucaa	gcccuaucug	1140
gagaagaugg	acggcaccga	ggagcugcug	gugaagcuga	accgggagga	ccugcugcgg	1200
aagcagcgga	ccuucgacaa	cggcuccauc	ccccaccaga	uccaccuggg	cgagcugcac	1260
gccauccugc	ggcggcagga	ggacuucua	ccuuccuga	aggacaaccg	ggagaagauc	1320
gagaagaucc	ugaccuuccg	gaucuccuac	uacgugggcc	cccuggcccc	gggcaacucc	1380
cgguucgccu	ggaugacccg	gaaguuccgag	gagaccauca	cccccuggaa	cuucgaggag	1440
gugguggaca	agggcgccuc	cgcccagucc	uucaucgagc	ggaugaccaa	cuucgacaag	1500
aaccugccca	acgagaaggu	gcugcccaag	cacucccugc	uguacgagua	cuucaccgug	1560
uacaacgagc	ugaccaaggu	gaaguacgug	accgagggca	ugcggaagcc	cgccuuccug	1620
uccggcgagc	agaagaaggc	caucguggac	cugcuguuca	agaccaaccg	gaaggugacc	1680
gugaagcagc	ugaaggagga	cuacuucaag	aagaucgagu	gcuucgacuc	cguggagauc	1740
uccggcgugg	aggaccgguu	caacgccucc	cugggcaccu	accacgaccu	gcugaagauc	1800
aucaaggaca	aggacuuccu	ggacaacgag	gagaacgagg	acauccugga	ggacaucgug	1860
cugaccucga	cccuguucga	ggaccgggag	augaucgagg	agcggcugaa	gaccuacgcc	1920
caccuguucg	acgacaaggu	gaugaagcag	cugaagcggc	ggcgguacac	cggcuggggc	1980
cggcuguccc	ggaagcugau	caacggcauc	cgggacaagc	aguccggcaa	gaccauccug	2040
gacuuccuga	aguccgacgg	cuucgccaac	cggaaucuca	ugcagcugau	ccacgacgac	2100
ucccugaccu	ucaaggagga	cauccagaag	gcccaggugu	ccggccaggg	cgacucccug	2160

cacgagcaca	ucgccaaccu	ggccggcucc	cccgccauca	agaagggcgau	ccugcagacc	2220
gugaaggugg	uggacgagcu	ggugaaggug	augggccggc	acaagcccga	gaacaucgug	2280
aucgagaugg	cccgggagaa	ccagaccacc	cagaagggcc	agaagaacuc	ccgggagcgg	2340
augaagcgga	ucgaggaggg	caucaaggag	cugggcuccc	agauccugaa	ggagcacccc	2400
guggagaaca	cccagcugca	gaacgagaag	cuguaccugu	acuaccugca	gaacggccgg	2460
gacauguacg	uggaccagga	gcuggacauc	aaccggcugu	ccgacuacga	cguggaccac	2520
aucgugcccc	aguccuuccu	gaaggacgac	uccaucgaca	acaaggugcu	gacccggucc	2580
gacaagaacc	ggggcaaguc	cgacaacgug	ccuuccgagg	agguggugaa	gaagaugaag	2640
aacuacuggc	ggcagcugcu	gaacgccaag	cugaucaccc	agcgggaagu	cgacaaccug	2700
accaaggccg	agcggggcgg	ccuguccgag	cuggacaagg	ccggcuucau	caagcggcag	2760
cugguggaga	cccggcagau	caccaagcac	guggcccaga	uccuggacuc	ccggaugaac	2820
accaaguacg	acgagaacga	caagcugauc	cgggagguga	aggugaucac	ccugaagucc	2880
aagcuggugu	ccgacuuccg	gaaggacuuc	caguucuaca	aggugcggga	gaucaacaac	2940
uaccaccacg	cccacgacgc	cuaccugaac	gccguggugg	gcaccgccc	gaucaagaag	3000
uaccccaagc	uggaguccga	guucguguac	ggcgacuaca	agguguacga	cgugcggaag	3060
augaucgcca	aguccgagca	ggagaucggc	aaggccaccg	ccaaguacuu	cuucuacucc	3120
aacaucauga	acuucuuaa	gaccgagauc	accugggcca	acggcgagau	ccggaagcgg	3180
ccccugaucg	agaccaacgg	cgagaccggc	gagaucgugu	gggacaaggg	ccgggacuuc	3240
gccaccgugc	ggaaggugcu	guccaugccc	caggugaaca	ucgugaagaa	gaccgaggug	3300
cagaccggcg	gcuucuccaa	ggaguccauc	cugcccaagc	ggaacuccga	caagcugauc	3360
gcccgggaaga	aggacuggga	ccccaaag	uacggcggcu	ucgacucucc	caccguggcc	3420
uacuccgugc	uggugguggc	caagguggag	aagggcgaagu	ccaagaagcu	gaaguccgug	3480
aaggagcugc	ugggcaucac	caucauggag	cgguccuccu	ucgagaagaa	ccccaucgac	3540
uuccuggagg	ccaagggcua	caaggaggug	aagaaggacc	ugaucaucaa	gcugcccaag	3600
uacucccugu	ucgagcugga	gaacggccgg	aagcgggaugc	uggccuccgc	cggcgagcug	3660
cagaagggca	acgagcuggc	ccugcccucc	aaguacguga	acuuccugua	ccuggccucc	3720
cacuacgaga	agcugaaggg	cucccccgag	gacaacgagc	agaagcagcu	guucguggag	3780
cagcacaagc	acuaccugga	cgagaucauc	gagcagaucu	ccgaguucuc	caagcgggug	3840
auccuggccg	acgccaaccu	ggacaaggug	cuguccgccu	acaacaagca	ccgggacaag	3900
cccauccggg	agcaggccga	gaacaucauc	caccuguuca	cccugaccaa	ccugggcgcc	3960
cccgccgccu	ucaaguacuu	cgacaccacc	aucgaccgga	agcgguacac	cuccaccaag	4020
gaggugcugg	acgccaccuu	gauccaccag	uccaucaccg	gccuguacga	gacccggauc	4080
gaccuguccc	agcugggcgg	cgacggcggc	ggcucuccca	agaagaagcg	gaagguguga	4140
<210>	113					
<211>	1379					
<212>	PRT					
<213>	人工序列(Artificial Sequence)					
<220>						
<223>	合成					

<400> 113

Met	Asp	Lys	Lys	Tyr	Ser	Ile	Gly	Leu	Asp	Ile	Gly	Thr	Asn	Ser	Val
1				5					10					15	
Gly	Trp	Ala	Val	Ile	Thr	Asp	Glu	Tyr	Lys	Val	Pro	Ser	Lys	Lys	Phe
			20					25					30		
Lys	Val	Leu	Gly	Asn	Thr	Asp	Arg	His	Ser	Ile	Lys	Lys	Asn	Leu	Ile
		35					40					45			
Gly	Ala	Leu	Leu	Phe	Asp	Ser	Gly	Glu	Thr	Ala	Glu	Ala	Thr	Arg	Leu
	50					55					60				
Lys	Arg	Thr	Ala	Arg	Arg	Arg	Tyr	Thr	Arg	Arg	Lys	Asn	Arg	Ile	Cys
65				70					75					80	
Tyr	Leu	Gln	Glu	Ile	Phe	Ser	Asn	Glu	Met	Ala	Lys	Val	Asp	Asp	Ser
			85					90					95		
Phe	Phe	His	Arg	Leu	Glu	Glu	Ser	Phe	Leu	Val	Glu	Glu	Asp	Lys	Lys
		100						105					110		
His	Glu	Arg	His	Pro	Ile	Phe	Gly	Asn	Ile	Val	Asp	Glu	Val	Ala	Tyr
	115						120					125			
His	Glu	Lys	Tyr	Pro	Thr	Ile	Tyr	His	Leu	Arg	Lys	Lys	Leu	Val	Asp
	130						135					140			
Ser	Thr	Asp	Lys	Ala	Asp	Leu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Leu	Ala	His
145				150					155					160	
Met	Ile	Lys	Phe	Arg	Gly	His	Phe	Leu	Ile	Glu	Gly	Asp	Leu	Asn	Pro
			165					170					175		
Asp	Asn	Ser	Asp	Val	Asp	Lys	Leu	Phe	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Thr	Tyr
		180						185					190		
Asn	Gln	Leu	Phe	Glu	Glu	Asn	Pro	Ile	Asn	Ala	Ser	Gly	Val	Asp	Ala
	195						200					205			
Lys	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Arg	Leu	Ser	Lys	Ser	Arg	Arg	Leu	Glu	Asn
	210					215					220				
Leu	Ile	Ala	Gln	Leu	Pro	Gly	Glu	Lys	Lys	Asn	Gly	Leu	Phe	Gly	Asn
225				230					235					240	
Leu	Ile	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Leu	Thr	Pro	Asn	Phe	Lys	Ser	Asn	Phe
			245					250					255		
Asp	Leu	Ala	Glu	Asp	Ala	Lys	Leu	Gln	Leu	Ser	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp
	260							265					270		
Asp	Asp	Leu	Asp	Asn	Leu	Leu	Ala	Gln	Ile	Gly	Asp	Gln	Tyr	Ala	Asp
	275						280					285			
Leu	Phe	Leu	Ala	Ala	Lys	Asn	Leu	Ser	Asp	Ala	Ile	Leu	Leu	Ser	Asp
	290					295					300				

Ile	Leu	Arg	Val	Asn	Thr	Glu	Ile	Thr	Lys	Ala	Pro	Leu	Ser	Ala	Ser
305							310				315				320
Met	Ile	Lys	Arg	Tyr	Asp	Glu	His	His	Gln	Asp	Leu	Thr	Leu	Leu	Lys
							325				330				335
Ala	Leu	Val	Arg	Gln	Gln	Leu	Pro	Glu	Lys	Tyr	Lys	Glu	Ile	Phe	Phe
							340				345				350
Asp	Gln	Ser	Lys	Asn	Gly	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Asp	Gly	Gly	Ala	Ser
							355				360				365
Gln	Glu	Glu	Phe	Tyr	Lys	Phe	Ile	Lys	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Met	Asp
							370				375				380
Gly	Thr	Glu	Glu	Leu	Leu	Val	Lys	Leu	Asn	Arg	Glu	Asp	Leu	Leu	Arg
385							390				395				400
Lys	Gln	Arg	Thr	Phe	Asp	Asn	Gly	Ser	Ile	Pro	His	Gln	Ile	His	Leu
							405				410				415
Gly	Glu	Leu	His	Ala	Ile	Leu	Arg	Arg	Gln	Glu	Asp	Phe	Tyr	Pro	Phe
							420				425				430
Leu	Lys	Asp	Asn	Arg	Glu	Lys	Ile	Glu	Lys	Ile	Leu	Thr	Phe	Arg	Ile
							435				440				445
Pro	Tyr	Tyr	Val	Gly	Pro	Leu	Ala	Arg	Gly	Asn	Ser	Arg	Phe	Ala	Trp
							450				455				460
Met	Thr	Arg	Lys	Ser	Glu	Glu	Thr	Ile	Thr	Pro	Trp	Asn	Phe	Glu	Glu
465							470				475				480
Val	Val	Asp	Lys	Gly	Ala	Ser	Ala	Gln	Ser	Phe	Ile	Glu	Arg	Met	Thr
							485				490				495
Asn	Phe	Asp	Lys	Asn	Leu	Pro	Asn	Glu	Lys	Val	Leu	Pro	Lys	His	Ser
							500				505				510
Leu	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Phe	Thr	Val	Tyr	Asn	Glu	Leu	Thr	Lys	Val	Lys
							515				520				525
Tyr	Val	Thr	Glu	Gly	Met	Arg	Lys	Pro	Ala	Phe	Leu	Ser	Gly	Glu	Gln
							530				535				540
Lys	Lys	Ala	Ile	Val	Asp	Leu	Leu	Phe	Lys	Thr	Asn	Arg	Lys	Val	Thr
545							550				555				560
Val	Lys	Gln	Leu	Lys	Glu	Asp	Tyr	Phe	Lys	Lys	Ile	Glu	Cys	Phe	Asp
							565				570				575
Ser	Val	Glu	Ile	Ser	Gly	Val	Glu	Asp	Arg	Phe	Asn	Ala	Ser	Leu	Gly
							580				585				590
Thr	Tyr	His	Asp	Leu	Leu	Lys	Ile	Ile	Lys	Asp	Lys	Asp	Phe	Leu	Asp
							595				600				605
Asn	Glu	Glu	Asn	Glu	Asp	Ile	Leu	Glu	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Leu	Thr

610	615	620
Leu Phe Glu Asp Arg	Glu Met Ile Glu Glu Arg	Leu Lys Thr Tyr Ala
625	630	635
His Leu Phe Asp Asp	Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg	Arg Arg Tyr
645	650	655
Thr Gly Trp Gly Arg	Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly	Ile Arg Asp
660	665	670
Lys Gln Ser Gly Lys Thr	Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser	Asp Gly Phe
675	680	685
Ala Asn Arg Asn Phe Met	Gln Leu Ile His Asp Asp	Ser Leu Thr Phe
690	695	700
Lys Glu Asp Ile Gln Lys	Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly	Asp Ser Leu
705	710	715
His Glu His Ile Ala Asn	Leu Ala Gly Ser Pro Ala	Ile Lys Lys Gly
725	730	735
Ile Leu Gln Thr Val Lys	Val Val Asp Glu Leu Val	Lys Val Met Gly
740	745	750
Arg His Lys Pro Glu Asn	Ile Val Ile Glu Met Ala	Arg Glu Asn Gln
755	760	765
Thr Thr Gln Lys Gly Gln	Lys Asn Ser Arg Glu Arg	Met Lys Arg Ile
770	775	780
Glu Glu Gly Ile Lys Glu	Leu Gly Ser Gln Ile Leu	Lys Glu His Pro
785	790	795
Val Glu Asn Thr Gln Leu	Gln Asn Glu Lys Leu Tyr	Leu Tyr Tyr Leu
805	810	815
Gln Asn Gly Arg Asp Met	Tyr Val Asp Gln Glu Leu	Asp Ile Asn Arg
820	825	830
Leu Ser Asp Tyr Asp Val	Asp His Ile Val Pro Gln	Ser Phe Leu Lys
835	840	845
Asp Asp Ser Ile Asp Asn	Lys Val Leu Thr Arg Ser	Asp Lys Asn Arg
850	855	860
Gly Lys Ser Asp Asn Val	Pro Ser Glu Glu Val Val	Lys Lys Met Lys
865	870	875
Asn Tyr Trp Arg Gln Leu	Leu Asn Ala Lys Leu Ile	Thr Gln Arg Lys
885	890	895
Phe Asp Asn Leu Thr Lys	Ala Glu Arg Gly Gly Leu	Ser Glu Leu Asp
900	905	910
Lys Ala Gly Phe Ile Lys	Arg Gln Leu Val Glu Thr	Arg Gln Ile Thr
915	920	925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp		
930	935	940
Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser		
945	950	955 960
Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg		
965	970	975
Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val		
980	985	990
Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe		
995	1000	1005
Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala		
1010	1015	1020
Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe		
1025	1030	1035
Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala		
1040	1045	1050
Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu		
1055	1060	1065
Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val		
1070	1075	1080
Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr		
1085	1090	1095
Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys		
1100	1105	1110
Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro		
1115	1120	1125
Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val		
1130	1135	1140
Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys		
1145	1150	1155
Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser		
1160	1165	1170
Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys		
1175	1180	1185
Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu		
1190	1195	1200
Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly		
1205	1210	1215
Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val		

1220	1225	1230
Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser		
1235	1240	1245
Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys		
1250	1255	1260
His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys		
1265	1270	1275
Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala		
1280	1285	1290
Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn		
1295	1300	1305
Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala		
1310	1315	1320
Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser		
1325	1330	1335
Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr		
1340	1345	1350
Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp		
1355	1360	1365
Gly Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val		
1370	1375	

