



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202035693 A

(43) 公開日：中華民國 109 (2020) 年 10 月 01 日

(21) 申請案號：108137354 (22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 10 月 16 日

(51) Int. Cl. : C12N15/113 (2010.01) C12N15/90 (2006.01)

(30) 優先權：2018/10/16 美國 62/746,522  
2018/10/17 美國 62/747,037

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

(72) 發明人：貝克 艾米 瑪麗莎 BECKER, AMY MELISSA (US)；高爾 蘇西 GOEL, SURBHI (IN)；海斯 莎拉 HESSE, SARAH (US)；陸斯特 特洛伊 艾倫 LUSTER, TROY AARON (US)；斯古特斯 博基 SCHULTES, BIRGIT (US)；雅辛斯基 史黛芬妮 A YAZINSKI, STEPHANIE A. (US)；維娜 普賈 VINAY, POOJA (IN)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：322 項 圖式數：33 共 496 頁

(54) 名稱

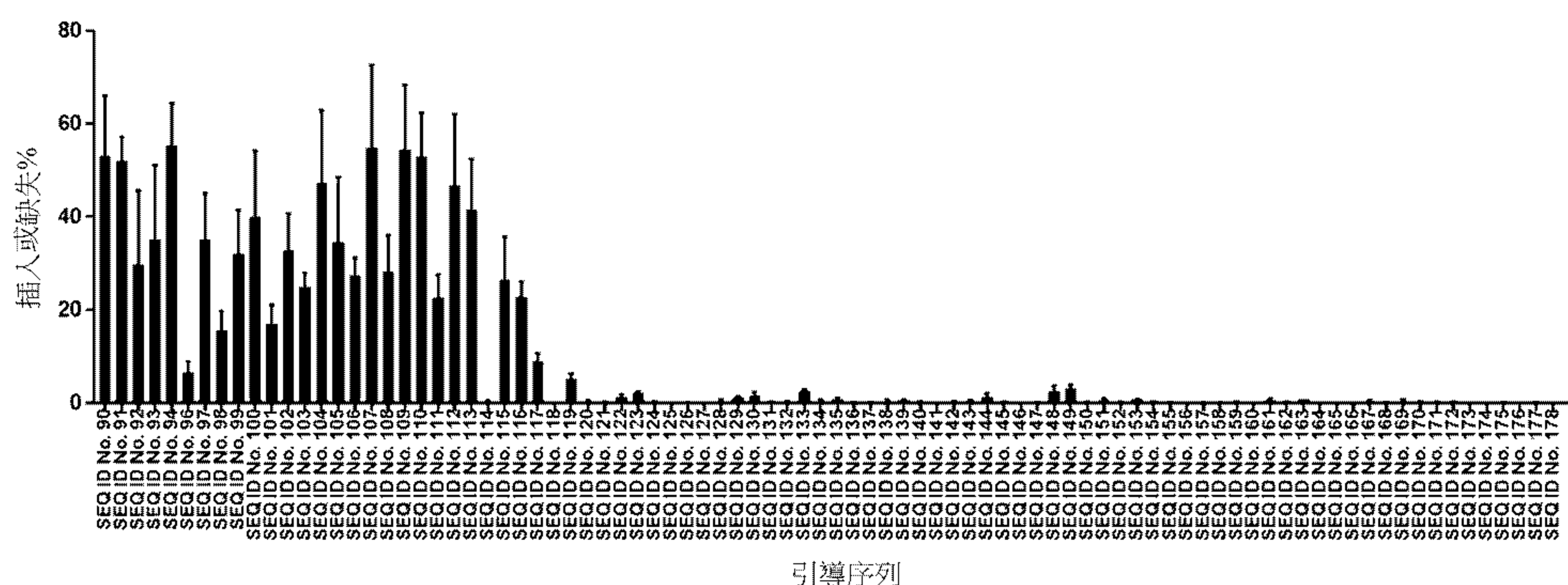
用於免疫療法之組合物及方法

(57) 摘要

本發明提供用於編輯，例如改變 TRBC1、TRBC2 及/或 TRAC 基因內之 DNA 序列的組合物及方法。本發明提供例如用於免疫療法之組合物及方法。

Compositions and methods for editing, e.g., altering a DNA sequence, within the TRBC1, TRBC2 and/or TRAC genes are provided. Compositions and methods for immunotherapy are provided, for example.

指定代表圖：



【圖1】



202035693

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

用於免疫療法之組合物及方法

### 【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR IMMUNOTHERAPY

### 【中文】

本發明提供用於編輯，例如改變TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之DNA序列的組合物及方法。本發明提供例如用於免疫療法之組合物及方法。

### 【英文】

Compositions and methods for editing, e.g., altering a DNA sequence, within the TRBC1, TRBC2 and/or TRAC genes are provided. Compositions and methods for immunotherapy are provided, for example.

### 【指定代表圖】

圖1

### 【代表圖之符號簡單說明】

無

# 【發明說明書】

## 【中文發明名稱】

用於免疫療法之組合物及方法

## 【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR IMMUNOTHERAPY

## 【技術領域】

【0001】 本發明係關於編輯，例如改變TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之DNA序列的組合物及方法。

## 【先前技術】

【0002】 CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat，成簇規律間隔短回文重複序列)在細菌中演變為適應性免疫系統以防禦病毒攻擊。在暴露於病毒時，病毒DNA之短區段整合至細菌基因組之CRISPR基因座中。RNA係經包括病毒序列之CRISPR基因座之一部分轉錄。含有與病毒基因組互補之序列的彼RNA介導Cas9蛋白質對病毒基因組中之序列之靶向。Cas9蛋白質裂解且藉此限制病毒標靶。

【0003】 近來，CRISPR/Cas系統已適於在真核細胞中進行基因組編輯。位點特異性單股斷裂(single strand break，SSB)或雙股斷裂(double strand break，DSB)之引入允許經由例如非同源末端接合(non-homologous end-joining，NHEJ)或同源定向修復(homology-directed repair，HDR)進行之目標序列改變。

【0004】 Eyquem等人 (2017) *Nature* 543(7643):113-117報導用CRISPR-Cas9系統將嵌合抗原受體(CAR)靶向TRAC基因之基因座會增強

腫瘤排斥反應。另外，此類靶向TRAC基因座避開補劑CAR信號傳導且在單次或重複暴露於抗原之後建立CAR之有效內化及重新表現，因此延緩效應T細胞分化及衰竭。然而，現有方法可產生小於所需對於既定目標之活性之T細胞(包括(但不限於)產生自TRAC基因座表現CAR之T細胞及可與CAR相互作用且為T細胞提供不合需要之反應性的內源性TRBC基因產物)。因此，需要經改良之用於免疫療法之組合物及方法。

**【0005】** 因此，提供以下實施例。在一些實施例中，本發明提供使用引導RNA與經RNA引導之DNA結合劑(諸如CRISPR/Cas系統)以顯著降低或剔除TRBC及/或TRAC基因之表現，由此顯著減少或去除T細胞受體(亦稱為TCR)之原生 $\alpha$ 及/或 $\beta$ 次單元之產生的組合物及方法。

#### **【發明內容】**

**【0006】** 本文所述之本發明係關於用於經工程改造之T細胞療法(例如免疫腫瘤學及用於降低自體免疫)之組合物及方法，例如在其基因組中之特異性目標序列經修飾之細胞，包括如藉由引入包括靶向該等目標序列之gRNA分子之CRISPR系統來修飾，及製造及使用其之方法。舉例而言，本發明係關於及提供適用於例如T細胞之細胞之基因組編輯及適用於免疫療法的gRNA分子、CRISPR系統、細胞及方法，該等T細胞係例如經工程改造以缺乏內源性T細胞受體表現之T細胞，例如適用於進一步工程改造以插入所關注編碼序列之T細胞，例如經進一步工程改造以表現T細胞受體之T細胞，諸如經修飾或突變型T細胞受體。

**【0007】** 在第一態樣中，本發明提供一種包括tracrRNA及crRNA之gRNA分子，其中該crRNA包括結合於T細胞之目標序列的靶向域。在一實施例中，靶向域與T細胞之目標序列互補。T細胞可為自體或同種異體T

細胞。T細胞可為CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及/或CD8<sup>+</sup> T細胞。

本發明如申請專利範圍中所提供，且下文闡述其他實施例。

**【0008】** 本發明提供一種改變TRBC1及/或TRBC2基因內之DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；或

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0009】** 本發明另外提供一種改變DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 包含關於SEQ ID NO：1-89及179-184之表1及/或3中之任一者中所列舉之基因組座標之15個連續核苷酸±10個核苷酸的序列；

ii. 來自(i)之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自(i)之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0010】** 本發明另外亦提供一種降低TRBC1及/或TRBC2基因之表現之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i) 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；或

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0011】** 本發明另外提供一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞及/或同種異體細胞投與組合物，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i) 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、

95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；或

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0012】** 本發明另外亦提供改變TRAC基因內之DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列；或

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0013】** 本發明另外提供一種降低TRAC基因之表現之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列；或

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0014】** 本發明另外亦提供一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞及/或同種異體細胞投與組合物，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列；或

(b) 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0015】** 本發明另外提供一種改變DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 包含關於SEQ ID NO：90-218之表2及/或3中之任一者中所列舉之基因組座標之15個連續核苷酸±10個核苷酸的序列；

ii. 來自(i)之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自(i)之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0016】** 本發明另外亦提供一種改變TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之DNA序列之方法，其包含向細胞遞送第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

i) 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；及

其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

i. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列。

**【0017】** 本發明另外亦提供一種降低TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現之方法，其包含向細胞遞送第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

i) 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；及

其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

i) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列。

**【0018】** 本發明另外提供一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞或同種異體細胞投與組合物，其中該組合物包含：第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

i) 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；及

其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

i. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列。

**【0019】** 不希望受理論所束縛，在本發明之上下文中，當較大比例之經工程改造/引入之TCR達至細胞表面時，在一些實施例中，使用雙TRAC/TRBC突變體，例如基因剔除突變體為有利的。

**【0020】** 在一些實施例中，經工程改造之細胞中外源性TCR之TRBC基因剔除與TRAC基因嵌入組合有利地使經工程改造之細胞中外源性TCR之活性更大。

**【0021】** 在一些實施例中，經工程改造之細胞中外源性TCR之TRBC基因剔除與TRAC基因嵌入組合有利地使經工程改造之細胞中外源性TCR之選擇性更大。

**【0022】** 另外，在一些實施例中，經工程改造之細胞中外源性TCR之TRBC基因剔除與TRAC基因敲入組合可有利地使細胞死亡更多，例如如藉由卡斯蛋白酶分析(caspase assay)所量測。

**【0023】** 在一些實施例中，經工程改造之細胞中外源性TCR之TRBC基因剔除與TRAC基因嵌入組合有利地例如響應於誘導肽(例如威爾姆斯氏腫瘤基因(WT1)抗原)使IFN- $\gamma$ 分泌更多。

**【0024】** 此外，在一些實施例中，對於TCR之雙TRAC/TRBC基因剔除有利地使例如CD4+細胞中之IFN- $\gamma$ 分泌更多。

**【0025】** 另外，有利的是，在一些實施例中，在經編輯細胞中干擾

素反應(IFN $\gamma$ 及/或TNF $\alpha$ )增加，其中插入之供體構築體之轉錄藉由TRAC之內源性啟動子促進。

【0026】此外，在一些實施例中，對於此等特定TCR之雙TRAC/TRBC基因剔除有利地使CD4+細胞中之IFN- $\gamma$ 分泌更多。不希望受理論束縛，在一些實施例中，在CD4+細胞中極少觀察到此類活性，其通常與HLA I類上所呈現之肽的反應性無緊密關聯。

【0027】另外，在一些實施例中，對於此等特定TCR之雙TRAC/TRBC基因剔除有利地使例如脫粒分析中CD4+細胞中之反應更大。此外，不希望受理論束縛，在一些實施例中，在CD4+細胞中極少觀察到此類活性，其通常與HLA I類上所呈現之肽的反應性無緊密關聯。

【0028】另外，在一些實施例中，例如當在混合之淋巴細胞反應物中測試時，雙TRAC/TRBC基因剔除突變體有利地比TRAC單一基因剔除突變體之同種異體反應性程度更小。

【0029】本發明另外提供一種經由在TRAC基因座之基因座內插入而表現異源免疫受體之方法，其包含向細胞遞送第一引導RNA、第二引導RNA，及經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

- i) 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；
- ii) 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
- iii) 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
- iv) 包含SEQ ID NO：1、2、3、5、6中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：2、3、5、6中任一者之引導序列；及

其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

i) 選自SEQ ID NO：90、95、97、98、185、214、218之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：90、95、97、98、185、214及218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：90、95、97、98、185、214及218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：90、95、97、185及214中任一者之引導序列；

v) 包含SEQ ID NO：90、95及185中任一者之引導序列；及

vi) 包含SEQ ID NO：90或214之引導序列。

**【0030】** 單裂解及/或編輯事件可使內源性TRAC基因發生「基因剔除」。作為另一優勢，若在編輯過程中引入或提供模板，則可將所關注外源性多肽插入至編輯事件之目標基因座中。此優勢尤其由使用具有以下之引導RNA產生：SEQ ID NO：90、95、97、185、203、204、205、206、210、211及/或214。此等引導RNA亦可與靶向TRBC基因之基因座的gRNA共同引入。