<210> 114

<211> 4140

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 114

auggacaaga aguacagcau cggacuggac aucggaacaa acagcgucgg augggcaguc	60
aucacagacg aaauacaaggu cccgagcaag aaguucaagg uccugggaaa cacagacaga	120
cacagcauca agaagaaccu gaucggagca cugcuguucg acagcggaga aacagcagaa	180
gcaacaagac ugaagagaac agcaagaaga agauacacaa gaagaaagaa cagaauucgc	240
uaccugcagg aaaucuucag caacgaaaug gcaaaggucg acgacagcuu cuuccacaga	300
cuggaagaaa gcuuccuggu cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gaucuucgga	360
aacaucgucg acgaagucgc auaccacgaa aaguaccgga caaucuacca ccugagaaag	420
aagcuggucg acagcacaga caaggcagac cugagacuga ucuaccuggc acuggcacac	480
augaucaagu ucagaggaca cuuccugauc gaaggagacc ugaacccgga caacagcgac	540
gucgacaagc uguucaucca gcugguccag acauacaacc agcuguucga agaaaacccg	600
aucaacgcaa gcggagucga cgcaaaggca auccugagcg caagacugag caagagcaga	660

agacuggaaa	accugaucgc	acagcugccg	ggagaaaaga	agaacggacu	guucggaaac	720
cugaucgcac	ugagccuggg	acugacaccg	aacuucaaga	gcaacuucga	ccuggcagaa	780
gacgcaaagc	ugcagcugag	caaggacaca	uacgacgacg	accuggacaa	ccugcuggca	840
cagaucggag	accaguacgc	agaccuguuc	cuggcagcaa	agaaccugag	cgacgcaauc	900
cugcugagcg	acauccugag	agucaacaca	gaaaucaaca	aggcaccgcu	gagcgcaagc	960
augaucaaga	gauacgacga	acaccaccag	gaccugacac	ugcugaaggc	acuggucaga	1020
cagcagcugc	cggaaaagua	caaggaaauc	uucuucgacc	agagcaagaa	cggauacgca	1080
ggauacaucg	acggaggagc	aagccaggaa	gaauucuaca	aguucaucaa	gccgauccug	1140
gaaaagaugg	acggaacaga	agaacugcug	gucaagcuga	acagagaaga	ccugcugaga	1200
aagcagagaa	cauucgacaa	cggaaagcauc	ccgcaccaga	uccaccuggg	agaacugcac	1260
gcaauccuga	gaagacagga	agacuucua	ccguuccuga	aggacaacag	agaaaagauc	1320
gaaaagaucc	ugacauucag	aaucccgua	uacgucggac	cgucggcaag	aggaaacagc	1380
agauucgcau	ggaugacaag	aaagagcgaa	gaaacaauca	caccguggaa	cuucgaagaa	1440
gucgucgaca	aggagcaag	cgcacagagc	uucaucgaaa	gaaugacaaa	cuucgacaag	1500
aaccugccga	acgaaaaggu	ccugccgaag	cacagccugc	uguacgaaua	cuucacaguc	1560
uacaacgaac	ugacaaaaggu	caaguacguc	acagaaggaa	ugagaaagcc	ggcauuccug	1620
agcggagaac	agaagaaggc	aaucgucgac	cugcuguuca	agacaaacag	aaaggucaca	1680
gucaagcagc	ugaaggaaga	cuacuucaag	aagaucgaau	gcuucgacag	cgucgaaauc	1740
agcggagucg	aagacagauu	caacgcaagc	cugggaacau	accacgaccu	gcugaagauc	1800
aucaaggaca	aggacuuccu	ggacaacgaa	gaaaacgaag	acauccugga	agacaucguc	1860
cugacacuga	cacuguucga	agacagagaa	augaucgaag	aaagacugaa	gacauacgca	1920
caccuguucg	acgacaaggu	caugaagcag	cugaagagaa	gaagauacac	aggaugggga	1980
agacugagca	gaaagcugau	caacggaau	agagacaagc	agagcggaaa	gacaauccug	2040
gacuuccuga	agagcgacgg	auucgcaaac	agaaacuua	ugcagcugau	ccacgacgac	2100
agccugacau	ucaaggaaga	cauccagaag	gcacaggua	gcggacaggg	agacagccug	2160
cacgaacaca	ucgcaaaccu	ggcaggaagc	ccggcaauca	agaagggaau	ccugcagaca	2220
gucaaggucg	ucgacgaacu	ggucaagguc	augggaagac	acaagccgga	aaacaucguc	2280
aucgaaaugg	caagagaaaa	ccagacaaca	cagaaggagc	agaagaacag	cagagaaaaga	2340
augaagagaa	ucgaagaagg	aaucaaggaa	cugggaagcc	agauccugaa	ggaacacccg	2400
gucgaaaaca	cacagcugca	gaacgaaaag	cuguaccugu	acuaccugca	gaacggaaga	2460
gacauguacg	ucgaccagga	acuggacauc	aacagacuga	gcgacuacga	cgucgaccac	2520
aucgucccg	agagcuuccu	gaaggacgac	agcaucgaca	acaagguccu	gacaagaagc	2580
gacaagaaca	gaggaaaagag	cgacaacguc	ccgagcgaag	aagucgucaa	gaagaugaag	2640
aacuacugga	gacagcugcu	gaacgcaaag	cugaucacac	agagaaaguu	cgacaaccug	2700
acaaaggcag	agagaggagg	acugagcgaa	cuggacaagg	caggauucau	caagagacag	2760
cuggucgaaa	caagacagau	cacaaagcac	gucgcacaga	uccuggacag	cagaaugaac	2820
acaaaguacg	acgaaaacga	caagcugauc	agagaaguca	aggucaucac	acugaagagc	2880
aagcugguca	gcgacuucag	aaaggacuuc	caguucuaa	aggucagaga	aaucaacaac	2940
uaccaccacg	cacacgacgc	auaccugaac	gcagucgucg	gaacagcacu	gaucaagaag	3000

uacccgaagc	uggaaagcga	auucgucuac	ggagacuaca	aggucuacga	cgucagaaag	3060
augaucgcaa	agagcgaaca	ggaaaucgga	aaggcaacag	caaaguacuu	cuucuacagc	3120
aacaucauga	acuucuuaa	gacagaaauc	acacuggcaa	acggagaaau	cagaaagaga	3180
ccgcugaucg	aaacaaacgg	agaaacagga	gaaaucgucu	gggacaaggg	aagagacuuc	3240
gcaacaguca	gaaagguccu	gagcaugccg	cagguaaca	ucgucaagaa	gacagaaguc	3300
cagacaggag	gauucagcaa	ggaaagcauc	cugccgaaga	gaaacagcga	caagcugauc	3360
gcaagaaaga	aggacuggga	cccgaagaag	uacggaggau	ucgacagccc	gacagucgca	3420
uacagcgucc	uggucgucgc	aaaggucgaa	aagggaaaga	gcaagaagcu	gaagagcguc	3480
aaggaacugc	ugggaaucac	aaucauggaa	agaagcagcu	ucgaaaagaa	cccgaucgac	3540
uuccuggaag	caaagggaau	caaggaaguc	aagaaggacc	ugaucaucaa	gcugccgaag	3600
uacagccugu	ucgaacugga	aaacggaaga	aagagaauvc	uggcaagcgc	aggagaacug	3660
cagaagggaa	acgaacuggc	acugccgagc	aaguacguca	acuuccugua	ccuggcaagc	3720
cacuacgaaa	agcugaaggg	aagcccggaa	gacaacgaac	agaagcagcu	guucgucgaa	3780
cagcacaagc	acuaccugga	cgaaaucauc	gaacagauca	gcgaauucag	caagagaguc	3840
auccuggcag	acgcaaaccu	ggacaagguc	cugagcgcau	acaacaagca	cagagacaag	3900
ccgaucagag	aacaggcaga	aaacaucauc	caccuguuca	cacugacaaa	ccugggagca	3960
ccggcagcau	ucaaguacuu	cgacacaaca	aucgacagaa	agagauacac	aagcacaag	4020
gaaguccugg	acgcaacacu	gauccaccag	agcaucacag	gacuguacga	aacaagauc	4080
gaccugagcc	agcugggagg	agacggagga	ggaagcccga	agaagaagag	aaaggucuag	4140

<210> 115

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 115

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 116

Pro Lys Lys Lys Arg Arg Val

1 5

<210> 117

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 117

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys

1

5

10

15

<210> 118

<400> 118

000

<210> 119

<400> 119

000

<210> 120

<400> 120

000

<210> 121

<400> 121

000

<210> 122

<400> 122

000

<210> 123

<400> 123

000

<210> 124

<400> 124

000

<210> 125

<400> 125

000

<210> 126

<400> 126

000

<210> 127

<400> 127

000

<210> 128

<400> 128

000
<210> 129
<400> 129
000
<210> 130
<400> 130
000
<210> 131
<400> 131
000
<210> 132
<400> 132
000
<210> 133
<400> 133
000
<210> 134
<400> 134
000
<210> 135
<400> 135
000
<210> 136
<400> 136
000
<210> 137
<400> 137
000
<210> 138
<400> 138
000
<210> 139
<400> 139
000
<210> 140
<400> 140
000
<210> 141
<400> 141

000	
<210>	142
<400>	142
000	
<210>	143
<400>	143
000	
<210>	144
<400>	144
000	
<210>	145
<400>	145
000	
<210>	146
<400>	146
000	
<210>	147
<400>	147
000	
<210>	148
<400>	148
000	
<210>	149
<400>	149
000	
<210>	150
<400>	150
000	
<210>	151
<400>	151
000	
<210>	152
<400>	152
000	
<210>	153
<400>	153
000	
<210>	154
<400>	154

000	
<210>	155
<400>	155
000	
<210>	156
<400>	156
000	
<210>	157
<400>	157
000	
<210>	158
<400>	158
000	
<210>	159
<400>	159
000	
<210>	160
<400>	160
000	
<210>	161
<400>	161
000	
<210>	162
<400>	162
000	
<210>	163
<400>	163
000	
<210>	164
<400>	164
000	
<210>	165
<400>	165
000	
<210>	166
<400>	166
000	
<210>	167
<400>	167

000	
<210>	168
<400>	168
000	
<210>	169
<400>	169
000	
<210>	170
<400>	170
000	
<210>	171
<400>	171
000	
<210>	172
<400>	172
000	
<210>	173
<400>	173
000	
<210>	174
<400>	174
000	
<210>	175
<400>	175
000	
<210>	176
<400>	176
000	
<210>	177
<400>	177
000	
<210>	178
<400>	178
000	
<210>	179
<400>	179
000	
<210>	180
<400>	180

000	
<210>	181
<400>	181
000	
<210>	182
<400>	182
000	
<210>	183
<400>	183
000	
<210>	184
<400>	184
000	
<210>	185
<400>	185
000	
<210>	186
<400>	186
000	
<210>	187
<400>	187
000	
<210>	188
<400>	188
000	
<210>	189
<400>	189
000	
<210>	190
<400>	190
000	
<210>	191
<400>	191
000	
<210>	192
<400>	192
000	
<210>	193
<400>	193

000		
<210>	194	
<400>	194	
000		
<210>	195	
<400>	195	
000		
<210>	196	
<400>	196	
000		
<210>	197	
<400>	197	
000		
<210>	198	
<400>	198	
000		
<210>	199	
<400>	199	
000		
<210>	200	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	200	
guuuuagagc uaugcuguuu ug		22
<210>	201	
<211>	76	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	201	
guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu		60
ggcaccgagu cggugc		76
<210>	202	
<211>	80	
<212>	RNA	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 202	
guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu	60
ggcaccgagu cggugcuuuu	80
<210> 203	
<400> 203	
000	
<210> 204	
<400> 204	
000	
<210> 205	
<400> 205	
000	
<210> 206	
<400> 206	
000	
<210> 207	
<400> 207	
000	
<210> 208	
<400> 208	
000	
<210> 209	
<400> 209	
000	
<210> 210	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 210	
gacccccucc accccgccuc guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 211	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

<220>		
<223>	合成	
<400>	211	
agagucucuc agcugguaca guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	212	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<400>	212	
ggccucggcg cugacgaucu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc		60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu		100
<210>	213	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<400>	213	
cucucagcug guacacggca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc		60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu		100
<210>	214	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	214	
gacccccucc accccgccuc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc		60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu		100

<210>	215	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<400>	215	
	gaucacgucg gccguuggcg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
	cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210>	216	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<400>	216	
	aguugggcag auaacacuug guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
	cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210>	217	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<400>	217	
	gcggucccug aggugcaccg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
	cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100

<210>	218	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<400>	218	
	cugaacuuuu ccagauauac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
	cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210>	219	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<400>	219	
	ugaccaugug guuagcaucu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
	cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
<210>	220	
<400>	220	
	000	
<210>	221	
<400>	221	
	000	
<210>	222	
<400>	222	
	000	
<210>	223	
<400>	223	
	000	
<210>	224	

<400> 224
000
<210> 225
<400> 225
000
<210> 226
<400> 226
000
<210> 227
<400> 227
000
<210> 228
<400> 228
000
<210> 229
<400> 229
000
<210> 230
<400> 230
000
<210> 231
<400> 231
000
<210> 232
<400> 232
000
<210> 233
<400> 233
000
<210> 234
<400> 234
000
<210> 235
<400> 235
000
<210> 236
<400> 236
000
<210> 237

<400> 237
000
<210> 238
<400> 238
000
<210> 239
<400> 239
000
<210> 240
<400> 240
000
<210> 241
<400> 241
000
<210> 242
<400> 242
000
<210> 243
<400> 243
000
<210> 244
<400> 244
000
<210> 245
<400> 245
000
<210> 246
<400> 246
000
<210> 247
<400> 247
000
<210> 248
<400> 248
000
<210> 249
<400> 249
000
<210> 250

<400> 250	
000	
<210> 251	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 251	
auaggcaucu acaucggagc guuuuagagc uaucguguuu ug	42
<210> 252	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 252	
uaggcaucua caucggagca guuuuagagc uaucguguuu ug	42
<210> 253	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 253	
ccguaacuca uuggccaaug guuuuagagc uaucguguuu ug	42
<210> 254	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 254	
ucuagagucc cguaacucau guuuuagagc uaucguguuu ug	42
<210> 255	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	

<223> 合成	
<400> 255	
cuaaauggggg auuuccgcaa guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 256	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 256	
ugaguuacgg gacucuagau guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 257	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 257	
uccagagucc cguaagucan guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 258	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 258	
agacgggcac gagguuccu guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 259	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 259	
ccaaggauhc uuaccaccag guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 260	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

<220>		
<223>	合成	
<400>	260	
uguguuugaa uguggcaacg guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	261	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	261	
gacgggcacg agguucccug guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	262	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	262	
ugcugccgga uccaaauccc guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	263	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	263	
cauccagaua cuggcuaaaau guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	264	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	264	
gccaaugacu uacgggacuc guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	265	
<211>	42	
<212>	RNA	

<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	265	
	cgacaaccca aagguuguga guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210>	266	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	266	
	guuguuucug acauuagcca guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210>	267	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	267	
	cugccccaug cauaguuacc guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210>	268	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	268	
	ucuggagcaa ccaucagaau guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210>	269	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	269	
	gaaccucgug cccgucugcu guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210>	270	
<211>	42	

<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	270	
gcgacaacccc aaagguugug guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	271	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	271	
ggaaccucgu gcccgucugc guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	272	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	272	
cugguuugau gaccaacuuc guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	273	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	273	
cagacgggca cgagguuccc guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	274	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	274	
gcagcaacccc ucacaaccuu guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	275	

<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	275	
aauguggcaa cguggugcuc guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	276	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	276	
auugcaaagc gacaacccaa guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	277	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	277	
uucuacaccc cagccgcccc guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	278	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	278	
ccacauuggc caaugaguua guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	279	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	279	
auccccaauu agccaguauc guuuuagagc uaugcuguuu ug		42

<210>	280	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	280	
cuuacuguua	gauuuauauc	guuuuagagc
uagcuguuu	ug	42
<210>	281	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	281	
gauguagaug	ccuauucuga	guuuuagagc
uagcuguuu	ug	42
<210>	282	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	282	
cuagauuggc	caaugacuua	guuuuagagc
uagcuguuu	ug	42
<210>	283	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	283	
uccaagggaug	cuuaccacca	guuuuagagc
uagcuguuu	ug	42
<210>	284	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	284	

ggugguaagc auccuuggaa guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 285	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 285	
cacauuggcc aaugaguuac guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 286	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 286	
uagauuggcc aaugacuuac guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 287	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 287	
acguugccac auucaaacac guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 288	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 288	
augcuuacca ccaggggaca guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 289	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	

<400> 289	
guggaauaca gagcggaggu guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 290	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 290	
ucuacacccc agccgccccca guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 291	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 291	
cuguuagauu uauaucaggg guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 292	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 292	
ccccuggugg uaagcauccu guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 293	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 293	
aucggagcag ggaucugugc guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 294	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	

<223>	合成	
<400>	294	
uggugcucag	gacugaugaa guuuuagagc	42
uau	gcuuuu ug	
<210>	295	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	295	
uccauagcaa	auauccacau guuuuagagc	42
uau	gcuuuu ug	
<210>	296	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	296	
caugcaaaug	uccacucacc guuuuagagc	42
uau	gcuuuu ug	
<210>	297	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	297	
caaccucccu	cccucaggau guuuuagagc	42
uau	gcuuuu ug	
<210>	298	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	298	
ggcggcuggg	guguagaagc guuuuagagc	42
uau	gcuuuu ug	
<210>	299	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	

<220>		
<223>	合成	
<400>	299	
uuauGCCUGG	gauuUGGAUC	guuuuagagc uauGCUguuu ug 42
<210>	300	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1) .. (20)	
<223>	n为a、c、g或u	
<400>	300	
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguuaucac	uugaaaaagu	ggcaccgagu cggugcuuuu 100
<210>	301	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	301	
aucagaauag	gcaucuacau	guuuuagagc uauGCUguuu ug 42
<210>	302	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	302	
cagcaacccu	cacaaccuuu	guuuuagagc uauGCUguuu ug 42
<210>	303	
<211>	42	

<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	303	
uugccaaucc	ugagggaggg guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210>	304	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	304	
auuauugcua	ugucagcagc guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210>	305	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	305	
acgagguucc	cuggggcggc guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210>	306	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	306	
uuccaaggau	gcuuaccacc guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210>	307	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	307	
gcggcugggg	uguagaagca guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210>	308	

<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	308	
	agaaguggaa uacagagcgg guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210>	309	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	309	
	ucggagcagg gaucugugcu guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210>	310	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	310	
	acagugggau cuacugcugc guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210>	311	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	311	
	ugaaaaauuu aaccugaagu guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210>	312	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	312	
	ugccccagca gacgggcacg guuuuagagc uaugcuguuu ug	42

<210>	313	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	313	
cuaugcaggg uccucagaag guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	314	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	314	
aaauaaggug guuggaucua guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	315	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	315	
cauuugccaa uccugaggga guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	316	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	316	
ucagggacac aucuccuuug guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	317	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	317	

agucggugca ggggugaccu guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 318	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 318	
uuggcaaaug caguagcaga guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 319	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 319	
uuuucaucau ucauuaugcc guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 320	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 320	
auccagauac uggcuaaaug guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 321	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 321	
ggugcucagg acugaugaaa guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 322	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	

<400> 322	
accugggccca ugucuccugg guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 323	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 323	
gcuuugcca auccugaggg guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 324	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 324	
cagcagcagg acacagucaa guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 325	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 325	
guuaccuggg ccaugucucc guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 326	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 326	
gccacauuca aacacaggac guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 327	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	

<223> 合成	
<400> 327	
acauccagau acuggcuaaa guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 328	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 328	
gccuguccug uguuugaaug guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 329	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 329	
gcuccuuugc cccagcagac guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 330	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 330	
cgagguuccc uggggcggcu guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 331	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 331	
uacugcauuu gccaauccug guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 332	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

<220>		
<223>	合成	
<400>	332	
gagguucccu ggggcggcug guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	333	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	333	
aaccucgugc ccgucugcug guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	334	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	334	
cauucauuau gccugggauu guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	335	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	335	
agagaacgua uaugaagugg guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	336	
<211>	42	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	336	
agcagcagga cacagucaaa guuuuagagc uaugcuguuu ug		42
<210>	337	
<211>	42	
<212>	RNA	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 337	
cgcucuguau uccacuucug guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 338	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 338	
ggagguuggc caaagagaug guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 339	
<211> 42	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 339	
acuucacugc agccuuucca guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
<210> 340	
<400> 340	
000	
<210> 341	
<400> 341	
000	
<210> 342	
<400> 342	
000	
<210> 343	
<400> 343	
000	
<210> 344	
<400> 344	
000	
<210> 345	
<400> 345	
000	

<210> 346
<400> 346
000
<210> 347
<400> 347
000
<210> 348
<400> 348
000
<210> 349
<400> 349
000
<210> 350
<400> 350
000
<210> 351
<400> 351
000
<210> 352
<400> 352
000
<210> 353
<400> 353
000
<210> 354
<400> 354
000
<210> 355
<400> 355
000
<210> 356
<400> 356
000
<210> 357
<400> 357
000
<210> 358
<400> 358
000

<210> 359
<400> 359
000
<210> 360
<400> 360
000
<210> 361
<400> 361
000
<210> 362
<400> 362
000
<210> 363
<400> 363
000
<210> 364
<400> 364
000
<210> 365
<400> 365
000
<210> 366
<400> 366
000
<210> 367
<400> 367
000
<210> 368
<400> 368
000
<210> 369
<400> 369
000
<210> 370
<400> 370
000
<210> 371
<400> 371
000

<210> 372
<400> 372
000
<210> 373
<400> 373
000
<210> 374
<400> 374
000
<210> 375
<400> 375
000
<210> 376
<400> 376
000
<210> 377
<400> 377
000
<210> 378
<400> 378
000
<210> 379
<400> 379
000
<210> 380
<400> 380
000
<210> 381
<400> 381
000
<210> 382
<400> 382
000
<210> 383
<400> 383
000
<210> 384
<400> 384
000

<210> 385
<400> 385
000
<210> 386
<400> 386
000
<210> 387
<400> 387
000
<210> 388
<400> 388
000
<210> 389
<400> 389
000
<210> 390
<400> 390
000
<210> 391
<400> 391
000
<210> 392
<400> 392
000
<210> 393
<400> 393
000
<210> 394
<400> 394
000
<210> 395
<400> 395
000
<210> 396
<400> 396
000
<210> 397
<400> 397
000

<210>	398	
<400>	398	
000		
<210>	399	
<400>	399	
000		
<210>	400	
<211>	76	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	400	
guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu		60
ggcaccgagu cggugc		76
<210>	401	
<211>	90	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1) .. (20)	
<223>	n为a、c、g或u	
<400>	401	
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc		60
cguuaucaacg aaagggcacc gagucggugc		90
<210>	402	
<211>	90	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<220>		

<221>	misc_feature	
<222>	(1) .. (20)	
<223>	n为a、c、g或u	
<400>	402	
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
	cguuaucaacg aaagggcacc gagucggugc	90
<210>	403	
<211>	88	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1) .. (20)	
<223>	n为a、c、g或u	
<400>	403	
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
	cguuaucaac uuggcaccga gucggugc	88
<210>	404	
<211>	88	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1) .. (20)	
<223>	n为a、c、g或u	
<400>	404	
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
	cguuaucaac uuggcaccga gucggugc	88
<210>	405	
<211>	88	
<212>	RNA	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1) .. (20)	
<223> n为a、c、g或u	
<400> 405	
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uuggcaccga gucggugc	88
<210> 406	
<211> 88	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1) .. (20)	
<223> n为a、c、g或u	
<400> 406	
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uuggcaccga gucggugc	88
<210> 407	
<211> 90	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1) .. (20)	
<223> n为a、c、g或u	
<400> 407	
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60

cguuaucaacg aaagggcacc gagucggugc	90
<210> 408	
<211> 90	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> 含有2'-O-Me、2'-氟和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1) .. (20)	
<223> n为a、c、g或u	
<400> 408	
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaacg aaagggcacc gagucggugc	90
<210> 409	
<211> 90	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1) .. (20)	
<223> n为a、c、g或u	
<400> 409	
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaacg aaagggcacc gagucggugc	90
<210> 410	
<211> 90	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<220>	
<221> misc_feature	

〈223〉 含有2'-O-Me和PS修饰;关于取代和优选实施方案 的详细描述,参见所提交的说明书	
〈220〉	
〈221〉 misc_feature	
〈222〉 (1) .. (20)	
〈223〉 n为a、c、g或u	
〈400〉 410	
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaacg aaagggcacc gagucggugc	90
〈210〉 411	
〈211〉 74	
〈212〉 RNA	
〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)	
〈220〉	
〈223〉 合成	
〈400〉 411	
aacagcauag caaguuaaaa uaaggcuagu ccguuaucaa cuugaaaaag uggcaccgag	60
ucggugcuuu uuuu	74
〈210〉 412	
〈211〉 25	
〈212〉 RNA	
〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)	
〈220〉	
〈223〉 合成	
〈400〉 412	
uggcugggca cgcguuaau auaag	25
〈210〉 413	
〈211〉 25	
〈212〉 RNA	
〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)	
〈220〉	
〈223〉 合成	
〈400〉 413	
cugggcacgc guuuauaua agugg	25
〈210〉 414	
〈211〉 25	
〈212〉 RNA	
〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)	
〈220〉	

<223> 合成	
<400> 414	
uuuaauauaa guggaggcgu cgcgc	25
<210> 415	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 415	
aauauaagug gaggcgucgc gcugg	25
<210> 416	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 416	
auauaagugg aggcgucgcg cuggc	25
<210> 417	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 417	
gggcauuccu gaagcugaca gcauu	25
<210> 418	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 418	
ggcauuccug aagcugacag cauuc	25
<210> 419	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

<220>		
<223>	合成	
<400>	419	
auucggggccg	agaugucucg	cuccg
		25
<210>	420	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	420	
cugugcucgc	gcuacucucu	cuuuc
		25
<210>	421	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	421	
cucgcgcuac	ucucucuuc	uggcc
		25
<210>	422	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	422	
gcgcuacucu	cucuucugg	ccugg
		25
<210>	423	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	423	
auauuaaacg	cgugcccagc	caauc
		25
<210>	424	
<211>	25	
<212>	RNA	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 424	
ucucggccccg aaugcuguca gcuuc	25
<210> 425	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 425	
gcuaaggcca cggagcgaga caucu	25
<210> 426	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 426	
aguagcgcgga gcacagcuaa ggcca	25
<210> 427	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 427	
agagagagua gcgcgagcac agcua	25
<210> 428	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 428	
gagagacuca cgcuggauag ccucc	25
<210> 429	
<211> 25	

<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	429	
gcgggagggg	aggagagacu	cacgc
		25
<210>	430	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	430	
uauuccucag	guacuccaaa	gauuc
		25
<210>	431	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	431	
uuuacucacg	ucauccagca	gagaa
		25
<210>	432	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	432	
caaaauuccu	gaauugcuau	guguc
		25
<210>	433	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	433	
aaauuuccug	aaugcuau	ugucu
		25
<210>	434	

<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	434	
acauugaagu ugacuuacug aagaa		25
<210>	435	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	435	
aagaauaggag agagaauuga aaaag		25
<210>	436	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	436	
gagcauucag acuugucuuu cagca		25
<210>	437	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	437	
uucagacuug ucuuucagca aggac		25
<210>	438	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	438	
uuugucacag cccaagauag uuaag		25

<210>	439	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	439	
uugucacagc ccaagauagu uaagu		25
<210>	440	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	440	
ugucacagcc caagauaguu aagug		25
<210>	441	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	441	
aucuuuggag uaccugagga auauc		25
<210>	442	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	442	
aaucuuugga guaccugagg aaauau		25
<210>	443	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	443	

uaaaccugaa ucuuuggagu accug	25
<210> 444	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 444	
gaugacguga guaaaccuga aucuu	25
<210> 445	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 445	
ggaaauuuga cuuuccauuc ucugc	25
<210> 446	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 446	
augaaaccca gacacauagc aauc	25
<210> 447	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 447	
ucaguaaguc aacuucaaug ucgga	25
<210> 448	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	

<400> 448	
uucuucagua agucaacuuc aaugu	25
<210> 449	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 449	
caggcauacu caucuuuuuc agugg	25
<210> 450	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 450	
gcaggcauac ucaucuuuuu cagug	25
<210> 451	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 451	
ggcaggcaua cucaucuuuu ucagu	25
<210> 452	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 452	
cggcaggcau acucaucuuu uucag	25
<210> 453	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	

<223> 合成	
<400> 453	
gacaaaguca caugguucac acggc	25
<210> 454	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 454	
cugugacaaa gucacauggu ucaca	25
<210> 455	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 455	
uauucuugggc ugugacaaag ucaca	25
<210> 456	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 456	
aagacuuacc ccacuuacu aucuu	25
<210> 457	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 457	
uaagacuuac cccacuuuac uaucu	25
<210> 458	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

<220>		
<223>	合成	
<400>	458	
agaucgagac auguaagcag cauca		25
<210>	459	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	459	
ucgagacaug uaagcagcau caugg		25
<210>	460	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	460	
augucucgau cuaugaaaaa gacag		25
<210>	461	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	461	
uuuucagguu ugaauggcc gcauu		25
<210>	462	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	462	
agguuugaag augccgcauu uggau		25
<210>	463	
<211>	25	
<212>	RNA	

<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	463	
	cacuuacacu uuaugcacaa aaugu	25
<210>	464	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	464	
	acuuacacuu uaugcacaaa augua	25
<210>	465	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	465	
	auguaggguu auaauaaugu uaaca	25
<210>	466	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	466	
	gucuccaugu uugauguauc ugagc	25
<210>	467	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	467	
	gauguaucug agcagguugc uccac	25
<210>	468	
<211>	25	

<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 468	
agcagguugc uccacaggua gcucu	25
<210> 469	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 469	
agguugcucc acagguagcu cuagg	25
<210> 470	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 470	
gguugcucca cagguagcuc uagga	25
<210> 471	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 471	
gcuccacagg uagcucuagg agggc	25
<210> 472	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 472	
agcucuagga gggcuggcaa cuuag	25
<210> 473	

<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	473	
ucuaggagggg cuggcaacuu agagg		25
<210>	474	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	474	
cuaggagggc uggcaacuua gaggu		25
<210>	475	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	475	
uaggagggcu ggcaacuua aggug		25
<210>	476	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	476	
auucucuau ccaacaucaa caucu		25
<210>	477	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	477	
caauuuacau acucugcuua gaauu		25

<210>	478	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	478	
aaUUUacaua cucugcuuag aaUUU		25
<210>	479	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	479	
auUUacauac ucugcuuaga auuug		25
<210>	480	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	480	
uuUacauacu cugcuuagaa uuugg		25
<210>	481	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	481	
gggaaaaUUU agaaauauaa uugac		25
<210>	482	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成	
<400>	482	

uuagaaauau aauugacagg auuau	25
<210> 483	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 483	
uacuucuuau acauuugaua aagua	25
<210> 484	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 484	
cuuauacauu ugauaaagua aggca	25
<210> 485	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 485	
cauuugauaa aguaaggcau gguug	25
<210> 486	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 486	
aaguaaggca uggguuguggu uaauc	25
<210> 487	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	

<400> 487	
cuucaaaccu gaaaagaaaa gaaaa	25
<210> 488	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 488	
auuuggaauu cauccaaucc aaaug	25
<210> 489	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 489	
uauuaaaaag caagcaagca gaauu	25
<210> 490	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 490	
gcaaccugcu cagauacauc aaaca	25
<210> 491	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 491	
uugccagccc uccuagagcu accug	25
<210> 492	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	

<223> 合成	
<400> 492	
ucaaaucuga ccaagauguu gaugu	25
<210> 493	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 493	
caaaauucuaa gcagaguaug uaaau	25
<210> 494	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成	
<400> 494	
caaguuuuau gauuuuuua acuug	25
<210> 495	
<400> 495	
000	
<210> 496	
<400> 496	
000	
<210> 497	
<400> 497	
000	
<210> 498	
<400> 498	
000	
<210> 499	
<400> 499	
000	
<210> 500	
<400> 500	
000	
<210> 501	
<400> 501	

000
<210> 502
<400> 502
000
<210> 503
<400> 503
000
<210> 504
<400> 504
000
<210> 505
<400> 505
000
<210> 506
<400> 506
000
<210> 507
<400> 507
000
<210> 508
<400> 508
000
<210> 509
<400> 509
000
<210> 510
<400> 510
000
<210> 511
<400> 511
000
<210> 512
<400> 512
000
<210> 513
<400> 513
000
<210> 514
<400> 514

000	
<210>	515
<400>	515
000	
<210>	516
<400>	516
000	
<210>	517
<400>	517
000	
<210>	518
<400>	518
000	
<210>	519
<400>	519
000	
<210>	520
<400>	520
000	
<210>	521
<400>	521
000	
<210>	522
<400>	522
000	
<210>	523
<400>	523
000	
<210>	524
<400>	524
000	
<210>	525
<400>	525
000	
<210>	526
<400>	526
000	
<210>	527
<400>	527

000	
<210>	528
<400>	528
000	
<210>	529
<400>	529
000	
<210>	530
<400>	530
000	
<210>	531
<400>	531
000	
<210>	532
<400>	532
000	
<210>	533
<400>	533
000	
<210>	534
<400>	534
000	
<210>	535
<400>	535
000	
<210>	536
<400>	536
000	
<210>	537
<400>	537
000	
<210>	538
<400>	538
000	
<210>	539
<400>	539
000	
<210>	540
<400>	540

000	
<210>	541
<400>	541
000	
<210>	542
<400>	542
000	
<210>	543
<400>	543
000	
<210>	544
<400>	544
000	
<210>	545
<400>	545
000	
<210>	546
<400>	546
000	
<210>	547
<400>	547
000	
<210>	548
<400>	548
000	
<210>	549
<400>	549
000	
<210>	550
<400>	550
000	
<210>	551
<400>	551
000	
<210>	552
<400>	552
000	
<210>	553
<400>	553

000	
<210>	554
<400>	554
000	
<210>	555
<400>	555
000	
<210>	556
<400>	556
000	
<210>	557
<400>	557
000	
<210>	558
<400>	558
000	
<210>	559
<400>	559
000	
<210>	560
<400>	560
000	
<210>	561
<400>	561
000	
<210>	562
<400>	562
000	
<210>	563
<400>	563
000	
<210>	564
<400>	564
000	
<210>	565
<400>	565
000	
<210>	566
<400>	566

000	
<210>	567
<400>	567
000	
<210>	568
<400>	568
000	
<210>	569
<400>	569
000	
<210>	570
<400>	570
000	
<210>	571
<400>	571
000	
<210>	572
<400>	572
000	
<210>	573
<400>	573
000	
<210>	574
<400>	574
000	
<210>	575
<400>	575
000	
<210>	576
<400>	576
000	
<210>	577
<400>	577
000	
<210>	578
<400>	578
000	
<210>	579
<400>	579

000	
<210>	580
<400>	580
000	
<210>	581
<400>	581
000	
<210>	582
<400>	582
000	
<210>	583
<400>	583
000	
<210>	584
<400>	584
000	
<210>	585
<400>	585
000	
<210>	586
<400>	586
000	
<210>	587
<400>	587
000	
<210>	588
<400>	588
000	
<210>	589
<400>	589
000	
<210>	590
<400>	590
000	
<210>	591
<400>	591
000	
<210>	592
<400>	592

000	
<210>	593
<400>	593
000	
<210>	594
<400>	594
000	
<210>	595
<400>	595
000	
<210>	596
<400>	596
000	
<210>	597
<400>	597
000	
<210>	598
<400>	598
000	
<210>	599
<400>	599
000	
<210>	600
<400>	600
000	
<210>	601
<400>	601
000	
<210>	602
<400>	602
000	
<210>	603
<400>	603
000	
<210>	604
<400>	604
000	
<210>	605
<400>	605

000	
<210>	606
<400>	606
000	
<210>	607
<400>	607
000	
<210>	608
<400>	608
000	
<210>	609
<400>	609
000	
<210>	610
<400>	610
000	
<210>	611
<400>	611
000	
<210>	612
<400>	612
000	
<210>	613
<400>	613
000	
<210>	614
<400>	614
000	
<210>	615
<400>	615
000	
<210>	616
<400>	616
000	
<210>	617
<400>	617
000	
<210>	618
<400>	618

000
<210> 619
<400> 619
000
<210> 620
<400> 620
000
<210> 621
<400> 621
000
<210> 622
<400> 622
000
<210> 623
<400> 623
000
<210> 624
<400> 624
000
<210> 625
<400> 625
000
<210> 626
<400> 626
000
<210> 627
<400> 627
000
<210> 628
<400> 628
000
<210> 629
<400> 629
000
<210> 630
<400> 630
000
<210> 631
<400> 631

000	
<210>	632
<400>	632
000	
<210>	633
<400>	633
000	
<210>	634
<400>	634
000	
<210>	635
<400>	635
000	
<210>	636
<400>	636
000	
<210>	637
<400>	637
000	
<210>	638
<400>	638
000	
<210>	639
<400>	639
000	
<210>	640
<400>	640
000	
<210>	641
<400>	641
000	
<210>	642
<400>	642
000	
<210>	643
<400>	643
000	
<210>	644
<400>	644

000	
<210>	645
<400>	645
000	
<210>	646
<400>	646
000	
<210>	647
<400>	647
000	
<210>	648
<400>	648
000	
<210>	649
<400>	649
000	
<210>	650
<400>	650
000	
<210>	651
<400>	651
000	
<210>	652
<400>	652
000	
<210>	653
<400>	653
000	
<210>	654
<400>	654
000	
<210>	655
<400>	655
000	
<210>	656
<400>	656
000	
<210>	657
<400>	657

000	
<210>	658
<400>	658
000	
<210>	659
<400>	659
000	
<210>	660
<400>	660
000	
<210>	661
<400>	661
000	
<210>	662
<400>	662
000	
<210>	663
<400>	663
000	
<210>	664
<400>	664
000	
<210>	665
<400>	665
000	
<210>	666
<400>	666
000	
<210>	667
<400>	667
000	
<210>	668
<400>	668
000	
<210>	669
<400>	669
000	
<210>	670
<400>	670

000
<210> 671
<400> 671
000
<210> 672
<400> 672
000
<210> 673
<400> 673
000
<210> 674
<400> 674
000
<210> 675
<400> 675
000
<210> 676
<400> 676
000
<210> 677
<400> 677
000
<210> 678
<400> 678
000
<210> 679
<400> 679
000
<210> 680
<400> 680
000
<210> 681
<400> 681
000
<210> 682
<400> 682
000
<210> 683
<400> 683

000	
<210>	684
<400>	684
000	
<210>	685
<400>	685
000	
<210>	686
<400>	686
000	
<210>	687
<400>	687
000	
<210>	688
<400>	688
000	
<210>	689
<400>	689
000	
<210>	690
<400>	690
000	
<210>	691
<400>	691
000	
<210>	692
<400>	692
000	
<210>	693
<400>	693
000	
<210>	694
<400>	694
000	
<210>	695
<400>	695
000	
<210>	696
<400>	696