**【0031】** 第一引導RNA可包含SEQ ID NO：2之序列且第二引導RNA包含SEQ ID NO：90之序列。

**【0032】** 第一引導RNA可包含SEQ ID NO：180之序列且第二引導RNA可包含SEQ ID NO：186之序列。

【0033】 第一引導RNA可包含SEQ ID NO：1、2、3、5、6中任一者之序列，且第二引導RNA可包含SEQ ID NO：90之序列。

【0034】 第一引導RNA可包含SEQ ID NO：1、2、3、5、6中任一者之序列，且第二引導RNA可包含SEQ ID NO：214之序列。

【0035】 可基本上同一時間引入或投與第一引導RNA、第二引導RNA，及經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

【0036】 可同時改變TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之DNA序列。

【0037】 可引入或投與經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸作為修飾方法之一部分。

【0038】 該等方法可進一步包含：

(a) 誘導細胞及/或個體中TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之雙股斷裂(DSB)；或

(b) 誘導細胞及/或個體中TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之單股斷裂(SSB)；或

(c) 降低細胞及/或個體中TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現。

【0039】 該等方法可進一步包含引入編碼所關注多肽之核酸序列，視情況其中：

(a) 一或多種所關注多肽包含受體；

(b) 一或多種所關注多肽包含免疫受體；

(c) 一或多種所關注多肽包含T細胞受體，另外視情況，其中T細胞受體識別癌症抗原；

(d) 一或多種所關注多肽包含WT1特異性T細胞受體，其中T細胞受體識別WT1或其片段；

(e) 一或多種所關注多肽包含嵌合抗原受體，另外視情況，其中嵌合抗原受體識別癌症抗原；或

(f) 一或多種所關注多肽包含WT1特異性嵌合抗原受體，其中，嵌合抗原受體識別WT1或其片段。

**【0040】** 該等方法可進一步包含：

a. 引入TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈；

b. 引入一或多種編碼TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈之核酸序列；

c. 引入WT1特異性TCR  $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈；

d. 引入一或多種編碼WT1特異性TCR  $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈之核酸序列；

e. 引入選自以下之第一TCR序列：(i) SEQ ID NO：501或504；(ii) 與SEQ ID NO：501或504至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之胺基酸序列；及(iii) SEQ ID NO：501或504之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或250個胺基酸之連續子序列，

及

引入選自以下之第二TCR序列：(i) SEQ ID NO：502或505；(ii) 與SEQ ID NO：502或505至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之胺基酸序列；及(iii) SEQ ID NO：502或505之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或300個胺基酸之連續子序列，

f. 引入選自以下之第一TCR序列：(i) SEQ ID NO：501或513；(ii)

與SEQ ID NO：510或513至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之胺基酸序列；及(iii) SEQ ID NO：510或513之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或250個胺基酸之連續子序列，

及

引入選自以下之第二TCR序列：(i) SEQ ID NO：511或514；(ii)與SEQ ID NO：511或514至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之胺基酸序列；及(iii) SEQ ID NO：511或514之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或300個胺基酸之連續子序列，

g. 引入包含編碼(e)或(f)之第一TCR序列之序列的核酸序列；

h. 引入包含編碼(e)至(f)之第二TCR序列之序列的核酸序列；

i. 引入包含(g)及(h)之核酸序列之核酸序列；

j. 引入選自SEQ ID NO：500、503、506、509、512、515、518或521或與其至少99%、95%、90%一致之胺基酸序列之多肽，視情況藉由引入編碼其之核酸序列；或

k. 引入選自以下(i)至(viii)或與其至少99%、95%、90%一致之胺基酸序列之TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈多肽：

i) SEQ ID NO：501及SEQ ID NO：502；

ii) SEQ ID NO：504及SEQ ID NO:505；

iii) SEQ ID NO：507及SEQ ID NO:508；

iv) SEQ ID NO：510及SEQ ID NO:511；

v) SEQ ID NO：513及SEQ ID NO:514；

vi) SEQ ID NO : 516及SEQ ID NO:517 ;

vii) SEQ ID NO : 519及SEQ ID NO:520 ;

1. 引入編碼(k)之TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈多肽之核酸序列。

**【0041】** 第一核酸序列可側接與第一目標基因座同源之序列。第二核酸序列可側接與第二目標基因座同源之序列。側接序列之長度可為至少17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35或40個核苷酸。

**【0042】** 第一目標基因座可為TRAC、TRBC1或TRBC2基因，例如TRAC基因。第二目標基因座可為TRAC、TRBC1或TRBC2基因，例如TRBC1或TRBC2基因。

**【0043】** 引入之核酸序列或第一核酸序列及第二核酸序列可構成在無啟動子區的，亦即核酸可為「無啟動子的」。

**【0044】** 引入之核酸序列或第一核酸序列及第二核酸序列可操作地連接於啟動子，視情況其中，啟動子為EF-1 $\alpha$ 啟動子(SEQ ID NO : 603)。

**【0045】** 引入之核酸序列或第一核酸序列及第二核酸序列可經由載體、經由轉染、經由脂質奈米粒子或經由顯微注射引入。

**【0046】** 載體可為病毒載體，另外視情況，其中病毒載體為腺相關病毒載體。

**【0047】** 本發明亦提供一種TCR (諸如WT1特異性TCR)之基因座內插入方法，其包含向細胞遞送用於插入TCR之第一引導RNA，其包含選自以下之引導序列：SEQ ID NO : 90、95、97、98、185、214及218，及視情況(i)經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸；及/或(ii)編碼TCR (諸如WT1特異性TCR)之供體核酸分子。該方

法可進一步包含遞送包含選自SEQ ID NO：1-89之序列的第二引導RNA。該方法可進一步包含遞送包含選自SEQ ID NO：179-184之序列的第二引導RNA。

**【0048】** TCR可為WT1特異性TCR，其包含：

i) 選自SEQ ID NO：500、503、506、509、512、515、518或521或與其至少99%、95%、90%一致之胺基酸序列之多肽；或

ii) 選自以下(i)至(viii)或與其至少99%、95%、90%一致之胺基酸序列之TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈多肽：

i) SEQ ID NO：502及SEQ ID NO:503；

ii) SEQ ID NO：504及SEQ ID NO:505；

iii) SEQ ID NO：507及SEQ ID NO:508；

iv) SEQ ID NO：510及SEQ ID NO:511；

v) SEQ ID NO：513及SEQ ID NO:514；

vi) SEQ ID NO：516及SEQ ID NO:517；

vii) SEQ ID NO：519及SEQ ID NO:520；

viii) SEQ ID NO：522及SEQ ID NO:523。

**【0049】** 本發明亦提供一種組合物，其包含：

a. 引導RNA，其包含

i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；或

ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；或

iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；或

- iv. 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；或
- v. 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；及視情況
- b. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0050】** 組合物可用於改變細胞中TRBC1及/或TRBC2基因內之DNA序列。組合物可用於降低細胞中TRBC1及/或TRBC2基因之表現。組合物中之引導RNA可包含選自SEQ ID NO 196-200中任一者之序列。

**【0051】** 本發明亦提供一種組合物，其包含：

- a. 引導RNA，其包含
  - i. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；或
  - ii. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；或
  - iii. 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；或
  - iv. 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；或
  - v. 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列；及視情況
- b. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0052】** 組合物可用於改變細胞中TRAC基因內之DNA序列。組合物可用於降低細胞中TRAC基因之表現。引導RNA可選自SEQ ID NO 185-192及201-212中之任一者。

**【0053】** 本發明亦提供一種藉由本文所述之方法改變之細胞。細胞

可經離體改變。

【0054】 細胞可為T細胞。細胞可為CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及/或CD8<sup>+</sup> T細胞。細胞可為哺乳動物、靈長類動物或人類細胞。

【0055】 細胞可缺乏內源性T細胞受體。細胞可適用於製備表現非內源性T細胞受體之T細胞。細胞因此可用於製備表現CAR之T細胞。

【0056】 如本文所述經改變之細胞可為CD3<sup>-</sup>細胞。在改變之前，細胞可為CD3<sup>+</sup>細胞。

【0057】 細胞可另外包含一或多種編碼所關注多肽之核酸序列，視情況其中：

(a) 一或多種所關注多肽包含受體；

(b) 一或多種所關注多肽包含免疫受體；

(c) 一或多種所關注多肽包含T細胞受體，另外視情況，其中T細胞受體對WT1具有特異性；或

(d) 一或多種所關注多肽包含嵌合抗原受體，另外視情況，其中嵌合抗原受體對WT1具有特異性。

【0058】 細胞可另外包含一或多種編碼外源性T細胞受體之 $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈之核酸序列。細胞可另外包含一或多種編碼外源性T細胞受體之 $\gamma$ 及 $\delta$ 鏈之核酸序列。

【0059】 一或多種編碼本文所述細胞之外源性T細胞受體之 $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈之核酸序列可於基因組之TRAC基因座中。一或多種編碼本文所述細胞之外源性T細胞受體之 $\gamma$ 及 $\delta$ 鏈之核酸序列可於基因組之TRAC基因座中。

【0060】 TCR  $\alpha$ 鏈之序列可選自：(i) SEQ ID NO：501或504；(ii) 與SEQ ID NO：501或504至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或

60%一致之序列；及SEQ ID NO：501或504之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或250個胺基酸之連續子序列；及

TCR  $\beta$ 鏈之序列可選自：(i) SEQ ID NO：502或505；(ii)與SEQ ID NO：502或505至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之序列；及SEQ ID NO：502或505之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或300個胺基酸之連續子序列。

**【0061】** 細胞之TCR  $\alpha$ 鏈可由根據SEQ ID NO：500、501、503及504中任一者之核酸序列編碼，且 $\beta$  TCR鏈根據SEQ ID NO：500、502、503及505中之任一者編碼。

**【0062】** TCR  $\alpha$ 鏈之序列可選自：(i) SEQ ID NO：513；(ii)與SEQ ID NO：513至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之序列；及SEQ ID NO：513之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、500、600、700或800個胺基酸之連續子序列；及

其中TCR  $\beta$ 鏈之序列係選自：(i) SEQ ID NO:514；(ii)與SEQ ID NO：514至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之序列；及SEQ ID NO：514之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、500、600、700或800個胺基酸之連續子序列。

**【0063】**  $\alpha$  TCR鏈可為SEQ ID NO：513且 $\beta$  TCR鏈可為SEQ ID NO：514。

**【0064】** 本文所揭示之細胞之一或多種基因可由內源性啟動子表現。

【0065】 本文所揭示之細胞之一或多種基因可由異源啟動子表現，視情況其中異源啟動子為EF-1 $\alpha$ 啟動子。

【0066】 經改變之細胞可包含編碼外源性T細胞受體之 $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈之基因及/或編碼外源性T細胞受體之 $\gamma$ 及 $\delta$ 鏈之基因。適合之 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 及 $\delta$ 鏈在所屬技術領域中已知。參見例如WO2018/197492。

【0067】 外源性T細胞受體之 $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈可於基因組之TRAC基因座中。外源性T細胞受體之 $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈提供於轉錄物內，藉由P2A或其他裂解序列隔開。

【0068】 本發明亦提供一種包含本文所揭示者之細胞群體，其中經改變之群體之大於約50%、大於約55%、大於約60%、大於約65%、大於約70%、大於約75%、大於約80%、大於約85%、大於約90%、大於約95%、大於約98%或大於約99%為CD3<sup>+</sup>細胞。

【0069】 本發明亦提供一種包含本文所揭示者之細胞群體，其中群體之大於約50%、大於約55%、大於約60%、大於約65%、大於約70%、大於約75%、大於約80%、大於約85%、大於約90%、大於約95%、大於約98%或大於約99%缺乏內源性T細胞受體。

【0070】 本發明亦提供一種包含本文所揭示者之細胞群體，其中在群體中TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現相對於未經改變之相同細胞群體已降低至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約98%或至少約99%。

【0071】 表現降低可對於TRBC1基因。表現降低可對於TRBC2基因。表現降低可對於TRAC基因。

【0072】 細胞群體之10%與100%之間，例如群體之30%與99%之間可在TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中具有插入或缺失。

【0073】 此外，群體之30%與35%之間、35%與40%之間、40%與45%之間、45%與50%之間、50%與55%之間、55%與60%之間、60%與65%之間、65%與70%之間、70%與75%之間、75%與80%之間、80%與85%之間、85%與90%之間、90%與95%之間，或95%與99%之間可在TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中具有插入或缺失。

【0074】 插入或缺失或插入可於TRBC1基因中。插入或缺失或插入可於TRBC2基因中。插入或缺失或插入可於TRAC基因中。

【0075】 本文所述之方法或供使用之組合物可讓TRBC1及/或TRBC2基因發生編輯。本文所述之方法或供使用之組合物可讓TRAC基因發生編輯。本文所述之方法或供使用之組合物可讓TRBC基因及TRAC基因發生編輯。