000
<210> 697
<400> 697
000
<210> 698
<400> 698
000
<210> 699
<400> 699
000
<210> 700
<400> 700
000
<210> 701
<400> 701
000
<210> 702
<400> 702
000
<210> 703
<400> 703
000
<210> 704
<400> 704
000
<210> 705
<400> 705
000
<210> 706
<400> 706
000
<210> 707
<400> 707
000
<210> 708
<400> 708
000
<210> 709
<400> 709

000
<210> 710
<400> 710
000
<210> 711
<400> 711
000
<210> 712
<400> 712
000
<210> 713
<400> 713
000
<210> 714
<400> 714
000
<210> 715
<400> 715
000
<210> 716
<400> 716
000
<210> 717
<400> 717
000
<210> 718
<400> 718
000
<210> 719
<400> 719
000
<210> 720
<400> 720
000
<210> 721
<400> 721
000
<210> 722
<400> 722

000	
<210>	723
<400>	723
000	
<210>	724
<400>	724
000	
<210>	725
<400>	725
000	
<210>	726
<400>	726
000	
<210>	727
<400>	727
000	
<210>	728
<400>	728
000	
<210>	729
<400>	729
000	
<210>	730
<400>	730
000	
<210>	731
<400>	731
000	
<210>	732
<400>	732
000	
<210>	733
<400>	733
000	
<210>	734
<400>	734
000	
<210>	735
<400>	735

000	
<210>	736
<400>	736
000	
<210>	737
<400>	737
000	
<210>	738
<400>	738
000	
<210>	739
<400>	739
000	
<210>	740
<400>	740
000	
<210>	741
<400>	741
000	
<210>	742
<400>	742
000	
<210>	743
<400>	743
000	
<210>	744
<400>	744
000	
<210>	745
<400>	745
000	
<210>	746
<400>	746
000	
<210>	747
<400>	747
000	
<210>	748
<400>	748

000	
<210>	749
<400>	749
000	
<210>	750
<400>	750
000	
<210>	751
<400>	751
000	
<210>	752
<400>	752
000	
<210>	753
<400>	753
000	
<210>	754
<400>	754
000	
<210>	755
<400>	755
000	
<210>	756
<400>	756
000	
<210>	757
<400>	757
000	
<210>	758
<400>	758
000	
<210>	759
<400>	759
000	
<210>	760
<400>	760
000	
<210>	761
<400>	761

000	
<210>	762
<400>	762
000	
<210>	763
<400>	763
000	
<210>	764
<400>	764
000	
<210>	765
<400>	765
000	
<210>	766
<400>	766
000	
<210>	767
<400>	767
000	
<210>	768
<400>	768
000	
<210>	769
<400>	769
000	
<210>	770
<400>	770
000	
<210>	771
<400>	771
000	
<210>	772
<400>	772
000	
<210>	773
<400>	773
000	
<210>	774
<400>	774

000	
<210>	775
<400>	775
000	
<210>	776
<400>	776
000	
<210>	777
<400>	777
000	
<210>	778
<400>	778
000	
<210>	779
<400>	779
000	
<210>	780
<400>	780
000	
<210>	781
<400>	781
000	
<210>	782
<400>	782
000	
<210>	783
<400>	783
000	
<210>	784
<400>	784
000	
<210>	785
<400>	785
000	
<210>	786
<400>	786
000	
<210>	787
<400>	787

000	
<210>	788
<400>	788
000	
<210>	789
<400>	789
000	
<210>	790
<400>	790
000	
<210>	791
<400>	791
000	
<210>	792
<400>	792
000	
<210>	793
<400>	793
000	
<210>	794
<400>	794
000	
<210>	795
<400>	795
000	
<210>	796
<400>	796
000	
<210>	797
<400>	797
000	
<210>	798
<400>	798
000	
<210>	799
<400>	799
000	
<210>	800
<400>	800

000

<210> 801

<211> 4140

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 801

atggacaaga	agtacagcat	cggactggac	atcggaaaca	acagcgtcgg	atgggcagtc	60
atcacagacg	aatacaaggt	cccagagcaag	aagttcaagg	tcctgggaaa	cacagacaga	120
cacagcatca	agaagaacct	gatcggagca	ctgctgttcg	acagcggaga	aacagcagaa	180
gcaacaagac	tgaagagaac	agcaagaaga	agatacaca	gaagaaagaa	cagaatctgc	240
tacctgcagg	aaatcttcag	caacgaaatg	gcaaaggtcg	acgacagctt	cttccacaga	300
ctggaagaaa	gcttcctggt	cgaagaagac	aagaagcacg	aaagacacc	gatcttcgga	360
aacatcgtcg	acgaagtcgc	ataccacgaa	aagtaccgca	caatctacca	cctgagaaag	420
aagctggtcg	acagcacaga	caaggcagac	ctgagactga	tctacctggc	actggcacac	480
atgatcaagt	tcagaggaca	cttcctgatc	gaaggagacc	tgaacccgga	caacagcgac	540
gtcgacaagc	tgttcattcca	gctggtccag	acatacaacc	agctgttcga	agaaaaccgc	600
atcaacgcaa	gcggagtcga	cgcaaaggca	atcctgagcg	caagactgag	caagagcaga	660
agactggaaa	acctgatcgc	acagctgccg	ggagaaaaga	agaacggact	gttcggaaac	720
ctgatcgcac	tgagcctggg	actgacaccg	aacttcaaga	gcaacttcga	cctggcagaa	780
gacgcaaagc	tgcagctgag	caaggacaca	tacgacgacg	acctggacaa	cctgctggca	840
cagatcggag	accagtacgc	agacctgttc	ctggcagcaa	agaacctgag	cgacgcaatc	900
ctgctgagcg	acatcctgag	agtcaacaca	gaaatcaca	aggcaccgct	gagcgcaagc	960
atgatcaaga	gatacgacga	acaccaccag	gacctgacac	tgctgaaggc	actggtcaga	1020
cagcagctgc	cggaaaagta	caaggaaatc	ttcttcgacc	agagcaagaa	cggatacgca	1080
ggatacatcg	acggaggagc	aagccaggaa	gaattctaca	agttcatcaa	gccgatcctg	1140
gaaaagatgg	acggaacaga	agaactgctg	gtcaagctga	acagagaaga	cctgctgaga	1200
aagcagagaa	cattcgacaa	cggaagcatc	ccgcaccaga	tccacctggg	agaactgcac	1260
gcaatcctga	gaagacagga	agactttctac	ccgttcctga	aggacaacag	agaaaagatc	1320
gaaaagatcc	tgacattcag	aatcccgtac	tacgtcggac	cgctggcaag	aggaaacagc	1380
agattcgcac	ggatgacaag	aaagagcgaa	gaaacaatca	caccgtggaa	cttcgaagaa	1440
gtcgtcgaca	aggagcaag	cgcacagagc	ttcatcgaaa	gaatgacaaa	cttcgacaag	1500
aacctgccga	acgaaaaggt	cctgccgaag	cacagcctgc	tgtacgaata	cttcacagtc	1560
tacaacgaac	tgacaaaaggt	caagtacgtc	acagaaggaa	tgagaaagcc	ggcattcctg	1620
agcggagaac	agaagaaggc	aatcgtcgac	ctgctgttca	agacaaacag	aaaggtcaca	1680
gtcaagcagc	tgaaggaaga	ctacttcaag	aagatcgaat	gcttcgacag	cgtcgaaatc	1740
agcggagtcg	aagacagatt	caacgcaagc	ctgggaacat	accacgacct	gctgaagatc	1800
atcaaggaca	aggacttcct	ggacaacgaa	gaaaacgaag	acatcctgga	agacatcgtc	1860

ctgacactga	cactgttcga	agacagagaa	atgatcgaag	aaagactgaa	gacatacgca	1920
cacctgttcg	acgacaaggt	catgaagcag	ctgaagagaa	gaagatacac	aggatgggga	1980
agactgagca	gaaagctgat	caacggaatc	agagacaagc	agagcggaaa	gacaatcctg	2040
gacttcctga	agagcgacgg	attcgcaaac	agaaacttca	tgcagctgat	ccacgacgac	2100
agcctgacat	tcaaggaaga	catccagaag	gcacagggtca	gcgacaggg	agacagcctg	2160
cacgaacaca	tcgcaaacct	ggcaggaagc	ccggcaatca	agaagggaat	cctgcagaca	2220
gtcaaggtcg	tcgacgaact	ggtcaaggtc	atgggaagac	acaagccgga	aaacatcgtc	2280
atcgaaatgg	caagagaaaa	ccagacaaca	cagaagggac	agaagaacag	cagagaaaga	2340
atgaagagaa	tcgaagaagg	aatcaaggaa	ctgggaagcc	agatcctgaa	ggaacacccg	2400
gtcgaaaaca	cacagctgca	gaacgaaaag	ctgtacctgt	actacctgca	gaacggaaga	2460
gacatgtacg	tcgaccagga	actggacatc	aacagactga	gcgactacga	cgtcgaccac	2520
atcgtcccg	agagcttcct	gaaggacgac	agcatcgaca	acaaggctct	gacaagaagc	2580
gacaagaaca	gaggaaagag	cgacaacgtc	ccgagcgaag	aagtcgtcaa	gaagatgaag	2640
aactactgga	gacagctgct	gaacgcaaag	ctgatcacac	agagaaagtt	cgacaacctg	2700
acaaggcag	agagaggagg	actgagcgaa	ctggacaagg	caggattcat	caagagacag	2760
ctggtcgaaa	caagacagat	cacaaagcac	gtcgcacaga	tcctggacag	cagaatgaac	2820
acaagctacg	acgaaaacga	caagctgatc	agagaagtca	aggtcatcac	actgaagagc	2880
aagctgggtca	gcgacttcag	aaaggacttc	cagttctaca	aggtcagaga	aatcaacaac	2940
taccaccacg	cacacgacgc	atacctgaac	gcagtcgtcg	gaacagcact	gatcaagaag	3000
tacccgaagc	tggaaagcga	attcgtctac	ggagactaca	aggtctacga	cgtcagaaag	3060
atgatcgcaa	agagcgaaca	ggaaatcgga	aaggcaacag	caaagtactt	cttctacagc	3120
aacatcatga	acttcttcaa	gacagaaatc	acactggcaa	acggagaaat	cagaaagaga	3180
ccgctgatcg	aaacaaacgg	agaaacagga	gaaatcgctc	gggacaaggg	aagagacttc	3240
gcaacagtca	gaaaggctct	gagcatgccg	caggtcaaca	tcgtcaagaa	gacagaagtc	3300
cagacaggag	gattcagcaa	ggaaagcatc	ctgccgaaga	gaaacagcga	caagctgac	3360
gcaagaaaga	aggactggga	cccgaagaag	tacggaggat	tcgacagccc	gacagtcgca	3420
tacagcgctc	tggctgctgc	aaaggctgaa	aagggaagaa	gcaagaagct	gaagagcgct	3480
aaggaactgc	tgggaatcac	aatcatggaa	agaagcagct	tcgaaaagaa	cccgatcgac	3540
ttcctggaag	caaagggata	caaggaagtc	aagaaggacc	tgatcatcaa	gctgccgaag	3600
tacagcctgt	tcgaactgga	aaacggaaga	aagagaatgc	tggcaagcgc	aggagaactg	3660
cagaagggaa	acgaactggc	actgccgagc	aagtacgtca	acttcctgta	cctggcaagc	3720
cactacgaaa	agctgaaggg	aagcccggaa	gacaacgaac	agaagcagct	gttcgtcgaa	3780
cagcacaagc	actacctgga	cgaaatcatc	gaacagatca	gcgaattcag	caagagagtc	3840
atcctggcag	acgcaaacct	ggacaaggtc	ctgagcgcat	acaacaagca	cagagacaag	3900
ccgatcagag	aacaggcaga	aaacatcatc	cacctgttca	cactgacaaa	cctgggagca	3960
ccggcagcat	tcaagtactt	cgacacaaca	atcgacagaa	agagatacac	aagcacaag	4020
gaagtccctgg	acgcaaacct	gatccaccag	agcatcacag	gactgtacga	aacaagaatc	4080
gacctgagcc	agctgggagg	agacggagga	ggaagccgga	agaagaagag	aaaggtctag	4140
<210>	802					

<211> 4140

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 802

atggacaaga agtactccat cggcctggac atcggcacca actccgtggg ctgggccgtg	60
atcaccgacg agtacaaggt gccctccaag aagttcaagg tgctgggcaa caccgaccgg	120
cactccatca agaagaacct gatcggcgcc ctgctgttcg actccggcga gaccgccgag	180
gccacccggc tgaagcggac cgcccggcgg cggtagaccc ggcggaagaa ccggatctgc	240
tacctgcagg agatcttctc caacgagatg gccaaagtgg acgactcctt cttccaccgg	300
ctggaggagt ccttcctggt ggaggaggac aagaagcacg agcggcaccc catcttcggc	360
aacatcgtag acgaggtggc ctaccacgag aagtacccca ccatctacca cctgcggaag	420
aagctggtgg actccaccga caaggccgac ctgcggctga tctacctggc cctggcccac	480
atgatcaagt tccggggcca cttcctgatc gagggcgacc tgaaccccgca caactccgac	540
gtggacaagc tgttcatcca gctggtgcag acctacaacc agctgttcga ggagaacccc	600
atcaacgcct ccggcgtgga cgccaaggcc atcctgtccg cccggtgtc caagtcccgg	660
cggctggaga acctgatcgc ccagctgccc ggcgagaaga agaacggcct gttcggcaac	720
ctgatcgccc tgtccctggg cctgaccccc aacttcaagt ccaacttcga cctggccgag	780
gacgccaagc tgcagctgtc caaggacacc tacgacgacg acctggacaa cctgctggcc	840
cagatcggcg accagtacgc cgacctgttc ctggccgcca agaacctgtc cgacgccatc	900
ctgctgtccg acatcctgcg ggtgaacacc gagatcacca agggccccct gtccgcctcc	960
atgatcaagc ggtacgacga gcaccaccag gacctgacct tgctgaaggc cctggtgcgg	1020
cagcagctgc ccgagaagta caaggagatc ttcttcgacc agtccaagaa cggctacgcc	1080
ggctacatcg acggcggcgc ctcccaggag gagttctaca agttcatcaa gccatcctg	1140
gagaagatgg acggcaccga ggagctgctg gtgaagctga accgggagga cctgctgcgg	1200
aagcagcggc ctttcgacaa cggctccatc ccccaccaga tccacctggg cgagctgcac	1260
gcatcctgc ggcggcagga ggacttctac cccttcctga aggacaaccg ggagaagatc	1320
gagaagatcc tgaccttcg gatccctac tacgtgggcc ccctggcccc gggcaactcc	1380
cggttcgcct ggatgacccg gaagtccgag gagaccatca cccctggaa cttcgaggag	1440
gtggtggaca agggcgccct cgcccagtc ttcatcgagc ggatgaccaa cttcgacaag	1500
aacctgccc acgagaaggt gctgcccag cactccctgc tgtacgagta cttaccgtg	1560
tacaacgagc tgaccaaggt gaagtacgtg accgagggca tgcggaagcc cgccttctg	1620
tccggcgagc agaagaaggc catcgtggac ctgctgttca agaccaaccg gaaggtgacc	1680
gtgaagcagc tgaaggagga ctacttcaag aagatcgagt gcttcgactc cgtggagatc	1740
tccggcgtgg aggaccggt caacgcctcc ctgggcacct accacgacct gctgaagatc	1800
atcaaggaca aggacttcct ggacaacgag gagaacgagg acatcctgga ggacatcgtg	1860
ctgacctga ccctgttcga ggaccgggag atgatcgagg agcggctgaa gacctacgcc	1920
cacctgttcg acgacaaggt gatgaagcag ctgaagcggc ggcggtacac cggctggggc	1980

cggctgtccc	ggaagctgat	caacggcatc	cgggacaagc	agtccggcaa	gaccatcctg	2040
gacttcctga	agtccgacgg	cttcgccaac	cggaaactta	tgcagctgat	ccacgacgac	2100
tccctgacct	tcaaggagga	catccagaag	gccaggtgt	ccggccaggg	cgactccctg	2160
cacgagcaca	tcgccaacct	ggccggctcc	cccgccatca	agaaggcat	cctgcagacc	2220
gtgaaggtgg	tggacgagct	ggtgaaggtg	atgggcccgc	acaagcccga	gaacatcgtg	2280
atcgagatgg	cccgggagaa	ccagaccacc	cagaagggcc	agaagaactc	ccgggagcgg	2340
atgaagcgga	tcgaggaggg	catcaaggag	ctgggctccc	agatcctgaa	ggagcacccc	2400
gtggagaaca	cccagctgca	gaacgagaag	ctgtacctgt	actacctgca	gaacggccgg	2460
gacatgtacg	tggaccagga	gctggacatc	aaccggctgt	ccgactacga	cgtggaccac	2520
atcgtgcccc	agtccttcct	gaaggacgac	tccatcgaca	acaaggtgct	gacccggtcc	2580
gacaagaacc	ggggcaagtc	cgacaacgtg	ccctccgagg	aggtggtgaa	gaagatgaag	2640
aactactggc	ggcagctgct	gaacgccaag	ctgatecccc	agcggaagtt	cgacaacctg	2700
accaaggccg	agcggggcgg	cctgtccgag	ctggacaagg	ccggcttcat	caagcggcag	2760
ctggtggaga	cccggcagat	caccaagcac	gtggcccaga	tcctggactc	ccgatgaac	2820
accaagtacg	acgagaacga	caagctgata	cgggaggtga	aggtgatcac	cctgaagtcc	2880
aagctggtgt	ccgacttccg	gaaggacttc	cagttctaca	aggtgcggga	gatcaacaac	2940
taccaccacg	cccacgacgc	ctacctgaac	gccgtggtgg	gcaccgccct	gatcaagaag	3000
taccccaagc	tggagtccga	gttcgtgtac	ggcgactaca	aggtgtacga	cgtgcggaag	3060
atgatcgcca	agtccgagca	ggagatcggc	aaggccaccg	ccaagtactt	cttctactcc	3120
aacatcatga	acttcttcaa	gaccgagatc	accctggcca	acggcgagat	ccggaagcgg	3180
cccctgatcg	agaccaacgg	cgagaccggc	gagatcgtgt	gggacaaggg	ccgggacttc	3240
gccaccgtgc	ggaaggtgct	gtccatgccc	caggtgaaca	tcgtgaagaa	gaccgaggtg	3300
cagaccggcg	gcttctccaa	ggagtccatc	ctgcccgaag	ggaactccga	caagctgata	3360
gcccgggaaga	aggactggga	ccccagaag	tacggcggct	tcgactcccc	caccgtggcc	3420
tactccgtgc	tgggtggtgg	caaggtggag	aagggaaggt	ccaagaagct	gaagtccgtg	3480
aaggagctgc	tgggcatcac	catcatggag	cggctctcct	tcgagaagaa	ccccatcgac	3540
ttcctggagg	ccaagggtca	caaggaggtg	aagaaggacc	tgatcatcaa	gctgcccgaag	3600
tactccctgt	tcgagctgga	gaacggccgg	aagcggatgc	tggcctccgc	cggcgagctg	3660
cagaagggca	acgagctggc	cctgcccctc	aagtacgtga	acttctgtga	cctggcctcc	3720
cactacgaga	agctgaaggg	ctccccgag	gacaacgagc	agaagcagct	gttcgtggag	3780
cagcacaagc	actacctgga	cgagatcatc	gagcagatct	ccgagttctc	caagcgggtg	3840
atcctggccg	acgccaacct	ggacaaggtg	ctgtccgcct	acaacaagca	ccgggacaag	3900
cccatccggg	agcaggccga	gaacatcatc	cacctgttca	ccctgaccaa	cctgggcgcc	3960
cccgcgcct	tcaagtactt	cgacaccacc	atcgaccgga	agcgttacac	ctccaccaag	4020
gaggtgctgg	acgccaccct	gatccaccag	tccatcaccg	gcctgtacga	gacccggtac	4080
gacctgtccc	agctgggcgg	cgacggcggc	ggctccccca	agaagaagcg	gaaggtgtga	4140
<210>	803					
<211>	4197					
<212>	RNA					

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 803

auggacaaga	aguacuccau	cggccuggac	aucggcacca	acuccguggg	cugggccgug	60
aucaccgacg	aguacaaggu	gcccuccaag	aaguucaagg	ugcuggggcaa	caccgaccgg	120
cacuccauca	agaagaaccu	gaucggcgcc	cugcuguucg	acuccggcga	gaccgccgag	180
gccacccggc	ugaagcggac	cgcccgggcg	cgguacaccc	ggcgggaagaa	ccggaucugc	240
uaccugcagg	agaucuuuc	caacgagaug	gccaaaggugg	acgacuccuu	cuuccaccgg	300
cuggaggagu	ccuuccuggu	ggaggaggac	aagaagcacg	agcggcaccc	caucuucggc	360
aacaucgugg	acgagguggc	cuaccacgag	aaguacccca	ccaucuacca	ccugcggaag	420
aagcuggugg	acuccaccga	caaggccgac	cugcggcuga	ucuaccuggc	ccuggcccac	480
augaucaagu	uccggggcca	cuuccugauc	gagggcgacc	ugaaccccga	caacuccgac	540
guggacaagc	uguucaucca	gcuggugcag	accuacaacc	agcuguucga	ggagaacccc	600
aucaacgccu	ccggcgugga	cgccaaggcc	auccuguccg	cccggcuguc	caagucccgg	660
cggcuggaga	accugaucgc	ccagcugccc	ggcgagaaga	agaacggccu	guucggcaac	720
cugaucgccc	ugucccuggg	ccugaccccc	aacuucaagu	ccaacuucga	ccuggccgag	780
gacgccaagc	ugcagcuguc	caaggacacc	uacgacgacg	accuggacaa	ccugcuggcc	840
cagaucggcg	accaguacgc	cgaccuguuc	cuggccgcca	agaaccuguc	cgacgccauc	900
cugcuguccg	acauccugcg	ggugaacacc	gagaucacca	aggccccccu	guccgccucc	960
augaucaagc	gguacgacga	gcaccaccag	gaccugaccc	ugcugaaggc	ccuggugcgg	1020
cagcagcugc	ccgagaagua	caaggagauc	uucuucgacc	aguccaagaa	cggcuacgcc	1080
ggcuacaucg	acggcggcg	cucccaggag	gaguucuaa	aguucaucaa	gcccuaucug	1140
gagaagaugg	acggcaccga	ggagcugcug	gugaagcuga	accgggagga	ccugcugcgg	1200
aagcagcgga	ccuucgacaa	cggcuccauc	ccccaccaga	uccaccuggg	cgagcugcac	1260
gccauccugc	ggcggcagga	ggacuucua	cccuuccuga	aggacaaccg	ggagaagauc	1320
gagaagaucc	ugaccuuccg	gaucuccuac	uacgugggcc	cccuggcccc	gggcaacucc	1380
cgguucgccu	ggaugacccg	gaaguccgag	gagaccauca	cccccuggaa	cuucgaggag	1440
gugguggaca	agggcgccuc	cgcccagucc	uucaucgagc	ggaugaccaa	cuucgacaag	1500
aaccugccca	acgagaaggu	gcugcccaag	cacucccugc	uguacgagua	cuucaccgug	1560
uacaacgagc	ugaccaaggu	gaaguacgug	accgagggca	ugcggaagcc	cgccuuccug	1620
uccggcgagc	agaagaaggc	caucguggac	cugcuguuca	agaccaaccg	gaaggugacc	1680
gugaagcagc	ugaaggagga	cuacuucaag	aagaucgagu	gcuucgacuc	cguggagauc	1740
uccggcgugg	aggaccgguu	caacgccucc	cugggcaccu	accacgaccu	gcugaagauc	1800
aucaaggaca	aggacuuccu	ggacaacgag	gagaacgagg	acauccugga	ggacaucgug	1860
cugaccucga	cccuguucga	ggaccgggag	augaucgagg	agcggcugaa	gaccuacgcc	1920
caccuguucg	acgacaaggu	gaugaagcag	cugaagcggc	ggcgguacac	cggcuggggc	1980
cggcuguccc	ggaagcugau	caacggcauc	cgggacaagc	aguccggcaa	gaccauccug	2040
gacuuccuga	aguccgacgg	cuucgccaac	cggaaucuca	ugcagcugau	ccacgacgac	2100

ucccugaccu	ucaaggagga	cauccagaag	gcccaggugu	ccggccaggg	cgacuccug	2160
cacgagcaca	ucgccaaccu	ggccggcucc	cccgccauca	agaagggc	ccugcagacc	2220
gugaaggugg	uggacgagcu	ggugaaggug	augggccggc	acaagcccga	gaacaucgug	2280
aucgagaugg	cccgggagaa	ccagaccacc	cagaagggcc	agaagaacuc	ccgggagcgg	2340
augaagcgga	ucgaggaggg	caucaaggag	cugggcuccc	agauccugaa	ggagcacccc	2400
guggagaaca	cccagcugca	gaacgagaag	cuguaccugu	acuaccugca	gaacggccgg	2460
gacauguacg	uggaccagga	gcuggacauc	aaccggcugu	ccgacuacga	cguggaccac	2520
aucgugcccc	aguccuuccu	gaaggacgac	uccaucgaca	acaaggugcu	gacccggucc	2580
gacaagaacc	ggggcaaguc	cgacaacgug	ccuccgagg	agguggugaa	gaagaugaag	2640
aacuacuggc	ggcagcugcu	gaacgccaa	cugaucaccc	agcgggaugu	cgacaaccug	2700
accaaggccg	agcggggcgg	ccuguccgag	cuggacaagg	ccggcuuac	caagcggcag	2760
cugguggaga	cccggcagau	caccaagcac	guggcccaga	uccuggacuc	ccggaugaac	2820
accaaguacg	acgagaacga	caagcugauc	cgaggagguga	aggugaucac	ccugaaguuc	2880
aagcuggugu	ccgacuuccg	gaaggacuuc	caguucuaca	aggugcggga	gaucaacaac	2940
uaccaccacg	cccacgacgc	cuaccugaac	gccguggugg	gcaccgccc	gaucaagaag	3000
uacccaagc	uggaguccga	guucguguac	ggcgacuaca	agguguacga	cgugcggag	3060
augaucgcca	aguccgagca	ggagaucggc	aaggccaccg	ccaaguacuu	cuucuacucc	3120
aacaucauga	acuucuuaa	gaccgagauc	accugggcca	acggcgagau	ccggaagcgg	3180
ccccugaucg	agaccaacgg	cgagaccggc	gagaucgugu	gggacaaggg	ccgggacuuc	3240
gccaccgugc	ggaaggugcu	guccaugccc	caggugaaca	ucgugaagaa	gaccgaggug	3300
cagaccggcg	gcuucuccaa	ggaguccauc	cugcccaagc	ggaacuccga	caagcugauc	3360
gcccgggaaga	aggacuggga	ccccaagaag	uacggcggcu	ucgacucucc	caccguggcc	3420
uacuccgugc	uggugguggc	caagguggag	aagggaaguu	ccaagaagcu	gaaguccgug	3480
aaggagcugc	ugggcaucac	caucauggag	cgguccuccu	ucgagaagaa	ccccaucgac	3540
uuccuggagg	ccaagggcua	caaggaggug	aagaaggacc	ugaucaucaa	gcugcccaag	3600
uacucccugu	ucgagcugga	gaacggccgg	aagcggaucc	uggccuccgc	cggcgagcug	3660
cagaagggca	acgagcuggc	ccugcccucc	aaguacguga	acuuccugua	ccuggccucc	3720
cacuacgaga	agcugaaggg	cucggccgag	gacaacgagc	agaagcagcu	guucguggag	3780
cagcacaagc	acuaccugga	cgagaucauc	gagcagaucu	ccgaguucuc	caagcgggug	3840
auccuggccg	acgccaaccu	ggacaaggug	cuguccgccu	acaacaagca	ccgggacaag	3900
cccauccggg	agcaggccga	gaacaucauc	caccuguuca	cccugaccaa	ccugggcgcc	3960
cccgccgccu	ucaaguacuu	cgacaccacc	aucgaccgga	agcgguacac	cuccaccaag	4020
gaggugcugg	acgccacccu	gauccaccag	uccaucaccg	gccuguacga	gaccgggauc	4080
gaccuguccc	agcugggcgg	cgacggcggc	ggcucggcca	agaagaagcg	gaaggugucc	4140
gaguccgcca	cccccgaguc	cguguccggc	uggcggcugu	ucaagaagau	cuccuga	4197

<210> 804

<400> 804

000

<210> 805

<400> 805
000
<210> 806
<400> 806
000
<210> 807
<400> 807
000
<210> 808
<400> 808
000
<210> 809
<400> 809
000
<210> 810
<400> 810
000
<210> 811
<400> 811
000
<210> 812
<400> 812
000
<210> 813
<400> 813
000
<210> 814
<400> 814
000
<210> 815
<400> 815
000
<210> 816
<400> 816
000
<210> 817
<400> 817
000
<210> 818

<400> 818
000
<210> 819
<400> 819
000
<210> 820
<400> 820
000
<210> 821
<400> 821
000
<210> 822
<400> 822
000
<210> 823
<400> 823
000
<210> 824
<400> 824
000
<210> 825
<400> 825
000
<210> 826
<400> 826
000
<210> 827
<400> 827
000
<210> 828
<400> 828
000
<210> 829
<400> 829
000
<210> 830
<400> 830
000
<210> 831

<400> 831
000
<210> 832
<400> 832
000
<210> 833
<400> 833
000
<210> 834
<400> 834
000
<210> 835
<400> 835
000
<210> 836
<400> 836
000
<210> 837
<400> 837
000
<210> 838
<400> 838
000
<210> 839
<400> 839
000
<210> 840
<400> 840
000
<210> 841
<400> 841
000
<210> 842
<400> 842
000
<210> 843
<400> 843
000
<210> 844

<400> 844
000
<210> 845
<400> 845
000
<210> 846
<400> 846
000
<210> 847
<400> 847
000
<210> 848
<400> 848
000
<210> 849
<400> 849
000
<210> 850
<400> 850
000
<210> 851
<400> 851
000
<210> 852
<400> 852
000
<210> 853
<400> 853
000
<210> 854
<400> 854
000
<210> 855
<400> 855
000
<210> 856
<400> 856
000
<210> 857

<400> 857
000
<210> 858
<400> 858
000
<210> 859
<400> 859
000
<210> 860
<400> 860
000
<210> 861
<400> 861
000
<210> 862
<400> 862
000
<210> 863
<400> 863
000
<210> 864
<400> 864
000
<210> 865
<400> 865
000
<210> 866
<400> 866
000
<210> 867
<400> 867
000
<210> 868
<400> 868
000
<210> 869
<400> 869
000
<210> 870

<400> 870
000
<210> 871
<400> 871
000
<210> 872
<400> 872
000
<210> 873
<400> 873
000
<210> 874
<400> 874
000
<210> 875
<400> 875
000
<210> 876
<400> 876
000
<210> 877
<400> 877
000
<210> 878
<400> 878
000
<210> 879
<400> 879
000
<210> 880
<400> 880
000
<210> 881
<400> 881
000
<210> 882
<400> 882
000
<210> 883

<400> 883
000
<210> 884
<400> 884
000
<210> 885
<400> 885
000
<210> 886
<400> 886
000
<210> 887
<400> 887
000
<210> 888
<400> 888
000
<210> 889
<400> 889
000
<210> 890
<400> 890
000
<210> 891
<400> 891
000
<210> 892
<400> 892
000
<210> 893
<400> 893
000
<210> 894
<400> 894
000
<210> 895
<400> 895
000
<210> 896

<400> 896
000
<210> 897
<400> 897
000
<210> 898
<400> 898
000
<210> 899
<400> 899
000
<210> 900
<400> 900
000
<210> 901
<400> 901
000
<210> 902
<400> 902
000
<210> 903
<400> 903
000
<210> 904
<400> 904
000
<210> 905
<400> 905
000
<210> 906
<400> 906
000
<210> 907
<400> 907
000
<210> 908
<400> 908
000
<210> 909

<400> 909
000
<210> 910
<400> 910
000
<210> 911
<400> 911
000
<210> 912
<400> 912
000
<210> 913
<400> 913
000
<210> 914
<400> 914
000
<210> 915
<400> 915
000
<210> 916
<400> 916
000
<210> 917
<400> 917
000
<210> 918
<400> 918
000
<210> 919
<400> 919
000
<210> 920
<400> 920
000
<210> 921
<400> 921
000
<210> 922

<400> 922
000
<210> 923
<400> 923
000
<210> 924
<400> 924
000
<210> 925
<400> 925
000
<210> 926
<400> 926
000
<210> 927
<400> 927
000
<210> 928
<400> 928
000
<210> 929
<400> 929
000
<210> 930
<400> 930
000
<210> 931
<400> 931
000
<210> 932
<400> 932
000
<210> 933
<400> 933
000
<210> 934
<400> 934
000
<210> 935

<400> 935
000
<210> 936
<400> 936
000
<210> 937
<400> 937
000
<210> 938
<400> 938
000
<210> 939
<400> 939
000
<210> 940
<400> 940
000
<210> 941
<400> 941
000
<210> 942
<400> 942
000
<210> 943
<400> 943
000
<210> 944
<400> 944
000
<210> 945
<400> 945
000
<210> 946
<400> 946
000
<210> 947
<400> 947
000
<210> 948

<400> 948
000
<210> 949
<400> 949
000
<210> 950
<400> 950
000
<210> 951
<400> 951
000
<210> 952
<400> 952
000
<210> 953
<400> 953
000
<210> 954
<400> 954
000
<210> 955
<400> 955
000
<210> 956
<400> 956
000
<210> 957
<400> 957
000
<210> 958
<400> 958
000
<210> 959
<400> 959
000
<210> 960
<400> 960
000
<210> 961

<400> 961
000
<210> 962
<400> 962
000
<210> 963
<400> 963
000
<210> 964
<400> 964
000
<210> 965
<400> 965
000
<210> 966
<400> 966
000
<210> 967
<400> 967
000
<210> 968
<400> 968
000
<210> 969
<400> 969
000
<210> 970
<400> 970
000
<210> 971
<400> 971
000
<210> 972
<400> 972
000
<210> 973
<400> 973
000
<210> 974

<400> 974
000
<210> 975
<400> 975
000
<210> 976
<400> 976
000
<210> 977
<400> 977
000
<210> 978
<400> 978
000
<210> 979
<400> 979
000
<210> 980
<400> 980
000
<210> 981
<400> 981
000
<210> 982
<400> 982
000
<210> 983
<400> 983
000
<210> 984
<400> 984
000
<210> 985
<400> 985
000
<210> 986
<400> 986
000
<210> 987

<400> 987
000
<210> 988
<400> 988
000
<210> 989
<400> 989
000
<210> 990
<400> 990
000
<210> 991
<400> 991
000
<210> 992
<400> 992
000
<210> 993
<400> 993
000
<210> 994
<400> 994
000
<210> 995
<400> 995
000
<210> 996
<400> 996
000
<210> 997
<400> 997
000
<210> 998
<400> 998
000
<210> 999
<400> 999
000
<210> 1000