【0076】 編輯可計算為經編輯之群體之百分比(編輯百分比或插入或缺失百分比)。編輯百分比可在群體之30%與35%、35%與40%、40%與45%、45%與50%、50%與55%、55%與60%、60%與65%、65%與70%、70%與75%、75%與80%、80%與85%、85%與90%之間、90%與95%或95%與99%之間。

【0077】 本文所述之組合物可包含sgRNA，其包含：

(e) SEQ ID NO：179-184及196-200中之任一者；或

(f) 選自SEQ ID NO：1-89中任一者之引導序列；或

(g) 選自SEQ ID NO：1-24之引導序列；或

(h) 選自SEQ ID NO：1-6之引導序列。

**【0078】** 本文所述之組合物可包含sgRNA，其包含：

(i) SEQ ID NO：186-192及201-212中之任一者；或

(j) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218中任一者之引導序列；

或

(k) 選自SEQ ID NO：90-113及213-218之引導序列；或

(l) 選自SEQ ID NO：90-95之引導序列。

**【0079】** 目標序列可於TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子1、2、3或4中。目標序列可於人類TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中。

**【0080】** 目標序列可於TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子1中。目標序列可於TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子2中。目標序列可於TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子3中。目標序列可於TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子4中。

**【0081】** 目標序列可與TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之正股中之目標序列互補。目標序列可與TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之負股中之目標序列互補。

**【0082】** 第一引導序列可與TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之正股中之第一目標序列互補，且其中該組合物進一步包含第二引導序列，其與TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之負股中之第二目標序列互補。

**【0083】** 引導RNA可包含選自SEQ ID NO 1-178中任一者之引導序列，且進一步包含SEQ ID NO：400之核苷酸序列，其中SEQ ID NO：400之核苷酸位於引導序列之3'端之後。

**【0084】** 引導RNA可包含選自SEQ ID NO 1-178中任一者之引導序列且進一步包含SEQ ID NO：401之核苷酸序列，其中SEQ ID NO：401

之核苷酸位於引導序列之3'端之後。

**【0085】** 引導RNA可根據SEQ ID NO：300之模式修飾，其中N集體為SEQ ID NO 1-89之引導序列中之任一者。SEQ ID NO：300中各N可為任何天然或非天然核苷酸，其中N形成引導序列，且引導序列使Cas9靶向TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因。

**【0086】** 第一引導RNA可包含SEQ ID NO：2之序列且第二引導RNA可包含SEQ ID NO：90之序列。

**【0087】** 前述方法中之任一者可進一步包含：

(a) 引入包含選自以下之核酸序列的第一核酸序列：(i) SEQ ID NO：250；(ii)與SEQ ID NO：250至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之核酸序列；及(iii) SEQ ID NO：250之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、500、600、700或800個核苷酸之連續子序列，

及

引入包含選自以下之核酸序列的第二核酸序列：(i) SEQ ID NO：252；(ii)與SEQ ID NO：252至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之核酸序列；及(iii) SEQ ID NO：252之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、500、600、700、800或900個核苷酸之連續子序列，

(b) 引入包含選自以下之核酸序列的第一核酸序列：(i) SEQ ID NO：513；(ii)與SEQ ID NO：513至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之核酸序列；及(iii) SEQ ID NO：513之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、

500、600、700或800個核苷酸之連續子序列，

及

引入包含選自以下之核酸序列的第二核酸序列：(i) SEQ ID NO：514；(ii)與SEQ ID NO：514至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之核酸序列；及(iii) SEQ ID NO：514之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、500、600、700、800或900個核苷酸之連續子序列，

(c) 引入包含(a)之第一核酸序列及(a)之第二核酸序列的核酸序列；

或

(d) 引入包含(b)之第一核酸序列及(b)之第二核酸序列的核酸序列。

**【0088】** sgRNA可包含與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列。

**【0089】** 引導RNA可以化學方式合成。引導RNA可包含於RNP中。模板核酸可包含於病毒載體中。模板核酸可包含於非病毒遞送構築體中。適合之病毒載體在所屬技術領域中已知，例如反轉錄病毒、腺病毒、慢病毒、腺相關病毒及其雜合體。病毒載體可為慢病毒(LV)載體或腺相關病毒(AAV)載體。

**【0090】** 引導RNA可視情況包含以下修飾中之一或多者：

- i) 2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾之核苷酸。
- ii) 核苷酸之間的硫代磷酸酯(PS)鍵。
- iii) 2'-氟(2'-F)修飾之核苷酸。
- iv) 引導RNA之5'端之前五個核苷酸中之一或多者處之修飾。

- v) 引導RNA之3'端之後五個核苷酸中之一或多者處之修飾。
- vi) 引導RNA之5'端處之前四個核苷酸之間的PS鍵。
- vii) 引導RNA之3'端處之後四個核苷酸之間的PS鍵。
- viii) 引導RNA之5'端之前三個核苷酸處之2'-O-Me修飾之核苷酸。
- ix) 引導RNA之3'端之後三個核苷酸處之2'-O-Me修飾之核苷酸。

**【0091】** 引導RNA可包含具有如上文所闡述之修飾的SEQ ID NO：300之核苷酸。

**【0092】** 組合物可進一步包含醫藥學上可接受之賦形劑。

**【0093】** LNP可包含生物可降解之可電離脂質，例如可電離脂質為十八-9,12-二烯酸(9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯，亦稱為(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯酸3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯。

**【0094】** LNP可包含中性脂質，例如中性脂質為DSPC。

**【0095】** LNP可包含輔助脂質，例如輔助脂質為膽固醇。

**【0096】** LNP可包含隱形脂質，例如隱形脂質為PEG2k-DMG。

**【0097】** 組合物可進一步包含經RNA引導之DNA結合劑。引導RNA及經RNA引導之DNA結合劑組合物可包含於核糖核蛋白(RNP)中。

**【0098】** 組合物可包含經RNA引導之DNA結合劑，例如Cas9，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之mRNA，例如經RNA引導之DNA結合劑可由Cas9編碼或為Cas9蛋白質。

**【0099】** 組合物可為醫藥調配物且進一步包含醫藥學上可接受之載劑。

【0100】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞用於製備藥劑之用途。

【0101】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞用於治療癌症之用途。

【0102】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞用於個體之免疫療法之用途。

【0103】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞用於治療過度表現威爾姆斯氏腫瘤抗原(WT1)之腫瘤之用途。

【0104】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療疾病或病症。

【0105】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於免疫療法中。

【0106】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療癌症。

【0107】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療過度表現威爾姆斯氏腫瘤抗原(WT1)之腫瘤。

【0108】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療人類或動物之方法，該方法包含投與如本文所述之組合物、調配物、群體或細胞。

【0109】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療人類或動物之癌症之方法，該方法包含投與如本文所述之組合物、調配物、群體或細胞。

【0110】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，

其係用於人類或動物之免疫治療方法，該方法包含投與如本文所述之組合物、調配物、群體或細胞。

**【0111】** 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療人類或動物之過度表現威爾姆斯氏腫瘤抗原(WT1)之腫瘤之方法，該方法包含投與如本文所述之組合物、調配物、群體或細胞。

**【0112】** 引導RNA可具有選自SEQ ID NO：1-89中之任一者之序列。

**【0113】** 引導RNA可具有選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218中任一者之序列。

**【0114】** 亦揭示其中引導序列係選自在改變之產物中分別產生頻率為20%或更大、30%或更大、40%或更大、或50%或更大之插入或缺失的引導序列群組之實施例。

**【0115】** 亦揭示其中引導序列係選自在改變之產物中分別產生頻率為20%或更大、30%或更大、40%或更大、或50%或更大之供體核酸分子插入的引導序列群組之實施例。

**【0116】** 亦揭示任一前述實施例之組合物、調配物、群體或細胞之用途，其係用於製備用於治療個體之藥劑。個體可為人類或動物(例如人類；食蟹獼猴)。在一些實施例中，個體為人類。

**【0117】** 亦揭示前述組合物或調配物中之任一者，其係用於治療或用於修飾TRBC1、TRBC2及TRAC基因中之任何一或多者(例如在其中形成插入或缺失或在其中形成閱讀框轉移或無意義突變)。

**【0118】** 在前述細胞態樣及實施例中之任一者中，已改變包括與第一gRNA分子之靶向域互補之目標序列之基因及視情況選用之包括與第二

gRNA分子之靶向域互補之目標序列之基因及/或包括與第三gRNA分子之靶向域互補之目標序列之基因，以使得降低或去除包括與第一gRNA分子之靶向域互補之目標序列的基因及視情況選用之包括與第二gRNA分子之靶向域互補之目標序列的基因之功能產物、及/或包括與第三gRNA分子之靶向域互補之目標序列的基因之功能產物之表現。

**【0119】** 在另一態樣中，本發明提供一種提供個體之免疫治療方法，該方法包括向個體投與有效量之如本文所述之細胞，例如前述細胞態樣及實施例中任一者之細胞。

**【0120】** 在該等方法之實施例中，該方法包括在向個體投與有效量之如本文所述細胞，例如前述細胞態樣及實施例中任一者之細胞之前，投與淋巴球耗乏劑或免疫抑制劑。在另一態樣中，本發明提供一種製備細胞(例如細胞群體)之方法。

**【0121】** 免疫療法為藉由活化或抑止免疫反應進行之疾病治療。經設計以引發或擴增免疫反應之免疫療法歸類為活化免疫療法。已表明基於細胞之免疫療法對於治療一些癌症有效。諸如淋巴球、巨噬細胞、樹突狀細胞、自然殺手細胞(NK細胞)及/或細胞毒性T淋巴球(CTL)之免疫效應細胞可經計劃化以響應於腫瘤細胞之表面上所表現之異常抗原起作用。因此，癌症免疫療法允許免疫系統之組分破壞腫瘤或其他癌細胞。

**【0122】** 在另一態樣中，本發明提供一種製備用於免疫療法之細胞(例如細胞群體)之方法，該方法包括：**(a)**藉由降低或去除T細胞受體(TCR)之一或多個或所有組分之表現，例如藉由向該等細胞中引入一gRNA分子(如本文所述)或如本文所揭示之多於一個gRNA分子來修飾細胞；及**(b)**使該等細胞擴增。本發明細胞適用於例如藉由引入編碼介導

TCR/CD3 鏈信號傳導之多肽之異源序列而進一步工程改造。在一些實施例中，多肽為野生型或變異型TCR。本發明細胞亦可適用於藉由引入編碼替代抗原結合部分之異源序列，例如藉由引入編碼替代(非內源性)T細胞受體(例如經工程改造以靶向特異性蛋白質之嵌合抗原受體(CAR))之異源序列而進一步工程改造。CAR亦稱為嵌合免疫受體、嵌合T細胞受體或人造T細胞受體)。

**【0123】** 在另一態樣中，本發明提供一種治療有需要個體之方法，其包括投與藉由本文所述之細胞製備方法，例如前述細胞製備方法之態樣及實施例中任一者之方法所製備之細胞(例如細胞群體)。

#### **【圖式簡單說明】**

**【0124】** 圖1顯示HEK-Cas9細胞中之TRAC編輯程度。

**【0125】** 圖2顯示人類CD3<sup>+</sup> T細胞中之TRAC編輯程度。

**【0126】** 圖3顯示人類CD3<sup>+</sup> T細胞中TRAC編輯後之TCR表現量。

**【0127】** 圖4A-B顯示HEK-Cas9細胞中之TRBC編輯程度。圖4A顯示TRBC1中之編輯且圖4B顯示TRBC2中之編輯。

**【0128】** 圖5顯示人類CD3<sup>+</sup> T細胞中之TRBC編輯程度。

**【0129】** 圖6顯示人類CD3<sup>+</sup> T細胞中TRBC編輯後之TCR表現量。

**【0130】** 圖7A-B顯示TRBC、TRAC及對照引導(SEQ ID NO: 193及194)之生物化學脫靶分析(潛在脫靶編輯部位之量測)。

**【0131】** 圖8A-D表明產生具有經TCR編輯T細胞之細胞的T細胞受體之基因剔除及TCR構築體之插入。圖8A顯示T細胞受體基因剔除之效率。圖8B顯示TCR構築體之慢病毒轉導之效率。圖8C顯示經編輯T細胞中TCR插入之表現。圖8D顯示經TCR編輯T細胞之表現型。

【0132】 圖9A-D顯示插入TCR之T細胞殺死初級AML母細胞之能力。圖9A至9C顯示由獲自3個攜帶HLA-A\*02:01對偶基因之不同患者之初級AML母細胞獲得之結果。圖9D顯示使用對照樣品：不攜帶特異性HLA等位基因之初級母細胞得到之結果。

【0133】 圖10表明藉由使用多個雙引導RNA同時編輯TRAC及TRBC基因座獲得之編輯頻率。

【0134】 圖11A-D顯示使用用於組合編輯之靶向TRAC及TRBC之crRNA之結果。圖11A顯示T細胞受體基因剔除之效率。圖11B顯示細胞中HD1-TCR構築體之慢病毒轉導。圖11C顯示經編輯T細胞中TCR插入之表現。圖11D顯示經TCR編輯T細胞之表現型。