<400> 1000

000

<210> 1001

<211> 4607

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成

<400> 1001

ttggccaactc cctctctgcg cgctcgcgcg ctcactgagg cggggcgacc aaaggtcgcc	60
cgacgccccg gctttgcccc ggaggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg	120
gccaactcca tcaactagggg ttccatagatc ttgccaacat accataaacc tcccattctg	180
ctaatagcca gcctaagttg gggagaccac tccagattcc aagatgtaca gtttgctttg	240
ctgggccttt ttcccatgcc tgcctttact ctgccagagt tatattgctg gggttttgaa	300
gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag tagccctgca tttcaggttt	360
ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttctactg aaatcatggc ctcttgcca	420
agattgatag cttgtgcctg tccctgagtc ccagtcctac acgagcagct ggtttctaag	480
atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca gccccacaga gccccgcct	540
tgtccatcac tggcatctgg actccagcct gggttggggc aaagaggga atgagatcat	600
gtcctaacc tgatcctctt gtccccacaga tatccagaac cctgaccctg cggtccggt	660
gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtcccc agaagttggg gggagggtc	720
ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg	780
tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc	840
gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt	900
tcccgcgggc ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacg	960
cccctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag	1020
ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccttc gcctcgtgct tgagttgagg cctggccttg	1080
gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga	1140
taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga	1200
tagtcttgta aatgcggggc aagatgtgca cactgggtatt tcggtttttg gggccgcggg	1260
cggcgacggg gcccgtgcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg	1320
gccaccgaga atcgacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct	1380
cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc	1440
gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agtcaaaat ggaggacgcg	1500
gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct ttccgtcctc	1560
agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc tcgattagtt	1620
ctcgagcttt tggagtacgt cgtcttttagg ttggggggag gggttttatg cgatggagtt	1680
tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga tgtaattctc	1740
cttggaaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc agacagtggt	1800

tcaaagtttt	tttcttccat	ttcaggtgtc	gtgatgcggc	cgccaccatg	ggatcttgg	1860
cactgtgttg	cgtgtccctg	tgcattcctg	tggccaagca	cacagatgcc	ggcgtgatcc	1920
agtctcctag	acacgaagtg	accgagatgg	gccaagaagt	gaccctgcgc	tgcaagccta	1980
tcagcggcca	cgattacctg	ttctggtaga	gacagacat	gatgagaggc	ctggaactgc	2040
tgatctactt	caacaacaac	gtgcccacg	acgacagcgg	catgcccag	gatagattca	2100
gcgccaagat	gcccacgcc	agcttcagca	ccctgaagat	ccagcctagc	gagcccagag	2160
atagcgccgt	gtacttctgc	gccagcagaa	agacaggcgg	ctacagcaat	cagccccagc	2220
acttttgaga	tggcaccg	ctgagcatcc	tggaagatct	gaagaacgtg	ttcccacctg	2280
aggtggccgt	gttcgagcct	tctgaggccg	agatcagcca	cacacagaaa	gccacactcg	2340
tgtgtctggc	caccggcttc	tatcccgatc	acgtggaact	gtcttggtgg	gtcaacggca	2400
aagaggtgca	cagcggcgtc	agcaccgatc	ctcagcctct	gaaagagcag	cccgcctctga	2460
acgacagcag	atactgcctg	agcagcagac	tgagagtgtc	cgccaccttc	tggcagaacc	2520
ccagaaacca	cttcagatgc	caggtgcagt	tctacggcct	gagcgagaac	gatgagtgga	2580
cccaggatag	agccaagcct	gtgacacaga	tcgtgtctgc	cgaagcctgg	ggcagagccg	2640
attgtggctt	taccagcgag	agctaccagc	agggcgtgct	gtctgccaca	atcctgtacg	2700
agatcctgct	gggcaaagcc	actctgtacg	ccgtgctggt	gtctgccctg	gtgctgatgg	2760
ccatgggtcaa	gcggaaggat	agcagggg	gctccggtgc	cacaaacttc	tcctgtctca	2820
agcaggccgg	agatgtggaa	gagaaccctg	gccctatgga	aaccctgctg	aaggtgctga	2880
gcggcacact	gctgtggcag	ctgacatggg	tccgatctca	gcagcctgtg	cagtctcctc	2940
aggccgtgat	tctgagagaa	ggcgaggacg	ccgtgatcaa	ctgcagcagc	tctaaggccc	3000
tgtacagcgt	gcactggtag	agacagaagc	acggcgaggc	ccctgtgttc	ctgatgatcc	3060
tgctgaaagg	cggcgagcag	aaggggccacg	agaagatcag	cgccagcttc	aacgagaaga	3120
agcagcagtc	cagcctgtac	ctgacagcca	gccagctgag	ctacagcggc	acctactttt	3180
gtggcaccgc	ctggatcaac	gactacaagc	tgtctttcgg	agccggcacc	acagtgcag	3240
tgcgggcca	tattcagaac	cccgatcctg	ccgtgtacca	gctgagagac	agcaagagca	3300
gcgacaagag	cgtgtgcctg	ttcaccgact	tcgacagcca	gaccaacgtg	tcccagagca	3360
aggacagcga	cgtgtacatc	accgataaga	ctgtgctgga	catgcggagc	atggacttca	3420
agagcaacag	cgccgtggcc	tggccaaca	agagcgattt	cgccctgcgc	aacgccttca	3480
acaacagcat	tatccccgag	gacacattct	tcccaagtcc	tgagagcagc	tgcgacgtga	3540
agctgggtgga	aaagagcttc	gagacagaca	ccaacctgaa	cttcagaaac	ctgagcgtga	3600
tcggcttcag	aatcctgctg	ctcaaggtgg	ccggcttcaa	cctgctgatg	accctgagac	3660
tgtggtccag	ctaacctcga	ctgtgccttc	tagttgccag	ccatctgttg	tttgcccctc	3720
ccccgtgcct	tccttgacct	tgggaaggtg	cactcccact	gtcctttcct	aataaaatga	3780
ggaaattgca	tcgcattgtc	tgagtaggtg	tcattctatt	ctgggggggtg	gggtggggca	3840
ggacagcaag	ggggaggatt	gggaagacaa	tagcaggcat	gctgggggatg	cggtgggctc	3900
tatggcttct	gaggcgga	gaaccagctg	gggtcttagg	gggtatcccc	actagtcgtg	3960
taccagctga	gagactctaa	atccagtgc	aagtctgtct	gcctattcac	cgattttgat	4020
tctcaaaaca	atgtgtcaca	aagtaaggat	tctgatgtgt	atatcacaga	caaaactgtg	4080
ctagacatga	ggtctatgga	cttcaagagc	aacagtgtct	tggcctggag	caacaaatct	4140

gactttgcat	gtgcaaacgc	cttcaacaac	agcattattc	cagaagacac	cttcttcccc	4200
agcccaggta	agggcagctt	tggtgccttc	gcaggctggt	tccttgcttc	aggaatggcc	4260
aggttctgcc	cagagctctg	gtcaatgatg	tctaaaactc	ctctgattgg	tggtctcggc	4320
cttatccatt	gccaccaaaa	ccctcttttt	actaagaaac	agtgagcctt	gttctggcag	4380
tccagagaat	gacacgggaa	aaaagcagat	gaagagaagg	tggcaggaga	gggcacgtgg	4440
cccagcctca	gtctctagat	ctaggaaccc	ctagtgatgg	agttggccac	tcctctctctg	4500
cgcgctcgct	cgctcactga	ggccgcccgg	gcaaagcccc	ggcgtcgggc	gacctttggt	4560
cgcccggcct	cagtgagcga	gcgagcgcgc	agagagggag	tggccaa		4607