【0135】 圖12A-B表明藉由使用多個單引導RNA同時編輯TRAC及TRBC基因座獲得之編輯頻率。圖12A顯示TRAC及TRBC基因座編輯之後CD3<sup>-</sup> T細胞之表現型百分比。圖12B顯示人類CD3<sup>-</sup> T細胞中TRAC及TRBC基因座中之插入或缺失形成之表現型百分比。

【0136】 圖13A-B顯示採用雙RNA引導及AAV載體(AV9)由間隙式插入模板在TRAC基因座之GFP插入程度(圖13A)，及採用此等雙RNA引導及AAV載體之TRAC基因剔除程度，其為CD3<sup>-</sup>的(圖13B)。間隙式插入模板(或簡稱為間隙式模板)包含側接「間隙」，亦即對應目標序列中不存在於間隙式插入模板中之區域的兩個序列。間隙式插入模板與靶向裂解用間隙內之位點的引導物相容，且適用於定量比較此類引導物，而不考慮此類引導是否靶向完全相同裂解位點，其限制條件為其皆靶向間隙內之裂解位點。

【0137】 圖14A-14B顯示用sgRNA及間隙式模板AV9在TRAC基因

座之GFP插入程度(圖14A)，及用此等sgRNA及間隙式模板AV9工程改造之細胞的百分比，其為表現型CD3<sup>-</sup>的(圖14B)。

【0138】 圖15A-B比較用於TCR插入之不同啟動子及反向末端重複序列(ITR)長度，如在FACS分析期間藉由陽性四聚體染色(圖15A)及平均螢光強度(MFI)(圖15B)所量測。

【0139】 圖16A-C顯示由藉由插入方案在TRAC基因座經無啟動子GFP構築體之AAV插入而工程改造之細胞中之內源性TRAC啟動子所驅動之GFP表現量。圖16A顯示模擬轉染對照，圖16B顯示RNP，且圖16C顯示RNP + AV10 - EGFP。X軸：GFP表現；Y軸：CD3e表現；如藉由FACS所量測。

【0140】 圖17A-C顯示有及無啟動子序列(PL - 無啟動子；EF1a - 啟動子EF1 $\alpha$ 或EF-1 $\alpha$ )存在下TRAC基因座之TCR構築體模板之插入效率。

【0141】 圖18A-B在有及無啟動子序列包含於轉型構築體中下使用兩種不同TCR量測插入轉型體中之脫粒。

【0142】 圖19A-B在有及無啟動子序列包含於轉型構築體中下使用兩種不同TCR量測插入轉型體中之干擾素 $\gamma$ 表現。

【0143】 圖20A-D顯示表面存在兩種TCR構築體，一者具有Cys修飾且一者不具有Cys修飾。

【0144】 圖21A-B量測插入之構築體之TCR鏈與內源性TCR鏈之間的錯配程度，如藉由流式細胞測量術所量測。圖21A及圖21B之FACS資料描述表現轉殖基因或錯配TCR之經工程改造細胞之級分，且圖21A及圖21B之經工程改造細胞中之TCR表現強度分別以MFI圖示於圖21C及圖

21D中。

【0145】 圖22量測CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>細胞中插入之構築體之TCR鏈與內源性TCR鏈之間的錯配程度，如藉由流式細胞測量術所量測。

【0146】 圖23顯示四種不同形式之TCR在有及無TRBC基因剔除下之VLD (威爾姆斯氏腫瘤抗原)四聚體染色，指示經WT1-TCR工程改造之CD8<sup>+</sup>細胞之錯配程度。

【0147】 圖24顯示四種不同TCR在有及無TRBC基因剔除下之VLD (威爾姆斯氏腫瘤抗原)四聚體染色，指示經WT1-TCR工程改造之CD4<sup>+</sup>細胞之錯配程度。

【0148】 圖25顯示有四種TCR構築體插入於TRAC基因座中以及TRBC基因剔除之CD8<sup>+</sup>細胞中之TCR表現強度，如藉由四聚體染色之MFI所量測。

【0149】 圖26顯示有四種TCR構築體插入於TRAC基因座中以及TRBC基因剔除之CD4<sup>+</sup>細胞中之TCR表現強度，如藉由四聚體染色之MFI所量測。

【0150】 圖27顯示含有插入之轉殖基因TCR (AV11-TCR-A、AV13-TCR-B、AV12-TCR-C)的T細胞之細胞毒性，該插入之轉殖基因TCR亦為TRAC/TRBC雙基因剔除或TRAC單基因剔除。細胞毒性藉由在6小時之後響應於卡斯蛋白酶3/7凋亡細胞量測凋亡細胞之螢光來量測。

【0151】 圖28顯示含有插入之轉殖基因TCR (AV11-TCR-A、AV14-TCR-F、AV15-TCR-G、AV16-TCR-H)的T細胞之細胞毒性，該插入之轉殖基因TCR亦為TRAC/TRBC雙基因剔除或TRAC單基因剔除。細胞毒性藉由在6小時之後響應於卡斯蛋白酶3/7凋亡細胞量測凋亡細胞之螢

光來量測。

【0152】 圖29A-G顯示含有插入之轉殖基因TCR (AV11-TCR-A、AV13-TCR-B、AV12-TCR-C、AV14-TCR-F、AV15-TCR-G、AV16-TCR-H)之T細胞之肽特異性IL-2分泌水準，該插入之轉殖基因TCR亦為TRAC/TRBC雙基因剔除或TRAC單基因剔除；如藉由ELISA所量測。

【0153】 圖30A-D顯示含有插入之轉殖基因TCR (AV11-TCR-A、AV14-TCR-F、AV15-TCR-G、AV16-TCR-H)之T細胞之肽特異性IFN- $\gamma$ 分泌水準，該插入之轉殖基因TCR亦為TRAC/TRBC雙基因剔除或TRAC單基因剔除；如藉由ELISA所量測。

【0154】 圖31A-B顯示含有插入之轉殖基因物(AV11-TCR-A、AV14-TCR-F、AV15-TCR-G、AV16-TCR-H)之CD4<sup>+</sup>及CD8<sup>+</sup> T細胞之肽特異性IFN- $\gamma$ 染色水準，該插入之轉殖基因物亦為TRAC/TRBC雙基因剔除或TRAC單基因剔除。

【0155】 圖32A-B顯示CD107a脫粒分析之結果，表明TRAC基因座中具有轉殖基因TCR之CD4<sup>+</sup>及CD8<sup>+</sup>細胞之同種異體反應性程度，其中原生TRAC發生基因剔除且有或無TRBC基因剔除存在。(AV11-TCR-A、AV14-TCR-F、AV15-TCR-G、AV16-TCR-H)。圖32A顯示CD8<sup>+</sup> T細胞中CD107a<sup>+</sup>染色細胞之百分比。圖31B顯示CD4<sup>+</sup> T細胞中CD107a<sup>+</sup>染色細胞百分比。

【0156】 圖33A-D顯示混合淋巴細胞反應之結果，表明TRAC基因座中具有轉殖基因TCR之CD4<sup>+</sup>及CD8<sup>+</sup>細胞之同種異體反應性程度，其中原生TRAC發生基因剔除且有或無TRBC基因剔除存在。CTV，CellTrace 紫(ThermoFisher)。

**【實施方式】**

**【0157】** 本申請案主張2018年10月16所申請之美國臨時專利申請案第62/746,522號及2018年10月17日申請之62/747,037之優先權，其以引用的方式併入本文中。

**【0158】** 本申請案含有序列表，該序列表已以ASCII格式以電子方式提交且以全文引用的方式併入本文中。於2019年10月14產生之ASCII複本命名為Sequence\_Listing.txt且大小係272千位元組。

**【0159】** 現將詳細參考本發明之某些實施例，其實例在附圖中加以說明。儘管本教示內容係與多個實施例結合描述，但並不意欲使本教示內容限制於彼等實施例。相反，如熟習此項技術者將瞭解，本教示內容涵蓋多種替代方案、修改及等效物。

**【0160】** 在詳細描述本教示內容之前，應瞭解，本發明不限於特定組合物或方法步驟，因而可加以改變。應注意，除非上下文另外明確指示，否則如本說明書及隨附申請專利範圍中所用，單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個參考物。因此，舉例而言，提及「結合物(a conjugate)」包括複數個結合物且提及「細胞(a cell)」包括複數個細胞及其類似物。

**【0161】** 數值範圍包括界定該範圍之數字。考慮到有效數位及與量測相關之誤差，所量測及可量測值應理解為大致的。此外，「包含(comprise/comprises/comprising)」、「含有(contain/contains/containing)」及「包括(include/includes/including)」之使用並不意欲為限制性的。應瞭解，前述一般描述與詳細描述僅為例示性及解釋性的且並不限制教示內容。

【0162】除非說明書中具體指出，否則本說明書中敘述「包含」各種組分之實施例亦設想為「由所述組分組成」或「基本上由所述組分組成」；本說明書中敘述「由各種組分組成」之實施例亦設想為「包含」所述組分或「基本上由所述組分組成」；且本說明書中敘述「基本上由各種組分組成」之實施例亦設想為「由所述組分組成」或「包含」所述組分(此互換性並不適用於此等術語在申請專利範圍中之使用)。除非上下文另外明確指示，否則術語「或(or)」以包括性意義使用，亦即等於「及/或(and/or)」。術語「約(about)」在清單之前使用時修飾該清單之各成員。

【0163】本文所用之章節標題僅出於組織目的而不應被視為以任何方式限制所需主題。在以引用之方式併入之任何材料與本說明書中所定義之任何術語或本說明書之任何其他表述內容相矛盾之情況下，以本說明書為準。

## I. 定義

【0164】除非另外說明，否則如本文所用之以下術語及片語意欲具有以下含義：

【0165】「聚核苷酸」及「核酸」在本文中用以指包含含氮雜環鹼基或鹼基類似物沿主鏈連接在一起之核苷或核苷類似物的多聚化合物，其包括習知RNA、DNA、混合RNA-DNA及為其類似物之聚合物。核酸「主鏈」可由多個鍵聯組成，其包括糖-磷酸二酯鍵聯、肽-核酸鍵聯(「肽核酸」或PNA；PCT第WO 95/32305號)、硫代磷酸酯鍵聯、甲基膦酸酯鍵聯或其組合中之一或多者。核酸之糖部分可為核糖、去氧核糖或具有取代，例如2'甲氧基或2'鹵基取代之類似化合物。含氮鹼基可為習知鹼基(A、G、C、T、U)；其類似物(例如經修飾之尿苷，諸如5-甲氧基尿

昔、假尿昔或N1-甲基假尿昔或其他)；肌核苷；嘌呤或嘧啶之衍生物(例如N<sup>4</sup>-甲基脫氧鳥昔、去氮或氮雜嘌呤、去氮或氮雜嘧啶、在5或6位具有取代基之嘧啶鹼基(例如5-甲基胞嘧啶)、在2、6或8位具有取代基之嘌呤鹼基、2-胺基-6-甲胺基嘌呤、O<sup>6</sup>-甲基鳥嘌呤、4-硫基-嘧啶、4-胺基-嘧啶、4-二甲基胍-嘧啶及O<sup>4</sup>-烷基-嘧啶；美國專利第5,378,825號及PCT第WO 93/13121號)。對於一般論述，參見*The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams等人編，第11版，1992)。核酸可包括一或多個「無鹼基」殘基，其中主鏈不包括針對聚合物位置之含氮鹼基(美國專利第5,585,481號)。核酸僅可包含習知RNA或DNA糖、鹼基及鍵聯，或可包括習知組分與取代基(例如具有2'甲氧基取代基之習知核苷或含有習知核苷與一或多個核苷類似物之聚合物)。核酸包括「鎖定核酸」(LNA)、含有一或多種LNA核苷酸單體之類似物，該等單體具有模擬糖構形之鎖定於RNA中的雙環咪喃糖單元，其會增強對互補RNA及DNA序列之雜合親和性)Vester及Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41)。RNA及DNA具有不同糖部分且不同之處可為在RNA中存在尿嘧啶或其類似物及在DNA中存在胸腺嘧啶或其類似物。

**【0166】** 「引導RNA」、「gRNA」及簡稱「引導物」在本文中互換用以指crRNA (亦稱為CRISPR RNA)或crRNA與trRNA之組合(亦稱為tracrRNA)。crRNA及trRNA可以單一RNA分子(單引導RNA，sgRNA)或以兩個個別RNA分子(雙引導RNA，dgRNA)形式締合。「引導RNA」或「gRNA」係指各類型。trRNA可為天然存在之序列或與天然存在之序列相比具有修飾或變化之trRNA序列。

**【0167】** 如本文所用，「引導序列」係指引導RNA內與目標序列互

補且用以藉由經RNA引導之DNA結合劑將引導RNA導引至目標序列以供結合或修飾(例如裂解)的序列。「引導序列」亦可稱為「靶向序列」或「間隔序列」。引導序列之長度可為20個鹼基對，例如在釀膿鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (亦即Spy Cas9)及相關Cas9同源物/直系同源物之情況下。較短或較長序列亦可用作引導物，例如長度為15、16、17、18、19、21、22、23、24或25個核苷酸。舉例而言，在一些實施例中，引導序列包含選自SEQ ID NO：1-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸。在一些實施例中，目標序列係於例如基因中或染色體上，且與引導序列互補。在一些實施例中，引導序列與其相應目標序列之間的互補性或一致性之程度可為約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。舉例而言，在一些實施例中，引導序列包含與選自SEQ ID NO：1-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸具有約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之序列。在一些實施例中，引導序列與目標區域可為100%互補或一致的。在其他實施例中，引導序列及目標區域可含有至少一個錯配。舉例而言，引導序列及目標序列可含有1、2、3或4個錯配，其中目標序列之總長度為至少17、18、19、20個或更多個鹼基對。在一些實施例中，引導序列及目標區域可含有1至4個錯配，其中引導序列包含至少17、18、19、20個或更多個核苷酸。在一些實施例中，引導序列及目標區域可含有1、2、3或4個錯配，其中引導序列包含20個核苷酸。

**【0168】** 經RNA引導之DNA結合劑之目標序列包括基因組DNA之正及負股(亦即既定序列及序列之反向互補序列)，此係因為經RNA引導之DNA結合劑之核酸受質為雙股核酸。因此，在引導序列稱為「與目標序

列互補」之情況下，應瞭解，引導序列可引導引導RNA以結合至目標序列之有義股或反義股(例如反向互補序列)。因此，在一些實施例中，在引導序列結合目標序列之反向互補序列之情況下，引導序列與目標序列(例如不包括PAM之目標序列)之某些核苷酸一致，但其中在引導序列中改用U取代T。

**【0169】** 如本文所用，「經RNA引導之DNA結合劑」意謂具有RNA及DNA結合活性之多肽或多肽複合物，或此類複合物之DNA結合次單元，其中DNA結合活性具有序列特異性且視RNA之序列而定。例示性經RNA引導之DNA結合劑包括Cas裂解酶/切口酶及其不活化形式(「dCas DNA結合劑」)。如本文所用，「Cas核酸酶」涵蓋Cas裂解酶、Cas切口酶及dCas DNA結合劑。在一些實施例中，Cas裂解酶或Cas切口酶涵蓋經修飾以允許例如經由與FokI域融合而進行DNA裂解之dCas DNA結合劑。Cas裂解酶/切口酶及dCas DNA結合劑包括III型CRISPR系統之Csm或Cmr複合物、其Cas10、Csm1或Cmr2次單元、I型CRISPR系統之級聯複合物、其Cas3次單元及2類Cas核酸酶。如本文所用，「第2類Cas核酸酶」為具有經RNA引導之DNA結合活性的單鏈多肽。第2類Cas核酸酶包括第2類Cas裂解酶/切口酶(例如H840A、D10A或N863A變異體)，其進一步具有經RNA引導之DNA裂解酶或切口酶活性，及第2類dCas DNA結合劑，其中裂解酶/切口酶活性未活化。第2類Cas核酸酶包括例如Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、HF Cas9 (例如N497A、R661A、Q695A、Q926A變異體)、HypaCas9 (例如N692A、M694A、Q695A、H698A變異體)、eSPCas9(1.0) (例如K810A、K1003A、R1060A變異體)及eSPCas9(1.1) (例如K848A、K1003A、R1060A變異體)蛋白質及其變體。Cpf1蛋白質

(Zetsche等人, *Cell*, 163 : 1-13 (2015))與Cas9同源且含有RuvC樣核酸酶域。Zetsche之Cpf1序列以全文引用之方式併入。參見例如Zetsche, 表S1及表S3。參見例如Makarova等人, *Nat Rev Microbiol*, 13(11) : 722-36 (2015) ; Shmakov等人, *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015)。

**【0170】** 如本文所用,「核糖核蛋白」(RNP)或「RNP複合物」係指引導RNA以及經RNA引導之DNA結合劑,諸如Cas核酸酶,例如Cas裂解酶、切口酶或dCas DNA結合劑(例如Cas9)。在一些實施例中,引導RNA將經RNA引導之DNA結合劑,諸如Cas9導引至目標序列,且該引導RNA與目標序列雜合且該結合劑結合於目標序列;在結合劑為裂解酶或切口酶之情況下,結合之後可進行裂解或切口。

**【0171】** 如本文所用,若第一序列與第二序列之比對表明整個第二序列之X%或更多之位置與第一序列匹配,則第一序列視為「包含與第二序列具有至少X%一致性之序列」。舉例而言,序列AAGA包含與序列AAG具有100%一致性之序列,原因為由於第二序列之全部三個位置均存在匹配,因此比對將得到100%一致性。RNA與DNA之間的差異(一般而言,尿苷交換為胸苷或反之亦然)及核苷類似物(諸如經修飾之尿苷)的存在不會造成聚核苷酸之間一致性或互補性的差異,只要相關核苷酸(諸如胸苷、尿苷或經修飾之尿苷)具有相同補體(例如對於胸苷、尿苷或經修飾之尿苷全體而言,為腺苷;另一實例為胞嘧啶及5-甲基胞嘧啶,兩者具有鳥苷或經修飾之鳥苷作為補體)。因此,舉例而言,序列5'-AXG (其中X為任何經修飾之尿苷,諸如假尿苷、N1-甲基假尿苷或5-甲氧基尿苷)視為與AUG具有100%一致性,因為兩者與同一序列(5'-CAU)完全互補。例示性比對算法為此項技術中熟知的史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)及尼德

曼-翁施(Needleman-Wunsch)算法。熟習此項技術者將理解何種演算法選擇及參數設置適合於待對準之給定序列對；對於具有一般類似長度及針對胺基酸之>50%預期一致性或針對核苷酸之>75%預期一致性的序列而言，由EBI於www.ebi.ac.uk網站伺服器提供尼德曼-翁施演算法介面之具有默認設置的尼德曼-翁施演算法通常為合適的。

**【0172】** 「mRNA」在本文中用於指包含可轉譯成多肽之開放閱讀框架(亦即可充當用於藉由核糖體及胺基醯化tRNA進行之轉譯之受質)之聚核苷酸。mRNA可包含磷酸酯-糖主鏈，其包括核糖殘基或其類似物，例如2'-甲氧基核糖殘基。在一些實施例中，mRNA磷酸酯-糖主鏈之糖基本上由核糖殘基、2'-甲氧基核糖殘基或其組合組成。

**【0173】** 適用於本文所述之引導RNA組合物及方法中之例示性引導序列示於表1、2及3中及整個申請案中。

**【0174】** 如本文所用，「插入或缺失」係指由多種核苷酸組成之插入或缺失突變，該等核苷酸在目標核酸中之雙股斷裂(DSB)位點進行插入或缺失。

**【0175】** 如本文所用，「阻斷基因表現」係指特定基因產物(例如蛋白質、mRNA或兩者)之表現降低。蛋白質之阻斷基因表現可藉由偵測來自所關注組織或細胞群體之蛋白質之總細胞量來量測。用於量測將mRNA阻斷基因表現的方法為已知的，且包括對自所關注之組織或細胞群體分離之mRNA進行定序。流式細胞測量術分析為用於量測蛋白質表現之阻斷基因表現的已知方法。在一些實施例中，「阻斷基因表現」可指一些特定基因產物之表現缺失，例如經轉錄之mRNA之量下降或由細胞群體表現之蛋白質之量下降。在一些實施例中，「阻斷基因表現」可指一些特定基因產

物之表現缺失，例如細胞表面之TRAC或TRBC基因產物之表現缺失。

【0176】如本文所用，「基因剔除」係指細胞中之特定蛋白質之表現缺失。基因剔除可偵測細胞、組織或細胞群體中蛋白質之總細胞量來量測。在一些實施例中，本發明之方法將一或多個細胞(例如細胞群體中)中之TRBC1、TRBC2及/或TRAC「基因剔除」。在一些實施例中，基因剔除為細胞中之T細胞受體(例如TRBC1、TRBC2及/或TRAC)之蛋白質組分之表現完全缺失，而非形成突變型T細胞受體蛋白。

【0177】如本文所用，「TRBC1」及「TRBC2」係指編碼T細胞受體 $\beta$ -鏈之兩種同源基因，其為TRBC1或TRBC2基因之基因產物。

【0178】「TRBC」在本文中用以指TRBC1及TRBC2。

【0179】人類野生型TRBC1序列可以NCBI基因ID：28639；Ensembl：ENSG00000211751獲得。T細胞受體 $\beta$ 恆定區、V\_segment轉譯產物、BV05S1J2.2、TCRBC1及TCRB為TRBC1之基因同義詞。

【0180】人類野生型TRBC2序列可以NCBI基因ID：28638；Ensembl：ENSG00000211772獲得。T細胞受體 $\beta$ 恆定區、V\_segment轉譯產物及TCRBC2為TRBC2之基因同義詞。

【0181】人類野生型TRAC序列可以NCBI基因ID：28755；Ensembl：ENSG00000277734獲得。T細胞受體 $\alpha$ 恆定區、TCRA、IMD7、TRCA及TRA為TRAC之基因同義詞。

【0182】威爾姆斯氏腫瘤蛋白質(有時亦稱為威爾姆斯氏腫瘤抗原)為由*WT1*基因編碼之蛋白質。人類野生型*WT1*序列可以NCBI基因ID：7490；Ensembl：ENSG00000184937獲得。GUD、AWT1、WAGR、WT33、NPHS4及WIT-2為WT1之基因同義詞。已報導威爾姆斯氏腫瘤蛋

白質表現於多種癌症中，包括實體腫瘤(包括(但不限於)威爾姆斯氏腫瘤)及血液癌症，以及腫瘤血管內皮細胞及造血祖細胞中。

**【0183】** 如本文所用，「目標序列」係指目標基因中與gRNA之引導序列互補的核酸序列。目標序列與引導序列之相互作用引導經RNA引導之DNA結合劑結合，且在目標序列內潛在地切口或裂解(視試劑活性而定)。

**【0184】** 如本文所用，「治療」係指投與或施用用於個體之疾病或病症的治療劑，且包括抑制疾病、遏制其顯現、減輕疾病之一或多種症狀、治癒疾病或預防疾病之一或多種症狀復發。

**【0185】** 術語「約」或「大致」意謂如由一般熟習此項技術者所測定之特定值之可接受誤差，其部分取決於如何量測或測定該值。

## II. 組合物

### A. 包含引導RNA (gRNA)之組合物

**【0186】** 本文提供適用於例如使用引導RNA與經RNA引導之DNA結合劑(例如CRISPR/Cas系統)在TRBC及/或TRAC基因內改變DNA序列，例如誘導單股斷裂(SSB)或雙股斷裂(DSB)之組合物。在一些實施例中，組合物適用於改變TRAC及/或TRBC序列且進一步插入TCR基因。

**【0187】** 在一些實施例中，相比於對照，例如TRAC及/或TRBC不改變之對照，改變TRAC及/或TRBC序列及進一步插入TCR基因宜減少TRAC及/或TRBC之錯配。舉例而言，改變TRBC序列(例如基因剔除TRBC)及進一步插入TCR基因宜減少插入之TCR與原生TRBC之間的錯配。或者，改變TRAC序列(例如基因剔除TRAC)及進一步插入TCR基因宜減少插入之TCR與原生TRAC之間的錯配。靶向TRBC基因之引導序列

以SEQ ID NO：1-89顯示於表1中。靶向TRAC基因之引導序列以SEQ ID NO：90-178、185及213-218顯示於表2中。

【0188】 在一些實施例中，引導RNA序列與根據來自人類參考基因組hg38座標之下表中所示之對應基因組區域互補。其他實施例之引導序列可與接近表1、2及/或3中之任一者中所列舉之基因組座標之序列互補。舉例而言，其他實施例之引導序列可與包含表1、2及/或3中之任一者中所列舉之基因組座標之15個連續核苷酸±10個核苷酸之序列互補。

【0189】 表1及表2中以SEQ ID NO：1-89、90-178、185及213-218所示之引導序列中之各者可進一步包含另外核苷酸以形成crRNA，例如在引導序列之3'端之後具有以下例示性核苷酸序列：在5'至3'位向之GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO：400)。在sgRNA之情況下，引導序列可進一步包含另外核苷酸以形成sgRNA，例如在引導序列之3'端之後具有以下例示性核苷酸序列：5'至3'位向之GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO：401)。引導序列可進一步包含另外核苷酸以形成sgRNA，例如在引導序列之3'端之後包含以下例示性核苷酸序列：5'至3'位向之GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO：402)。