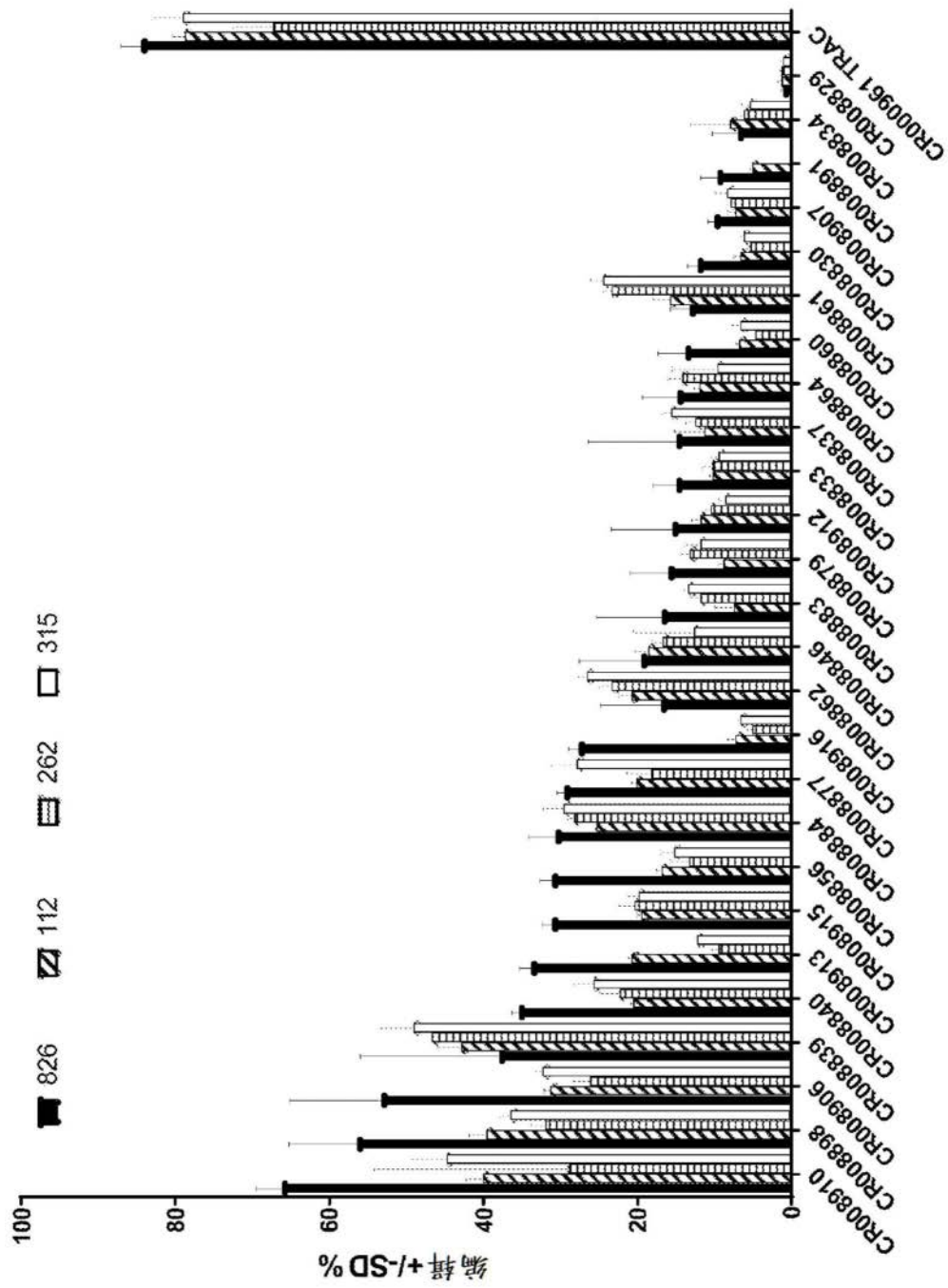


图1

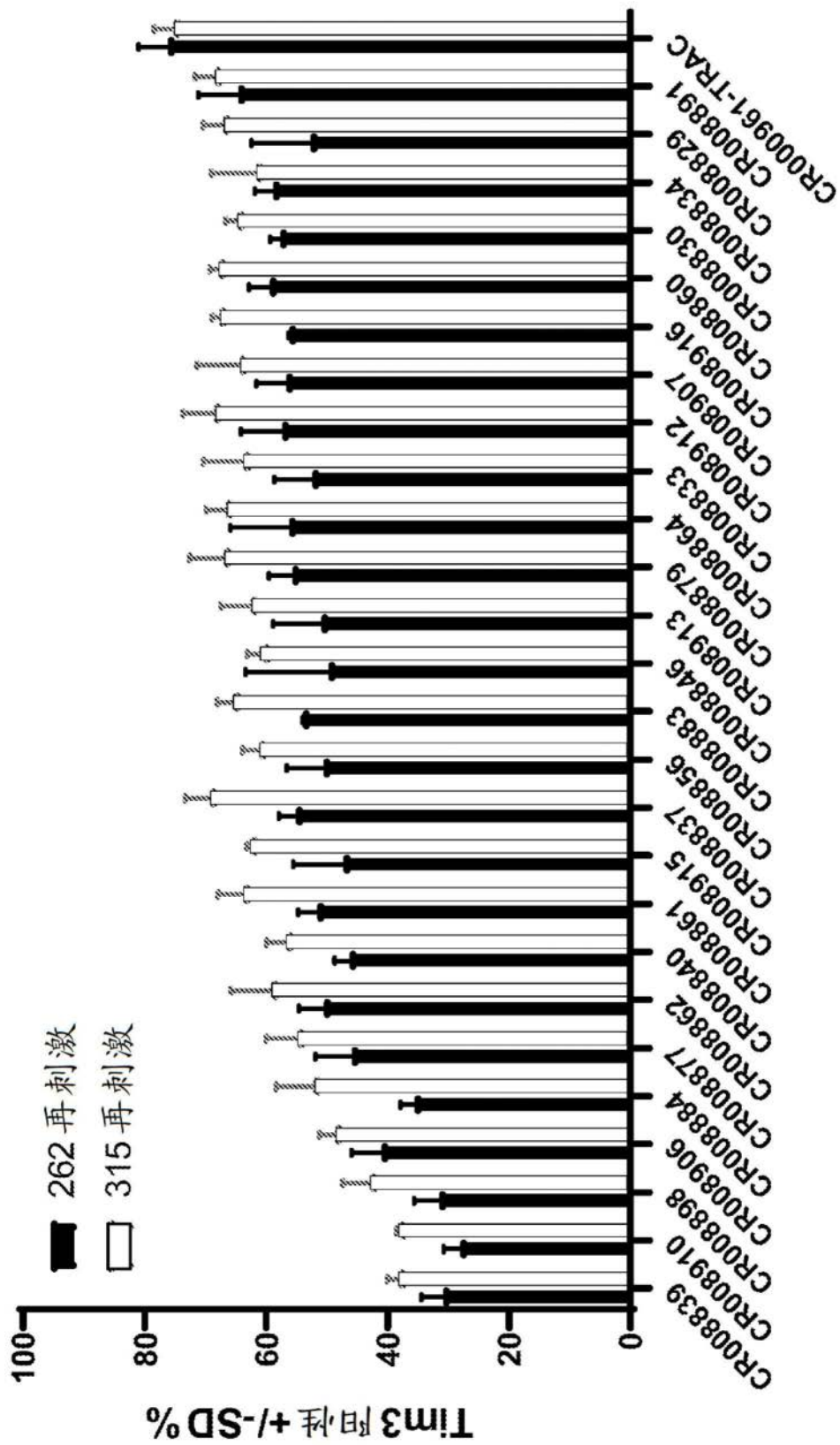


图2A

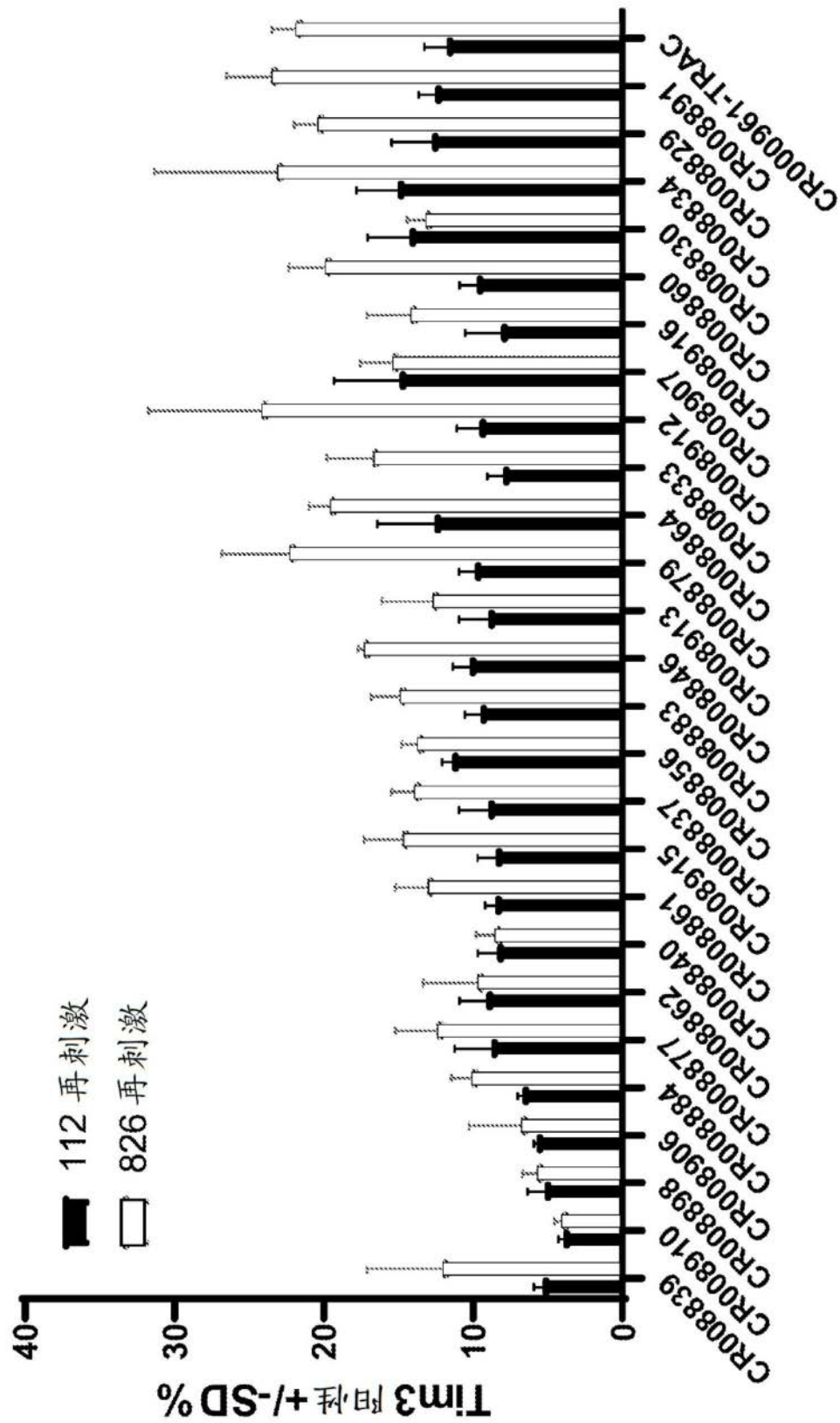


图2B

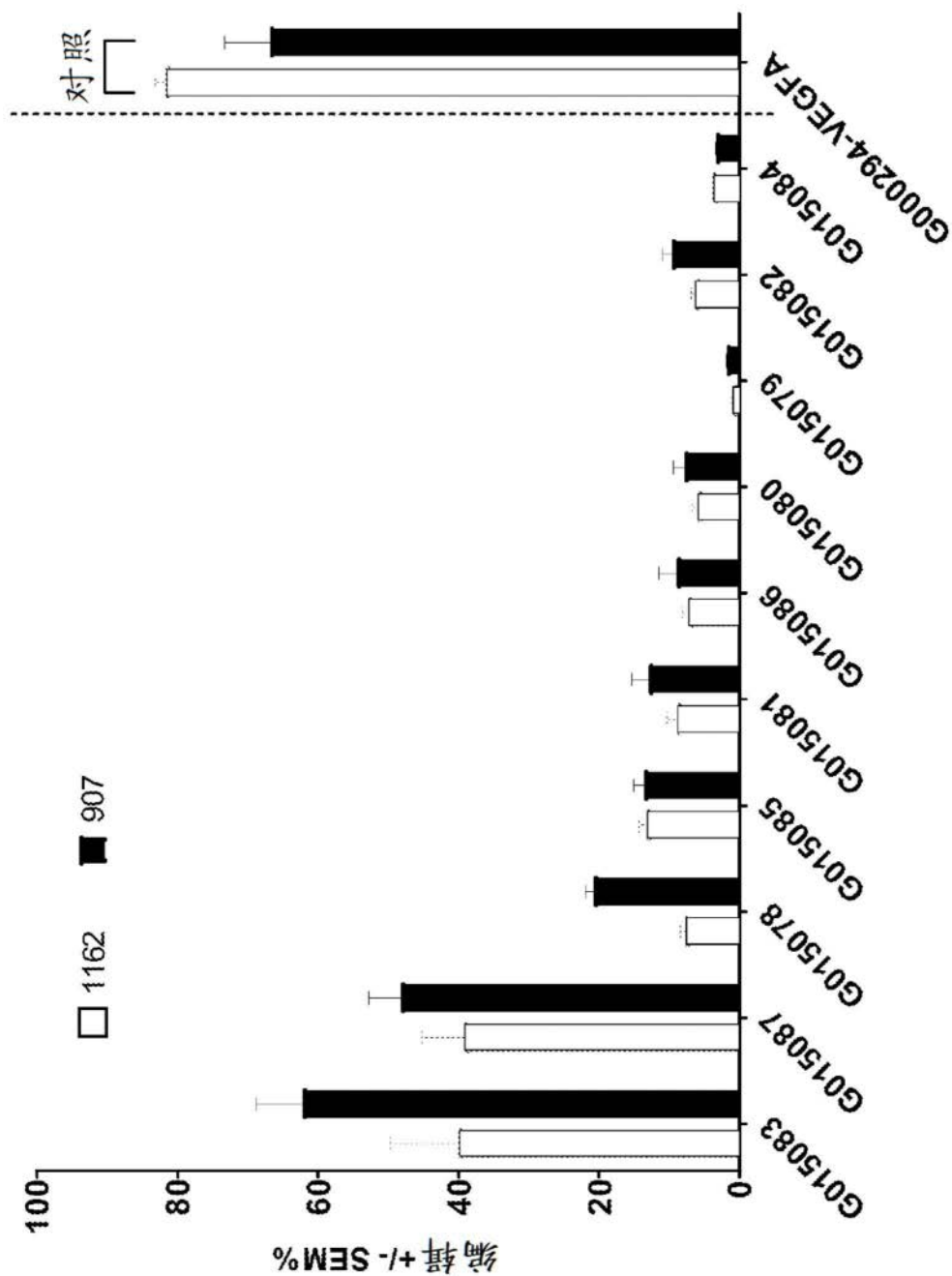


图3A

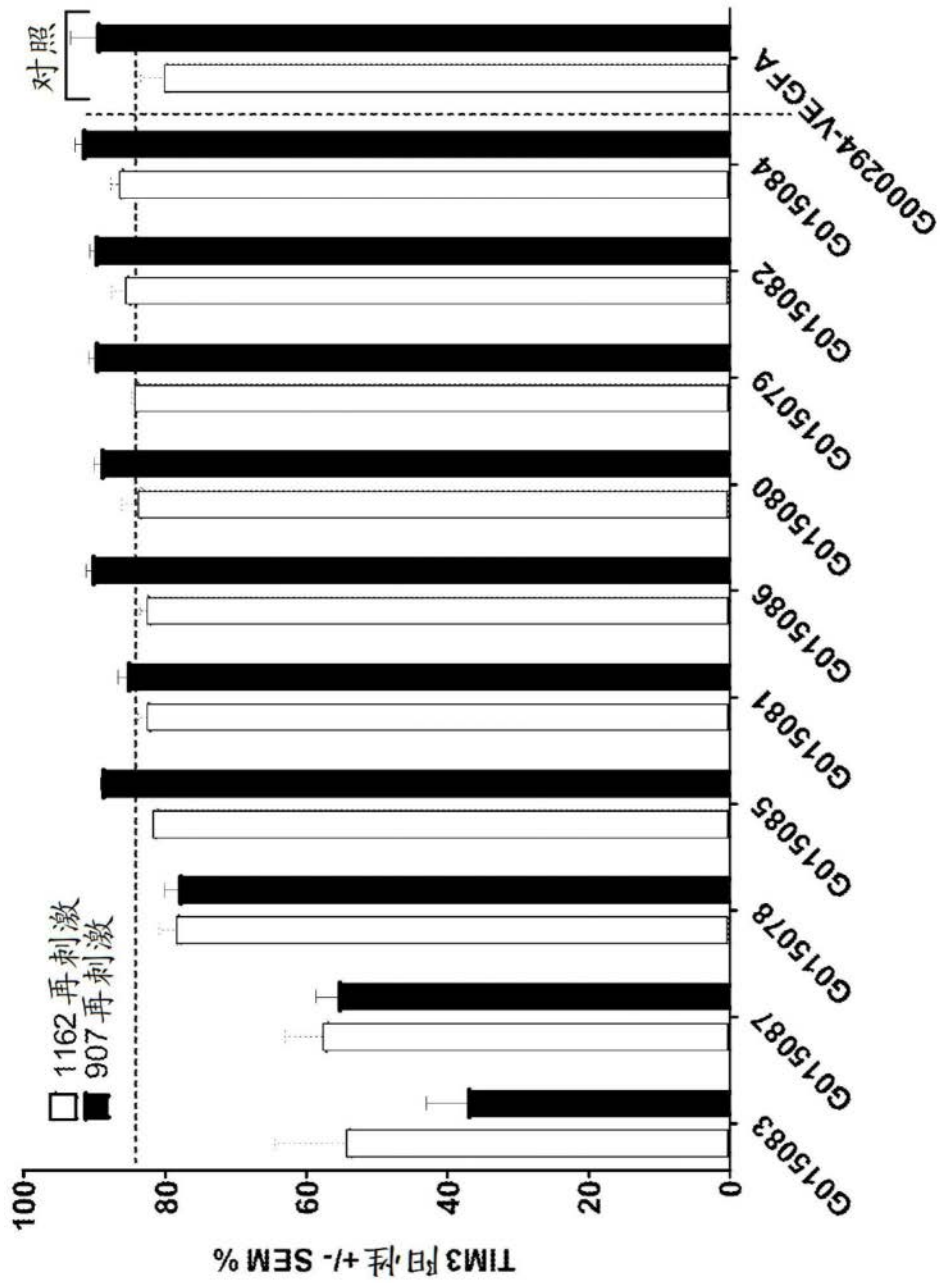


图3B

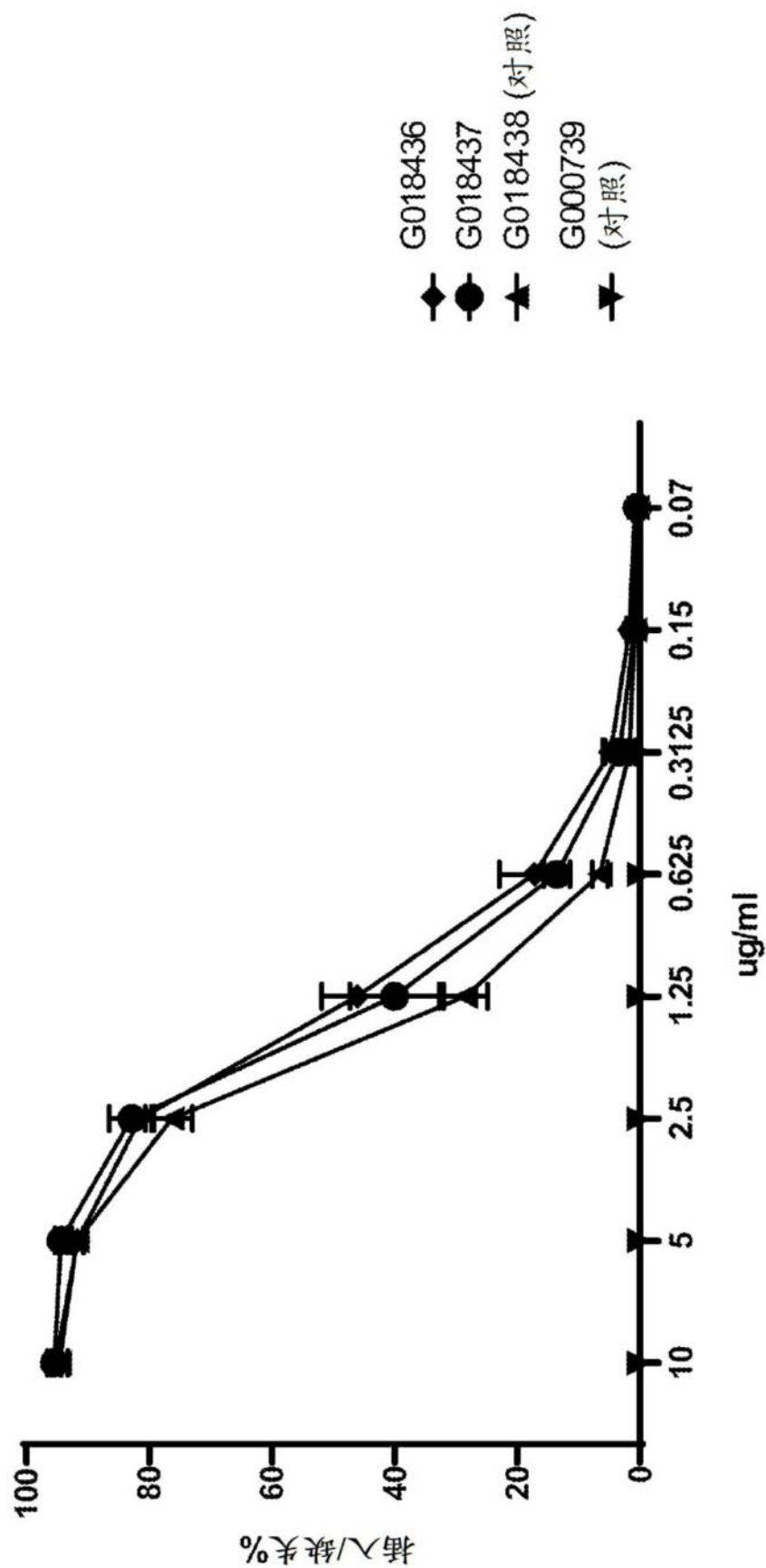


图4

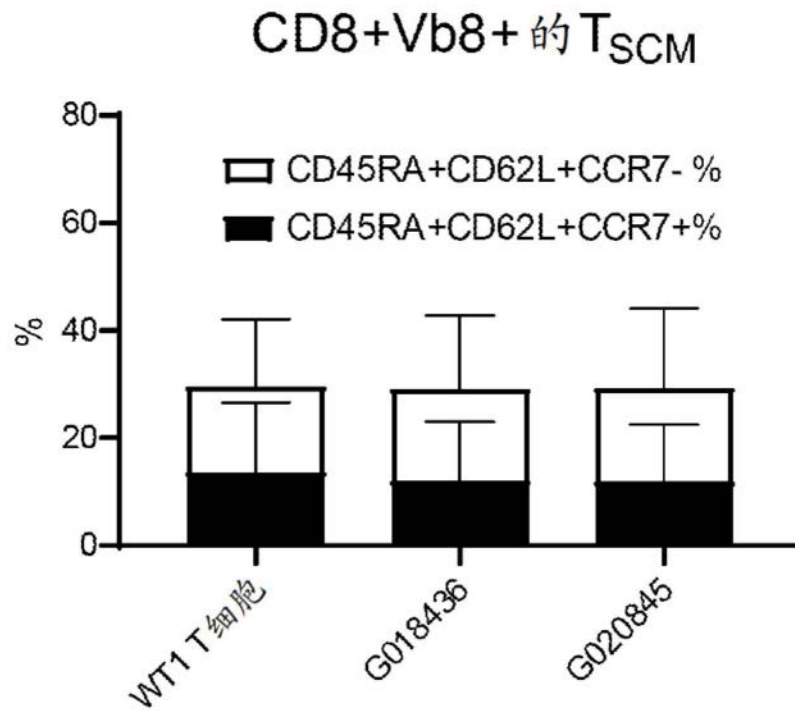


图5A

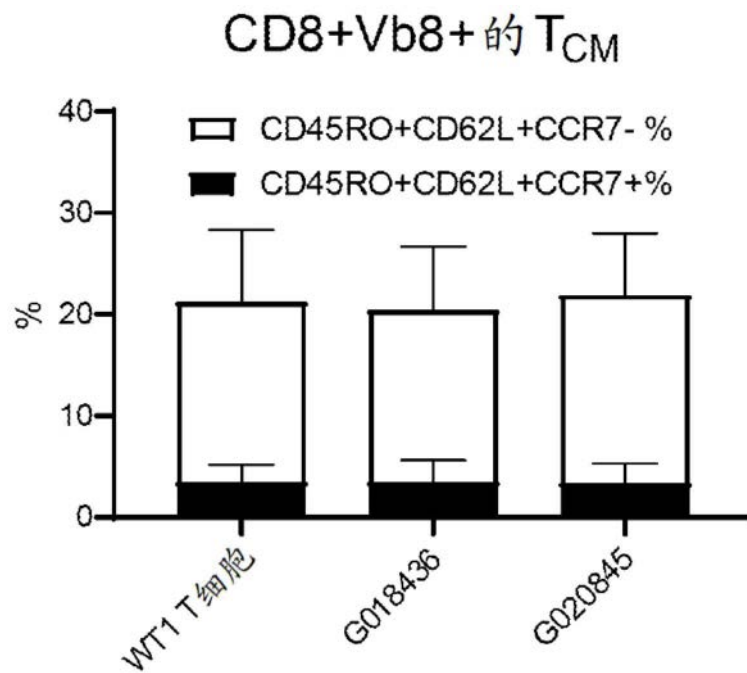


图5B

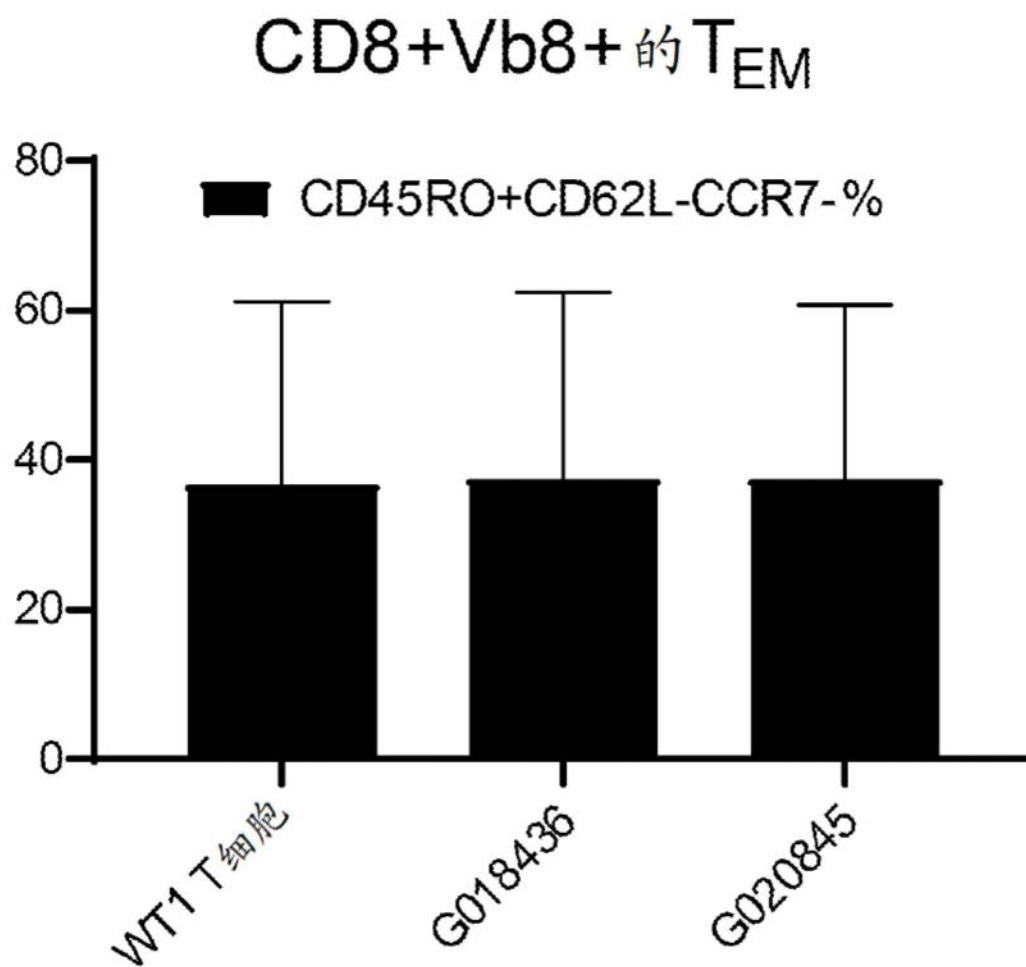


图5C

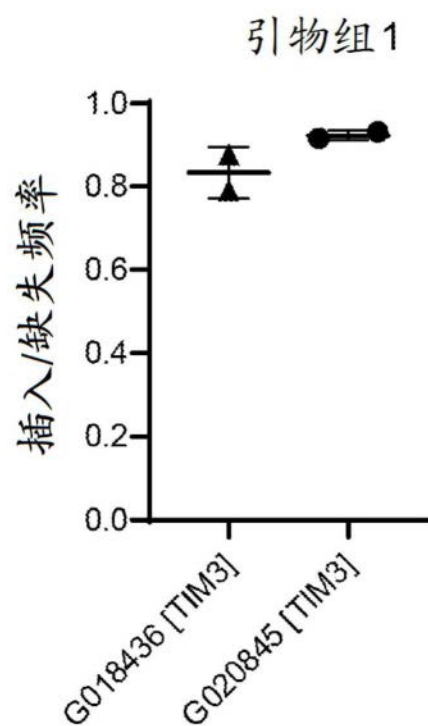


图6A