【0190】表1：TRBC靶向及對照引導序列及染色體座標

SEQ ID NO:	引導序列	基因組座標(hg38)
1	GGCUCUCGGAGAAUGACGAG	chr7:142791996-142792016
2	GGCCUCGGCGCUGACGAUCU	chr7:142792047-142792067
3	AUGACGAGUGGACCCAGGAU	chr7:142792008-142792028
4	AGAAGGUGGCCGAGACCCUC	chr7:142791931-142791951
5	UGAGGGUCUCGGCCACCUUC	chr7:142791930-142791950
6	AGAGAUCUCCCACACCCAAA	chr7:142791748-142791768
7	UGGCUCAAACACAGCGACCU	chr7:142791720-142791740
8	GGCGCUGACGAUCUGGGUGA	chr7:142792041-142792061
9	UGGCAGACAGGACCCCUUGC	chr7:142802114-142802134
10	UGACGAGUGGACCCAGGAUA	chr7:142792009-142792029
11†	AGACAGGACCCCUUGCUGGU	chr7:142792697-142792717
12	UUGACAGCGGAAGUGGUUGC	chr7:142791963-142791983
13	CGUAGAACUGGACUUGACAG	chr7:142791976-142791996
14	CGCUGUCAAGUCCAGUUCUA	chr7:142791974-142791994
15	ACUGGACUUGACAGCGGAAG	chr7:142791970-142791990
16	GUUGCGGGGGUUCUGCCAGA	chr7:142791948-142791968
17	CUGCCUGAGCAGCCGCCUGA	chr7:142791913-142791933
18	GACAGCGGAAGUGGUUGC	chr7:142791961-142791981
19	CCACUCACCUGCUCUACCCC	chr7:142792068-142792088
20	GCUGUCAAGUCCAGUUCUAC	chr7:142791975-142791995
21	ACACUGGUGUGCCUGGCCAC	chr7:142791773-142791793
22	AGACCCUCAGGCGGCUGCUC	chr7:142791919-142791939
23	AUGGGAAGGAGGUGCACAGU	chr7:142791834-142791854
24	AGGGCGGGCUGCUCCUUGAG	chr7:142791878-142791898
25	UCCCUAGCAAGAUCUCAUAG	chr7:142802141-142802161
26†	GGUGCACAGUGGGGUCAGCA	chr7:142791844-142791864
27	CCAGCUCAGCUCCACGUGGU	chr7:142801154-142801174
28	CCGCAACCACUCCGCUGUC	chr7:142791961-142791981
29	GUCCACUCGUCAUUCUCCGA	chr7:142792001-142792021
30	GCCCGUAGAACUGGACUUGA	chr7:142791979-142791999
31	UCACCCAGAUCGUCAGCGCC	chr7:142792041-142792061
32	GGGUCCACUCGUCAUUCUCC	chr7:142792003-142792023
33	UCCAGUUCUACGGGCUCUCG	chr7:142791984-142792004
34	CGGAGAAUGACGAGUGGACC	chr7:142792002-142792022
35	ACCACUCCGCUGUCAAGUC	chr7:142791966-142791986
36	AAUGACGAGUGGACCCAGGA	chr7:142792007-142792027

SEQ ID NO:	引導序列	基因組座標(hg38)
37	ACGGGCUCUCGGAGAAUGAC	chr7:142791993-142792013
38	GACUCCAGAUACUGCCUGAG	chr7:142791902-142791922
39	CGCUGUGUUUGAGCCAUCAG	chr7:142791724-142791744
40	AGAACUGGACUUGACAGCGG	chr7:142791973-142791993
41	GAGACCCUCAGGCGGCUGCU	chr7:142791920-142791940
42	CGUCAUUCUCCGAGAGCCCG	chr7:142791994-142792014
43	CAGCCCGCCCUCAAUGACUC	chr7:142791887-142791907
44	GGCUGCUCAGGCAGUAUCUG	chr7:142791907-142791927
45	AGUGGUUGCGGGGGUUCUGC	chr7:142791952-142791972
46	GGUCGCUGUGUUUGAGCCAU	chr7:142791721-142791741
47	GAUCUCAUAGAGGAUGGUGG	chr7:142792718-142792738
48	UGUUUGAGCCAUCAGAAGCA	chr7:142791729-142791749
49	UACUGCCUGAGCAGCCGCCU	chr7:142791911-142791931
50	ACCCGCAGCCCCUCAAGGAG	chr7:142791867-142791887
51	AGGCAGUAUCUGGAGUCAUU	chr7:142791899-142791919
52	UGUGUUUGAGCCAUCAGAAG	chr7:142791727-142791747
53	GGUUGCGGGGGUUCUGCCAG	chr7:142791949-142791969
54	GGGUCUCGGCCACCUUCUGG	chr7:142791933-142791953
55	CAGAAGGUGGCCGAGACCCU	chr7:142791932-142791952
56	CGCCGAGGCCUGGGGUAGAG	chr7:142792057-142792077
57	GGUUCUGCCAGAAGGUGGCC	chr7:142791940-142791960
58	CAGAGAUCUCCACACCCAA	chr7:142791747-142791767
59	UUGAGGGCGGGCUGCUCCUU	chr7:142791881-142791901
60	AAGCCUGUGGCCAGGCACAC	chr7:142791779-142791799
61	CAGCGCCGAGGCCUGGGGUA	chr7:142792054-142792074
62	CCCACUCACCUGCUCUACCC	chr7:142792069-142792089
63	UGUCUGCCACCAUCCUCUAU	chr7:142792712-142792732
64	UGCUCUGAUGGCUCAACA	chr7:142791729-142791749
65	UUCCCAUUCACCCACCAGCU	chr7:142791821-142791841
66	GUCAGCGCCGAGGCCUGGGG	chr7:142792052-142792072
67	CCCUCAGGCGGCUGCUCAGG	chr7:142791916-142791936
68	AAUGACUCCAGAUACUGCCU	chr7:142791899-142791919
69	CACACUGGUGUGCCUGGCCA	chr7:142791772-142791792
70	UCAUAGAGGAUGGUGGCAGA	chr7:142792714-142792734
71	CACCCAGAUCGUCAGCGCCG	chr7:142792042-142792062
72	UGACAGCGGAAGUGGUUGCG	chr7:142791962-142791982
73	UCUCCGAGAGCCCGUAGAAC	chr7:142791988-142792008

SEQ ID NO:	引導序列	基因組座標(hg38)
74	AGUCCAGUUCUACGGGCUCU	chr7:142791982-142792002
75	AUCGUCAGCGCCGAGGCCUG	chr7:142792049-142792069
76	AAGGAGGUGCACAGUGGGGU	chr7:142791839-142791859
77	UAUCUGGAGUCAUUGAGGGC	chr7:142791893-142791913
78	GCGGGGGUUCUGCCAGAAGG	chr7:142791945-142791965
79	CUUGACAGCGGAAGUGGUUG	chr7:142791964-142791984
80	GUGUGGCCUUUUGGGUGUGG	chr7:142791757-142791777
81	GAUCGUCAGCGCCGAGGCCU	chr7:142792048-142792068
82	UGUGGCCAGGCACACCAGUG	chr7:142791774-142791794
83	AGGCCUCGGCGCUGACGAUC	chr7:142792048-142792068
84	GUGAAUGGGAAGGAGGUGCA	chr7:142791830-142791850
85	GCGGCUGCUCAGGCAGUAUC	chr7:142791909-142791929
86	ACUGCCUGAGCAGCCGCCUG	chr7:142791912-142791932
87	AAAGGCCACACUGGUGUGCC	chr7:142791766-142791786
88	UGAGGGCGGGCUGCUCCUUG	chr7:142791880-142791900
89	GAGCAGCCGCCUGAGGGUCU	chr7:142791919-142791939

此等引導序列中之各者通常靶向TRBC1與TRBC2基因，但具有以下例外，其如下標記：

† SEQ ID NO：11及26尤其靶向TRBC1。

【0191】表2：TRAC靶向及對照引導序列及染色體座標

SEQ ID NO:	引導序列	基因組座標(hg38)
90	CUCUCAGCUGGUACACGGCA	chr14:22547524-22547544
91	UUCGGAACCCAAUCACUGAC	chr14:22550581-22550601
92	UAAACCCGGCCACUUUCAGG	chr14:22550608-22550628
93	GAUUAAACCCGGCCACUUUC	chr14:22550611-22550631
94	CGUCAUGAGCAGAUUAAACC	chr14:22550622-22550642
95	AGAGUCUCUCAGCUGGUACA	chr14:22547529-22547549
96	ACACGGCAGGGUCAGGGUUC	chr14:22547512-22547532
97	UCUCUCAGCUGGUACACGGC	chr14:22547525-22547545
98	UGGAUUUAGAGUCUCUCAGC	chr14:22547536-22547556
99	GAGAAUCAAAAUCGGUGAAU	chr14:22547575-22547595
100	ACAAAACUGUGCUAGACAUG	chr14:22547640-22547660
101	UGUGCUAGACAUGAGGUCUA	chr14:22547647-22547667
102	GCACCAAAGCUGCCCUUACC	chr14:22547777-22547797
103	AAGUUCCUGUGAUGUCAAGC	chr14:22549638-22549658

SEQ ID NO:	引導序列	基因組座標(hg38)
104	CUCGACCAGCUUGACAUCAC	chr14:22549646-22549666
105	AUCCUCCUCCUGAAAGUGGC	chr14:22550600-22550620
106	ACCCGGCCACUUUCAGGAGG	chr14:22550605-22550625
107	UUAUUCUGCUCAUGACGCUG	chr14:22550625-22550645
108	ACACGGAUGAACAAUAAGGC	chr14:22539116-22539136
109	ACUUACACGGAUGAACAAUA	chr14:22539120-22539140
110	GCUGGUACACGGCAGGGUCA	chr14:22547518-22547538
111	GGAAGCUACAUAACCUACAUAU	chr14:22539082-22539102
112	UCCUCACUGUGUGCAUCAGG	chr14:22539061-22539081
113	CUGGUUCCUCUCCAAAUGU	chr14:22539097-22539117
114	AAAGUCAGAUUUGUUGCUC	chr14:22547697-22547717
115	UUCAAAACCUGUCAGUGAUU	chr14:22550571-22550591
116	UGCUC AUGACGCUGCGGCUG	chr14:22550631-22550651
117	UCAAGGCCCCUCACCUCAGC	chr14:22550658-22550678
118	GGCGUUUGCACAUGCAAAGU	chr14:22547712-22547732
119	GACCACAGCCGCAGCGUCAU	chr14:22550636-22550656
120	AUGACGCUGCGGCUGUGGUC	chr14:22550636-22550656
121	AUUCGGAACCCAAUCACUGA	chr14:22550582-22550602
122	AACCCGGCCACUUUCAGGAG	chr14:22550606-22550626
123	UUA AACCCGGCCACUUUCAG	chr14:22550609-22550629
124	AGAUUUGUUGCUC CAGGCCA	chr14:22547691-22547711
125	UGAGAAUCAAAAUCGGUGAA	chr14:22547576-22547596
126	GAUGUCAAGCUGGUCGAGAA	chr14:22549648-22549668
127	GUUUC AAAGCUUUUCUCGAC	chr14:22549660-22549680
128	UGAAGGCGUUUGCACAUGCA	chr14:22547716-22547736
129	ACCCUGACCCUGCCGUGUAC	chr14:22547514-22547534
130	AGCUUCAAGGCCCCUCACCU	chr14:22550662-22550682
131	GUUCCGAAUCCUCCUCCUGA	chr14:22550593-22550613
132	AGAUUAAACCCGGCCACUUU	chr14:22550612-22550632
133	CCUGCCGUGUACCAGCUGA	chr14:22547521-22547541
134	UCACUGGAUUUAGAGUCUCU	chr14:22547540-22547560
135	UACUUACACGGAUGAACAAU	chr14:22539121-22539141
136	UAUCACAGACAAAACUGUGC	chr14:22547632-22547652
137	CCACAGCACUGUUGCUCUUG	chr14:22547674-22547694
138	CCUGUGAUGUCAAGCUGGUC	chr14:22549643-22549663
139	ACAUGAGGUCUAUGGACUUC	chr14:22547655-22547675
140	ACUGUUGCUCUUGAAGUCCA	chr14:22547667-22547687

SEQ ID NO:	引導序列	基因組座標(hg38)
141	AGCUACAUACCUACAUUUGG	chr14:22539085-22539105
142	UAGAAAGUUCUGUGAUGUC	chr14:22549634-22549654
143	UCACUGUGUGCAUCAGGAGG	chr14:22539064-22539084
144	GACAAAACUGUGCUAGACAU	chr14:22547639-22547659
145	CUUCAACAACAGCAUUAUUC	chr14:22547731-22547751
146	CAACAACAGCAUUAUUCAG	chr14:22547734-22547754
147	UCUCAAAACAAAUGUGUCACA	chr14:22547591-22547611
148	AUGAGGUCUAUGGACUUCAA	chr14:22547657-22547677
149	GACCCUGCCGUGUACCAGCU	chr14:22547519-22547539
150	CCCCUGUCUUACCUGUUUCA	chr14:22549674-22549694
151	AGCAACAGUGCUGUGGCCUG	chr14:22547678-22547698
152	CUACAUACCUACAUUUGGAA	chr14:22539087-22539107
153	ACUUUGUGACACAUUUGUUU	chr14:22547595-22547615
154	AUCACAGACAAAACUGUGCU	chr14:22547633-22547653
155	UUCAACAACAGCAUUAUUC	chr14:22547732-22547752
156	CAUGAGGUCUAUGGACUUCA	chr14:22547656-22547676
157	GCUACAUACCUACAUUUGGA	chr14:22539086-22539106
158	CUCUUGUCCACAGAUAUCC	chr14:22547491-22547511
159	GAUUCUGAUGUGUAUAUCAC	chr14:22547618-22547638
160	CUGUGAUGUCAAGCUGGUCG	chr14:22549644-22549664
161	CCUGCCGUGUACCAGCUGAG	chr14:22547522-22547542
162	ACAUACCUACAUUUGGAAGA	chr14:22539089-22539109
163	CCUCACUGUGUGCAUCAGGA	chr14:22539062-22539082
164	ACAAAUGUGUCACAAAGUAA	chr14:22547597-22547617
165	GAGCAACAGUGCUGUGGCCU	chr14:22547677-22547697
166	UCGACCAGCUUGACAUCACA	chr14:22549645-22549665
167	AUUAAACCCGGCCACUUUCA	chr14:22550610-22550630
168	CACGGCAGGGUCAGGGUUCU	chr14:22547511-22547531
169	AAACCCGGCCACUUUCAGGA	chr14:22550607-22550627
170	CAAGGCCCCUCACCUCAGCU	chr14:22550657-22550677
171	CCCGGCCACUUUCAGGAGGA	chr14:22550604-22550624
172	CAUUUCUAUAAUACUUACAC	chr14:22539132-22539152
173	ACAGCCGCAGCGUCAUGAGC	chr14:22550632-22550652
174	AUCAAAAUCGGUGAAUAGGC	chr14:22547571-22547591
175	GCGUUUGCACAUGCAAAGUC	chr14:22547711-22547731
176	CUGUUGCUCUUGAAGUCCA	chr14:22547666-22547686
177	AAAUCGGUGAAUAGGCAGAC	chr14:22547567-22547587

SEQ ID NO:	引導序列	基因組座標(hg38)
178	UUGUCUGUGAUUAUACACAUC	chr14:22547624-22547644
185	UCAGGGUUCUGGAUAUCUGU	chr14:22547501-22547521
213	AGCUGGUACACGGCAGGGUC	chr14:22547519-22547539
214	UAGGCAGACAGACUUGUCAC	chr14:22547556-22547576
215	UCUGUGGGACAAGAGGAUCA	chr14:22547486-22547506
216	AUCUGUGGGACAAGAGGAUC	chr14:22547487-22547507
217	CUGGAUAUCUGUGGGACAAG	chr14:22547493-22547513
218	GUCAGGGUUCUGGAUAUCUG	chr14:22547502-22547522

【0192】 表3：sgRNA序列、命名法及組分子序列

SEQ ID NO:	sgRNA序列	基因組座標(hg38)
179	GGCUCUCGGAGAAUGACGAGGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791996-142792016
180	GGCCUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142792047-142792067
181	AUGACGAGUGGACCCAGGAUGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142792008-142792028
182	AGAAGGUGGCCGAGACCCUCGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791931-142791951
183	UGAGGGUCUCGGCCACCUUCGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791930-142791950
184	AGAGAUCUCCCACACCCAAAGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791748-142791768
186	CUCUCAGCUGGUACACGGCAGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG	chr14:22547529-22547549

SEQ ID NO:	sgRNA序列	基因組座標(hg38)
	GCACCGAGUCGGUGCUUUU	
187	UUCGGAACCCAAUCACUGACGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22550611-22550631
188	UAAACCCGGCCACUUUCAGGGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22547501-22547521
189	GAUUAACCCGGCCACUUUCGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22550608-22550628
190	CGUCAUGAGCAGAUUAAACCGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22547529-22547549
191	AGAGUCUCUCAGCUGGUACAGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22547524-22547544
192	UCAGGGUUCUGGAUAUCUGUGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22550622-22550642
193	mG*mA*mG*UCCGAGCAGAAGAAGAAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr2:72933852-72933872
194	mG*mA*mC*CCCCUCCACCCCGCCUCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:43770821-43770841
195	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU	chr14:22550581-22550601

SEQ ID NO:	sgRNA序列	基因組座標(hg38)
	AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC ACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	
196	GGCUCUCGGAGAAUGACGAGGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791996-142792016
197	GGCCUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142792047-142792067
198	AUGACGAGUGGACCCAGGAUGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142792008-142792028
199	UGAGGGUCUCGGCCACCUUCGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791930-142791950
200	AGAGAUCUCCCACACCCAAAGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791748-142791768
201	mA*mC*mA*CGGCAGGGUCAGGGUUCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547512-22547532
202	mA*mG*mC*UGGUACACGGCAGGGUCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547519-22547539
203	mC*mU*mC*UCAGCUGGUACACGGCAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm	chr14:22547524-22547544

SEQ ID NO:	sgRNA序列	基因組座標(hg38)
	GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
204	mU*mC*mU*CUCAGCUGGUACACGGCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547525-22547545
205	mU*mG*mG*AUUUAGAGUCUCUCAGCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547536-22547556
206	mU*mA*mG*GCAGACAGACUUGUCACGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547556-22547576
207	mU*mC*mU*GUGGGACAAGAGGAUCAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547486-22547506
208	mA*mU*mC*UGUGGGACAAGAGGAUCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547487-22547507
209	mC*mU*mG*GAUAUCUGUGGGACAAGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547493-22547513

SEQ ID NO:	sgRNA序列	基因組座標(hg38)
210	mG*mU*mC*AGGGUUCUGGAUAUCUGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547502-22547522
211	mU*mC*mA*GGGUUCUGGAUAUCUGUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547501-22547521
212	UAGGCAGACAGACUUGUCACGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22547556-22547576

\* = PS鍵聯；m = 2'-O-Me核苷酸；N = 任何天然或非天然核苷酸

【0193】 在一些實施例中，本發明提供一種包含一或多種引導RNA (gRNA)之組合物，該或該等引導RNA包含將經RNA引導之DNA結合劑(其可為核酸酶(例如Cas核酸酶，諸如Cas9))引導至TRBC1、TRBC2及/或TRAC中之目標DNA序列之引導序列。gRNA可包含表1或2中所示之引導序列。在一些實施例中，gRNA包含以下序列：  
(N)<sub>x</sub>GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC  
GUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGC (SEQ ID  
NO: 403)，其中「N」可為任何天然或非天然核苷酸，且其中全部N包含如本文所述之TRBC或TRAC引導序列。gRNA可包含有包含表1至3中所示之引導序列的crRNA。gRNA可包含有包含表1及2中所示之引導序列之17、18、19或20個連續核苷酸之crRNA。在一些實施例中，gRNA包含有包含與表1及2中所示之引導序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸具

有約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之序列的crRNA。在一些實施例中，gRNA包含有包含與表1及2中所示之引導序列具有約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之序列的crRNA。gRNA可進一步包含trRNA。在本文所述之各實施例中，crRNA及trRNA可締合為單一RNA (sgRNA) 或可於個別RNA (dgRNA)上。在sgRNA之情形下，crRNA及trRNA組分可例如經由磷酸二酯鍵或其他共價鍵共價連接。

**【0194】** 在本文所述之各實施例中，引導RNA可包含呈「雙引導RNA」或「dgRNA」形式之兩個RNA分子。dgRNA包含有包含crRNA之第一RNA分子，該crRNA包含例如表1及2中所示之引導序列，及包含trRNA之第二RNA分子。第一及第二RNA分子可非共價連接，但可經由crRNA與trRNA之各部分之間的鹼基配對形成RNA雙螺旋體。

**【0195】** 在本文所述之各實施例中，引導RNA可包含呈「單引導RNA」或「sgRNA」形式之單一RNA分子。sgRNA可包含與trRNA共價連接之crRNA (或其部分)，該crRNA包含表1及2中所示之引導序列。sgRNA可包含表1及2中所示之引導序列之17、18、19或20個連續核苷酸。在一些實施例中，crRNA及trRNA經由連接子共價連接。在一些實施例中，sgRNA經由crRNA與trRNA之各部分之間的鹼基配對形成莖環結構。在一些實施例中，crRNA及trRNA經由一或多個不為磷酸二酯鍵之鍵共價連接。

**【0196】** 在一些實施例中，trRNA可包含來源於天然產生之CRISPR/Cas系統的trRNA序列之全部或一部分。在一些實施例中，trRNA包含經截短或經修飾之野生型trRNA。trRNA之長度視所用

CRISPR/Cas系統而定。在一些實施例中，trRNA包含或由以下組成：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個或多於100個核苷酸。在一些實施例中，trRNA可包含某些二級結構，諸如一或多種髮夾結構或莖環結構或一或多種隆突結構。

**【0197】** 在一些實施例中，本發明提供一種包含一或多種引導RNA之組合物，該或該等引導RNA包含SEQ ID NO：1-89及90-178中任一者之引導序列。

**【0198】** 在一些實施例中，本發明提供一種包含一或多種sgRNA之組合物，該或該等sgRNA包含SEQ ID NO：179-184中之任一者。

**【0199】** 在一個態樣中，本發明提供一種包含gRNA之組合物，該gRNA包含與SEQ ID NO：1-89、90-178、185及213-218之核酸中之任一者至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列。

**【0200】** 在其他實施例中，組合物包含至少一種，例如至少兩種gRNA，該或該等gRNA包含選自SEQ ID NO：1-89、90-178、185及213-218之引導序列中之任何兩者或更多者之引導序列。在一些實施例中，組合物包含至少兩種gRNA，其各自包含與SEQ ID NO：1-89、90-178、185及213-218之核酸中之任一者至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列。

**【0201】** 本發明之引導RNA組合物經設計以識別(例如雜合至)TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中之目標序列。舉例而言，TRBC1、TRBC2及/或TRAC目標序列可藉由包含引導RNA之提供之Cas

裂解酶識別且裂解。在一些實施例中，諸如Cas裂解酶之經RNA引導之DNA結合劑可藉由引導RNA引導至TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之目標序列，其中引導RNA之引導序列與目標序列雜合，且諸如Cas裂解酶之經RNA引導之DNA結合劑裂解目標序列。

**【0202】** 在一些實施例中，一或多種引導RNA之選擇基於TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之目標序列而確定。

**【0203】** 不受任何特定理論束縛，基因之某些區中之突變(例如由由於核酸酶介導之DSB而發生之插入或缺失所產生之框移突變)可能要比基因之其他區中之突變更不可容許，因此DSB之位置在可引起之蛋白質阻斷基因表現的量或類型方面為重要因素。在一些實施例中，使用與TRBC1、TRBC2及/或TRAC內之目標序列互補或具有互補性的gRNA來將經RNA引導之DNA結合劑引導至適當TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中之特定位置。在一些實施例中，gRNA經設計以具有與TRBC1及/或TRBC2之外顯子1、外顯子2、外顯子3或外顯子4中之目標序列及/或TRAC之外顯子1、外顯子2、外顯子3或外顯子4中之目標序列互補或具有互補性的引導序列。

**【0204】** 在一些實施例中，引導序列與人類TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中所存在之目標序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致。在一些實施例中，目標序列可與引導RNA之引導序列互補。在一些實施例中，引導RNA之引導序列與其相應目標序列之間的互補性或一致性之程度可為至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些實施例中，gRNA之目標序列及引導序列可為100%互補或一致的。在其他實施例中，gRNA之目

標序列及引導序列可含有至少一個錯配。舉例而言，gRNA之目標序列及引導序列可含有1、2、3或4個錯配，其中引導序列之總長度為20。在一些實施例中，gRNA之目標序列及引導序列可含有1至4個錯配，其中引導序列為約20個核苷酸。

**【0205】** 在一些實施例中，本文所揭示之組合物或調配物包含mRNA，其包含編碼經RNA引導之DNA結合劑，諸如如本文所述之Cas核酸酶之開放閱讀框架(ORF)。在一些實施例中，提供、使用或投與mRNA，其包含編碼經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas核酸酶之ORF。

### **B. 經修飾之gRNA及mRNA**

**【0206】** 在一些實施例中，gRNA經化學修飾。在一些實施例中，gRNA包含一或多個經修飾核苷或核苷酸且可稱為「經修飾之」gRNA或「經化學修飾之」gRNA，用於描述替代或外加典型A、G、C及U殘基使用之一或多種非天然及/或天然產生之組分或組態之存在。在一些實施例中，經修飾之gRNA係藉由非典型核苷或核苷酸合成，此處稱為「經修飾」。經修飾之核苷及核苷酸可包括以下中之一或多者：(i)磷酸二酯主鏈鍵聯中之非鍵聯磷酸氧中之一者或兩者及/或鍵聯磷酸氧中之一或多者之改變，例如置換(例示性主鏈修飾)；(ii)核糖成分，例如核糖上之2'羥基之改變，例如置換(例示性糖修飾)；(iii)用「去磷酸」連接子批量置換磷酸酯部分(例示性主鏈修飾)；(iv)天然產生之核鹼基之修飾或置換，包括用非典型核鹼基(例示性鹼基修飾)；(v)核糖-磷酸酯主鏈之置換或修飾(例示性主鏈修飾)；(vi)寡核苷酸之3'端或5'端之修飾，例如末端磷酸酯基之移除、修飾或置換或部分、帽或連接子之結合(此類3'或5'帽修飾可包含糖及/或主鏈修飾)；及(vii)糖之修飾或置換(例示性糖修飾)。