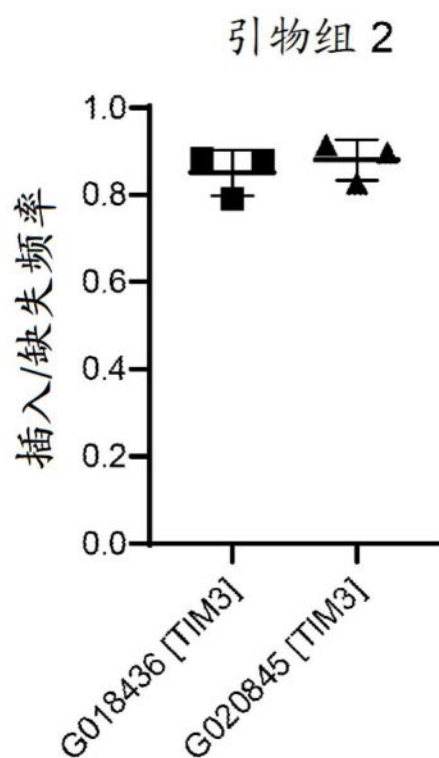


图6B

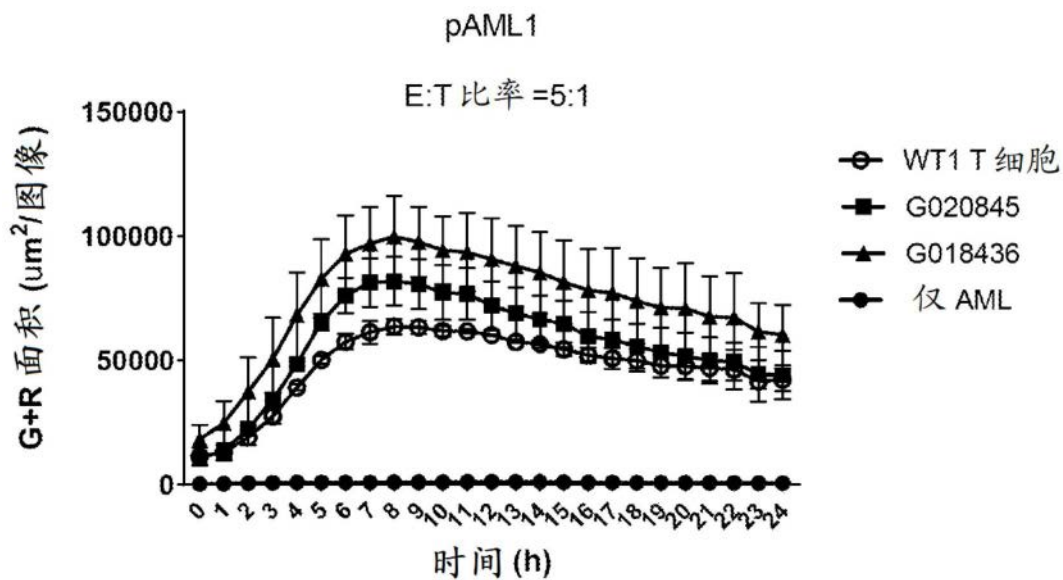


图7A

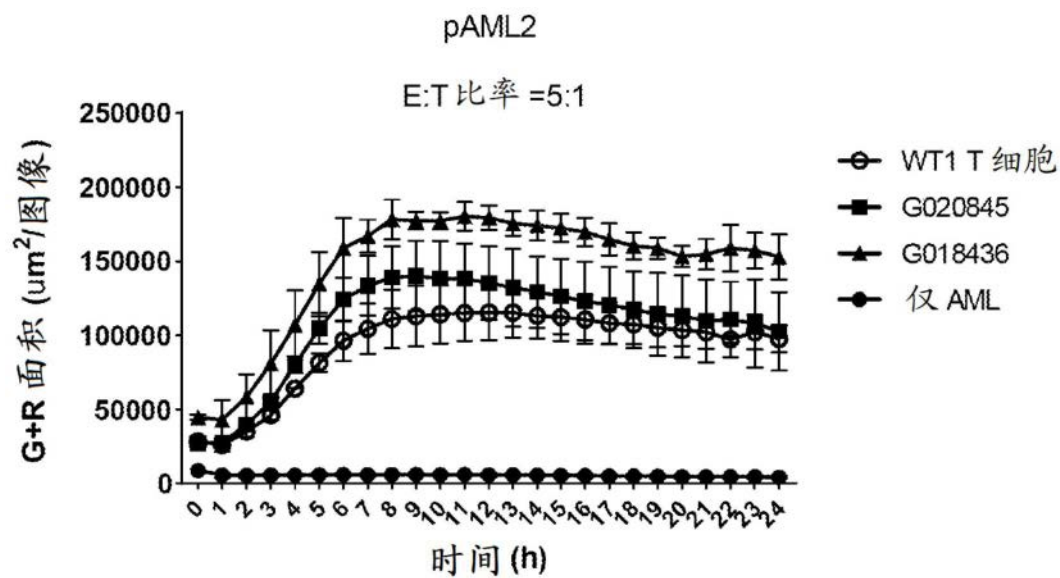


图7B

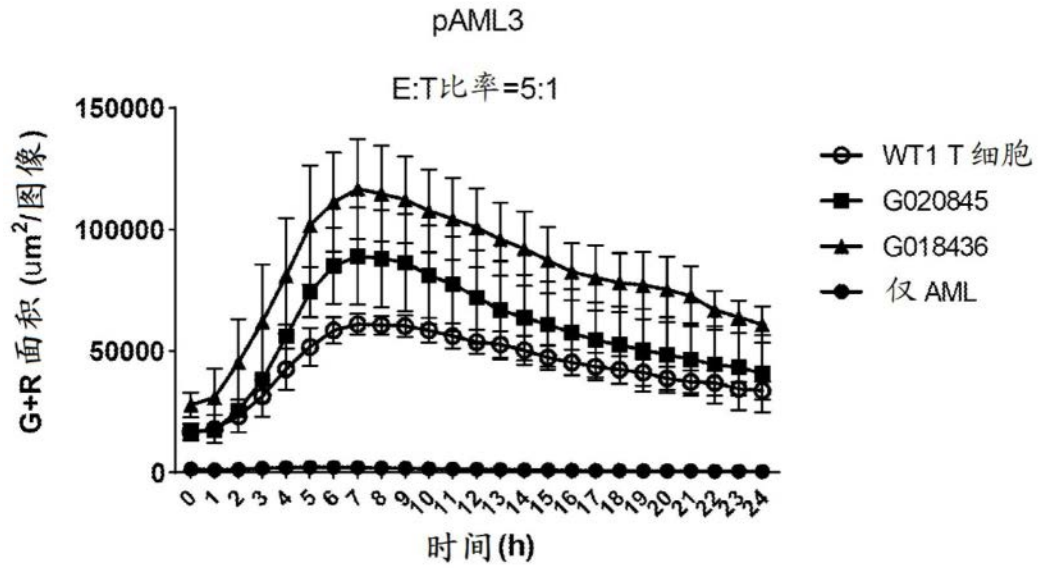


图7C

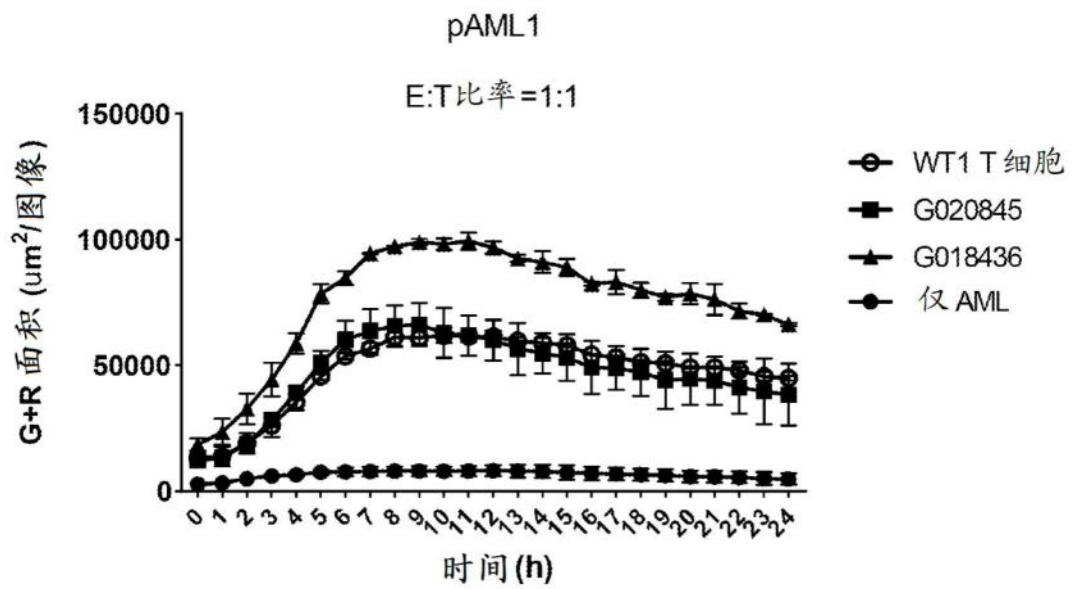


图7D

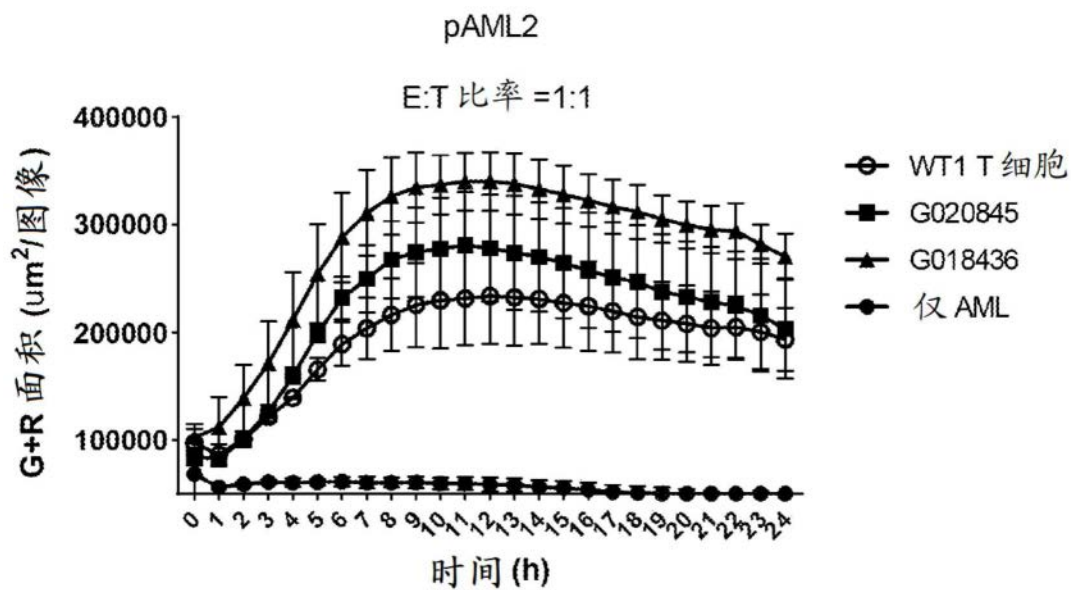


图7E

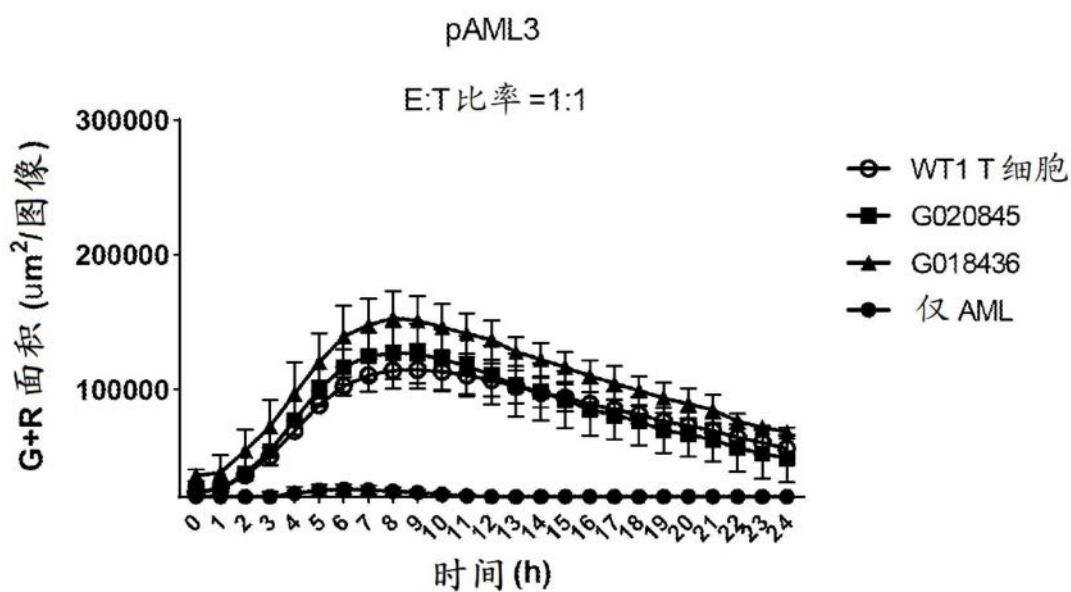


图7F

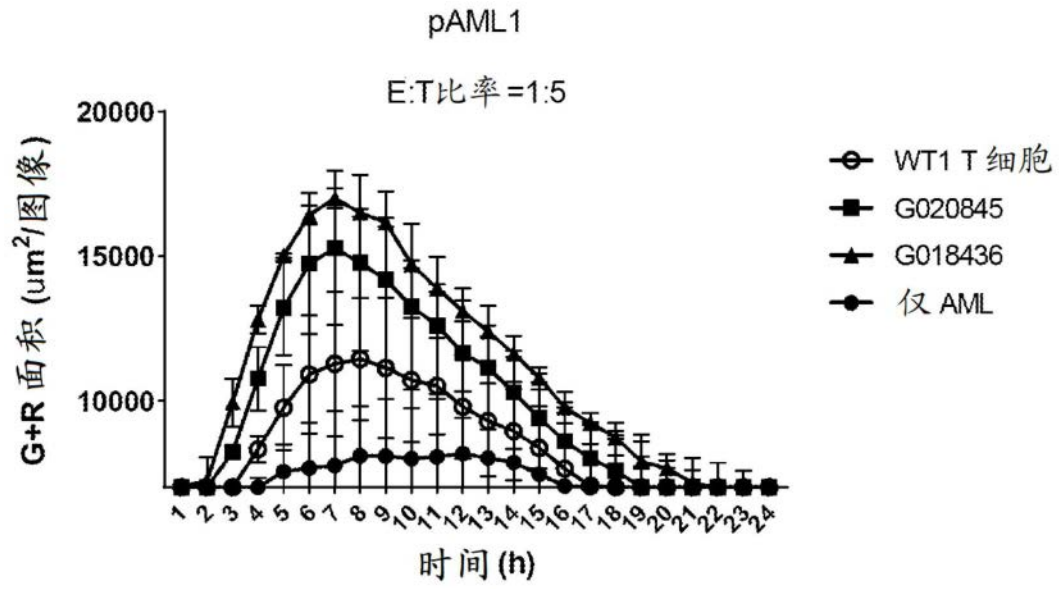


图7G

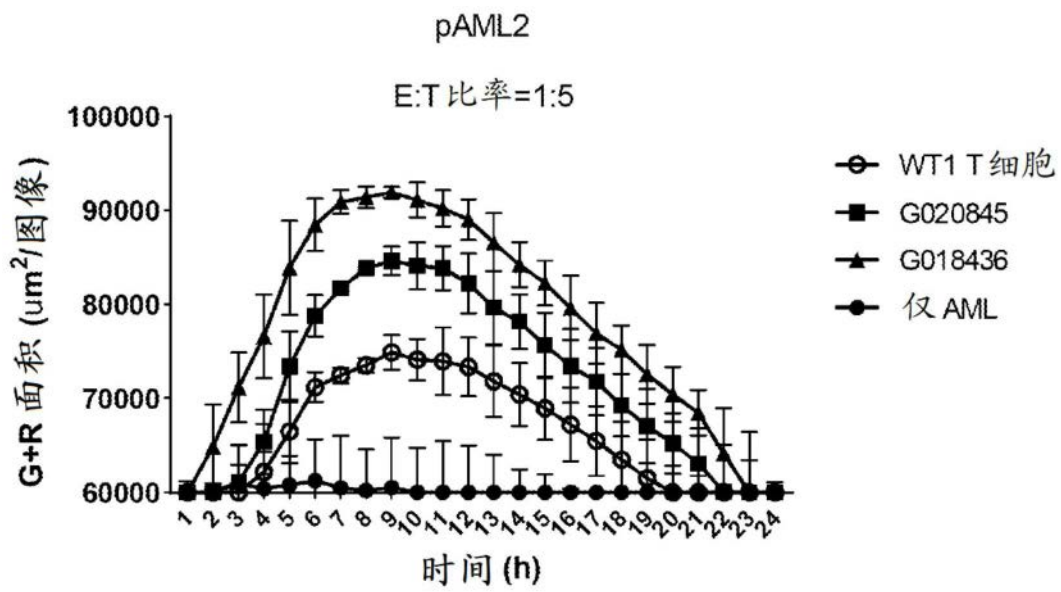


图7H

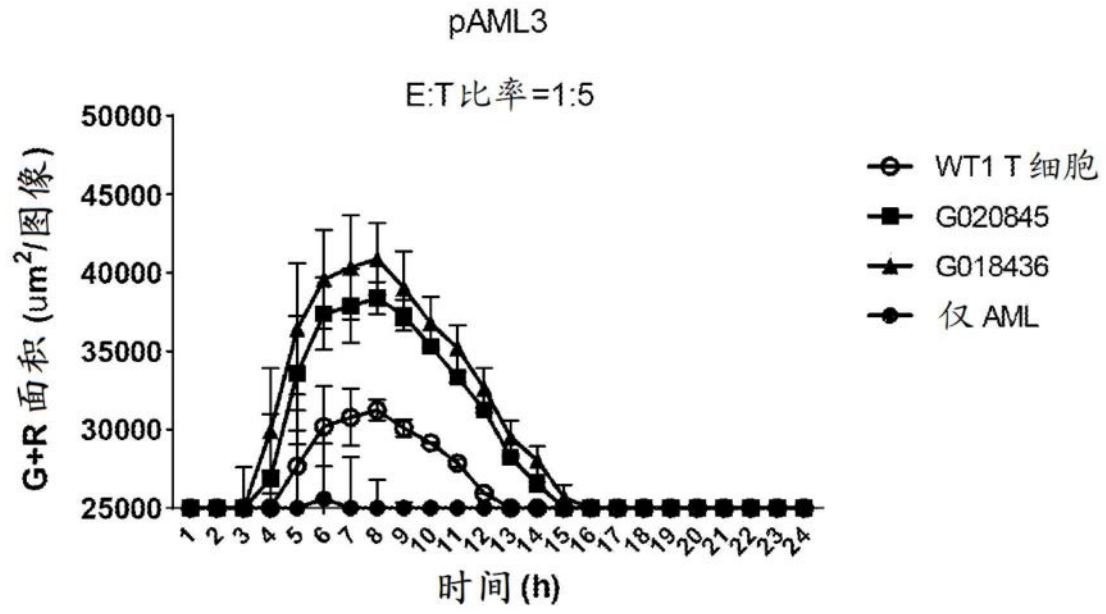


图7I