**【0207】** 可組合化學修飾，諸如上文所列之彼等修飾以提供經修飾之gRNA及/或mRNA，其包含可具有二、三、四個或更多個修飾之核苷及核苷酸(統稱為「殘基」)。舉例而言，經修飾之殘基可具有經修飾之糖及經修飾之核鹼基。在一些實施例中，gRNA之各鹼基經修飾，例如所有鹼基具有經修飾之磷酸酯基，諸如硫代磷酸酯基。在某些實施例中，gRNA分子之所有或基本上所有磷酸酯基經硫代磷酸酯基置換。在一些實施例中，經修飾之gRNA在RNA之5'端處或附近包含至少一個經修飾之殘基。在一些實施例中，經修飾之gRNA在RNA之3'端處或附近包含至少一個經修飾之殘基。

**【0208】** 在一些實施例中，gRNA包含一、二、三個或更多個經修飾之殘基。在一些實施例中，經修飾之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%)之位置為經修飾之核苷或核苷酸。

**【0209】** 未經修飾之核酸可易於藉由例如細胞內核酸酶或見於血清中之彼等核酸酶降解。舉例而言，核酸酶可水解核酸磷酸二酯鍵。因此，在一個態樣中，本文所述之gRNA可含有一或多個經修飾之核苷或核苷酸，例如以引入針對胞內核酸酶或基於血清之核酸酶之穩定性。在一些實施例中，本文所述之經修飾之gRNA分子在活體內及離體引入至細胞群體中時可展現降低之先天性免疫反應。術語「先天性免疫反應」包括針對外源性核酸(包括單股核酸)之細胞反應，其涉及誘導細胞介素(尤其干擾素)表現及釋放，及細胞死亡。

【0210】 在主鏈修飾之一些實施例中，經修飾之殘基之磷酸酯基可藉由用不同取代基置換一或多個氧而經修飾。另外，經修飾之殘基，例如存在於經修飾之核酸中之經修飾之殘基可包括用如本文所述之經修飾之磷酸酯基批量置換未經修飾之磷酸酯部分。在一些實施例中，磷酸酯主鏈之主鏈修飾可包括產生不帶電連接子或具有不對稱電荷分佈之帶電連接子的改變。

【0211】 經修飾之磷酸酯基之實例包括硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼烷磷酸酯、硼烷磷酸酯、氫膦酸酯、胺基磷酸酯、膦酸烷酯及烷基磷酸三酯或膦酸芳酯及芳基磷酸三酯。未經修飾之磷酸酯基中之磷原子為非對掌性的。然而，用以上原子或原子組中之一者置換非橋聯氧中之一者可使得磷原子為對掌性的。立體對稱磷原子可具有「R」組態(本文中為Rp)或「S」組態(本文中為Sp)。主鏈亦可藉由用氮(橋聯胺基磷酸酯)、硫(橋聯硫代磷酸酯)及碳(橋聯亞甲基膦酸酯)替換橋聯氧(亦即連接磷酸酯與核苷之氧)而加以修飾。置換可發生在任一連接氧或兩個連接氧處。

【0212】 磷酸酯基可在某些主鏈修飾中經不含磷之連接基團置換。在一些實施例中，帶電磷酸酯基可經中性部分置換。可置換磷酸酯基之部分之實例可包括(但不限於)例如膦酸甲酯、羥胺基、矽氧烷、碳酸酯、羧甲基、胺基甲酸酯、醯胺、硫醚、環氧乙烷連接子、磺酸酯、磺醯胺、硫代甲縮醛、甲縮醛、肟、亞甲基亞胺基、亞甲基甲基亞胺基、亞甲基肼、亞甲基二甲基肼及亞甲氧基甲基亞胺基。

【0213】 亦可構築可模擬核酸之骨架，其中磷酸酯連接子及核糖經耐核酸酶性核苷或核苷酸替代物置換。此類修飾可包含主鏈及糖修飾。在一些實施例中，核鹼基可藉由替代主鏈繫栓。實例可包括(但不限於)N-嗎

啉基、環丁基、吡咯啉及肽核酸(PNA)核苷替代物。

**【0214】** 經修飾之核苷及經修飾之核苷酸可包括一或多個針對糖基之修飾，亦即糖修飾。舉例而言，2'羥基(OH)可經修飾，例如經多個不同「氧基」或「去氧」取代基置換。在一些實施例中，針對2'羥基之修飾可增強核酸之穩定性，此係因為羥基可不再經去質子化以形成2'-烷氧離子。

**【0215】** 2'羥基修飾之實例可包括烷氧基或芳氧基(OR，其中「R」可為例如烷基、環烷基、芳基、芳烷基、雜芳基或糖)；聚乙二醇(PEG)， $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ ，其中R可為例如H或視情況經取代之烷基，且n可為0至20之整數(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及4至20)。在一些實施例中，2'羥基修飾可為2'-O-Me。在一些實施例中，2'羥基修飾可為2'-氟修飾，其用氟置換2'羥基。在一些實施例中，2'羥基修飾可包括「鎖定」核酸(LNA)，其中2'羥基可例如藉由C<sub>1-6</sub>伸烷基或C<sub>1-6</sub>伸雜烷基橋鍵連接至同一核糖之4'碳，其中例示性橋鍵可包括亞甲基、丙烯、醚或胺基橋鍵；O-胺基(其中胺基可為例如NH<sub>2</sub>；烷胺基、二烷胺基、雜環基、芳胺基、二芳胺基、雜芳胺基或二雜芳胺基、乙二胺或聚胺基)及胺基烷氧基、 $O(CH_2)_n$ -胺基，(其中胺基可為例如NH<sub>2</sub>；烷胺基、二烷胺基、雜環基、芳胺基、二芳胺基、雜芳胺基或二雜芳胺基、乙二胺或聚胺基)。在一些實施例中，2'羥基修飾可包括「未鎖定」核酸(UNA)，其中核糖環缺乏C2'-C3'鍵。在一些實施例中，2'羥基修飾可包括甲氧基乙基(MOE)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>，例如PEG衍生物)。

**【0216】** 「去氧」2'修飾可包括氫(亦即去氧核糖，例如在部分

dsRNA之突出部分)；鹵基(例如溴、氯、氟或碘基)；胺基(其中胺基可為例如NH<sub>2</sub>；烷胺基、二烷基胺基、雜環基、芳胺基、二芳胺基、雜芳胺基、二雜芳胺基或胺基酸)；NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-胺基(其中胺基可例如如本文所述)、-NHC(O)R (其中R可為例如烷基、環烷基、芳基、芳烷基、雜芳基或糖)、氰基；巰基；烷基-硫基-烷基；硫烷氧基；及烷基、環烷基、芳基、烯基及炔基，其可視情況經例如如本文所述之胺基取代。

**【0217】** 糖修飾可包含亦可含有一或多個碳之糖基，其具有與核糖中之對應碳相反的立體化學組態。因此，經修飾之核酸可包括含有例如作為糖之阿拉伯糖之核苷酸。經修飾之核酸亦可包括無鹼基糖。此等無鹼基糖亦可進一步在成分糖原子中之一或多者處經修飾。經修飾之核酸亦可包括一或多種呈L形式之糖，例如L-核昔。

**【0218】** 可併入至經修飾之核酸中之本文所述之經修飾之核昔及經修飾之核苷酸可包括經修飾之核鹼基，亦稱為核鹼基。核鹼基之實例包括(但不限於)腺嘌呤(A)、鳥嘌呤(G)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U))。此等核鹼基可經修飾或完全置換以得到可併入至經修飾之核酸中之經修飾之殘基。核苷酸之核鹼基可獨立地選自嘌呤、嘧啶、嘌呤類似物或嘧啶類似物。在一些實施例中，核鹼基可包括例如天然產生之鹼基衍生物及合成鹼基衍生物。

**【0219】** 在採用雙引導RNA之實施例中，crRNA及tracr RNA中之各者可含有修飾。此類修飾可於crRNA及/或tracr RNA之一或兩個末端。在包含sgRNA之實施例中，sgRNA之一或兩個末端之一或多個殘基可經化學修飾，及/或內部核昔可經修飾，及/或整個sgRNA可經化學修飾。某

些實施例包含5'端修飾。某些實施例包含3'端修飾。某些實施例包含5'端修飾及3'端修飾。

**【0220】** 在一些實施例中，本文所揭示之引導RNA包含2017年12月8日申請之標題為「Chemically Modified Guide RNAs」之WO2018/107028 A1中所揭示之修飾模式中之一者，其內容以全文引用的方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之引導RNA包含US20170114334中所揭示之結構/修飾模式中之一者，其內容以全文引用的方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之引導RNA包含WO2017/136794中所揭示之結構/修飾模式中之一者，其內容以全文引用的方式併入本文中。

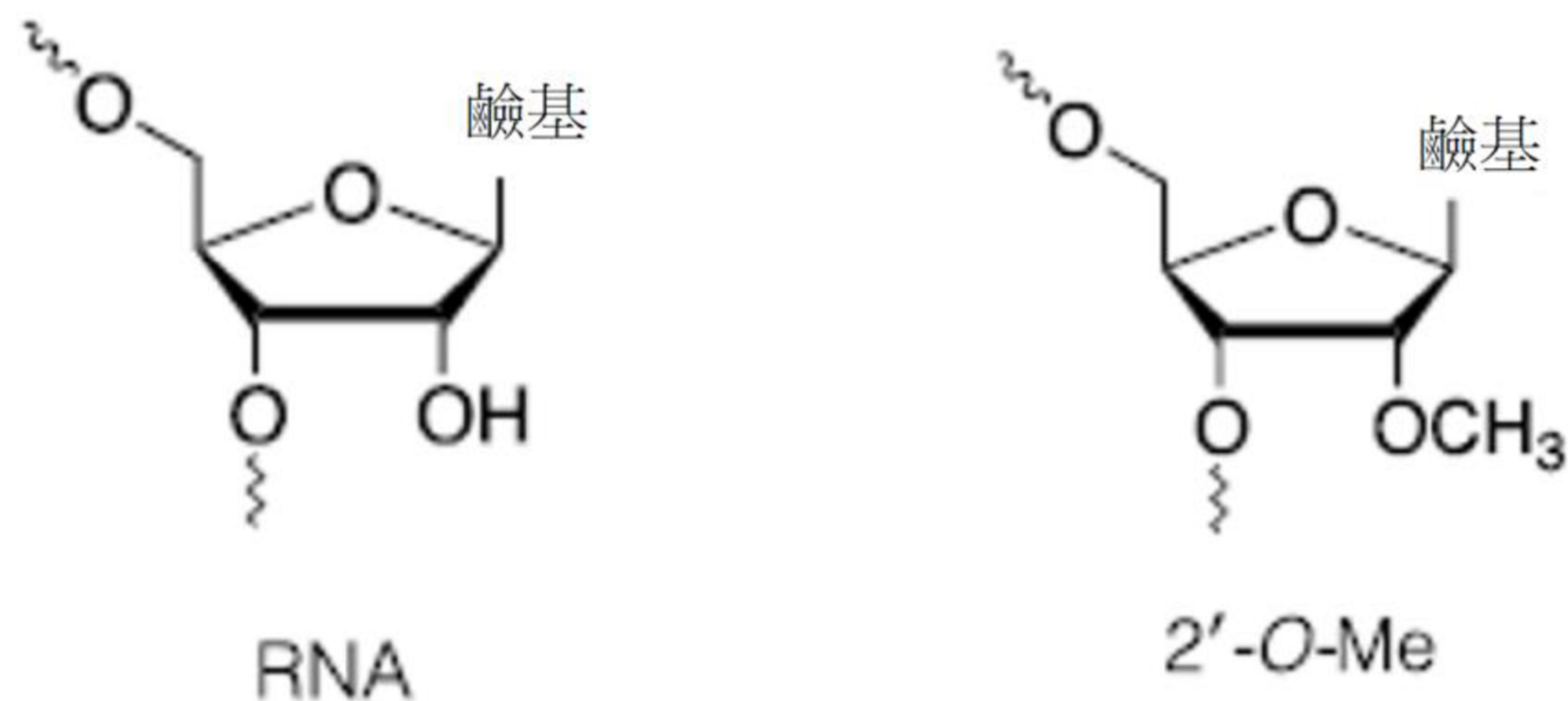
**【0221】** 在一些實施例中，sgRNA包含本文中所示之修飾模式中之一者，其中N為任何天然或非天然核苷酸，且其中全部N均包含如本文表1至3中所述之TRBC1、TRBC2及/或TRAC引導序列。在一些實施例中，經修飾之sgRNA包含以下序列：  
 mN\*mN\*mN\*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAm  
 GmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA  
 mAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmG  
 mUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU (SEQ ID NO: 300)，其中  
 「N」可為任何天然或非天然核苷酸，且其中全部N均包含如表1及2中所述或如本文所述之TRBC1、TRBC2及/或TRAC引導序列。舉例而言，本文涵蓋SEQ ID NO: 300，其中N經本文表1及2中所揭示之引導序列(SEQ ID NO: 1-89、90-178、185及213-218)中之任一者置換。

**【0222】** 下文所述修飾中之任一者可存在於本文所述之gRNA及

mRNA中。

【0223】術語「mA」、「mC」、「mU」或「mG」可用於指示2'-O-Me修飾之核苷酸。

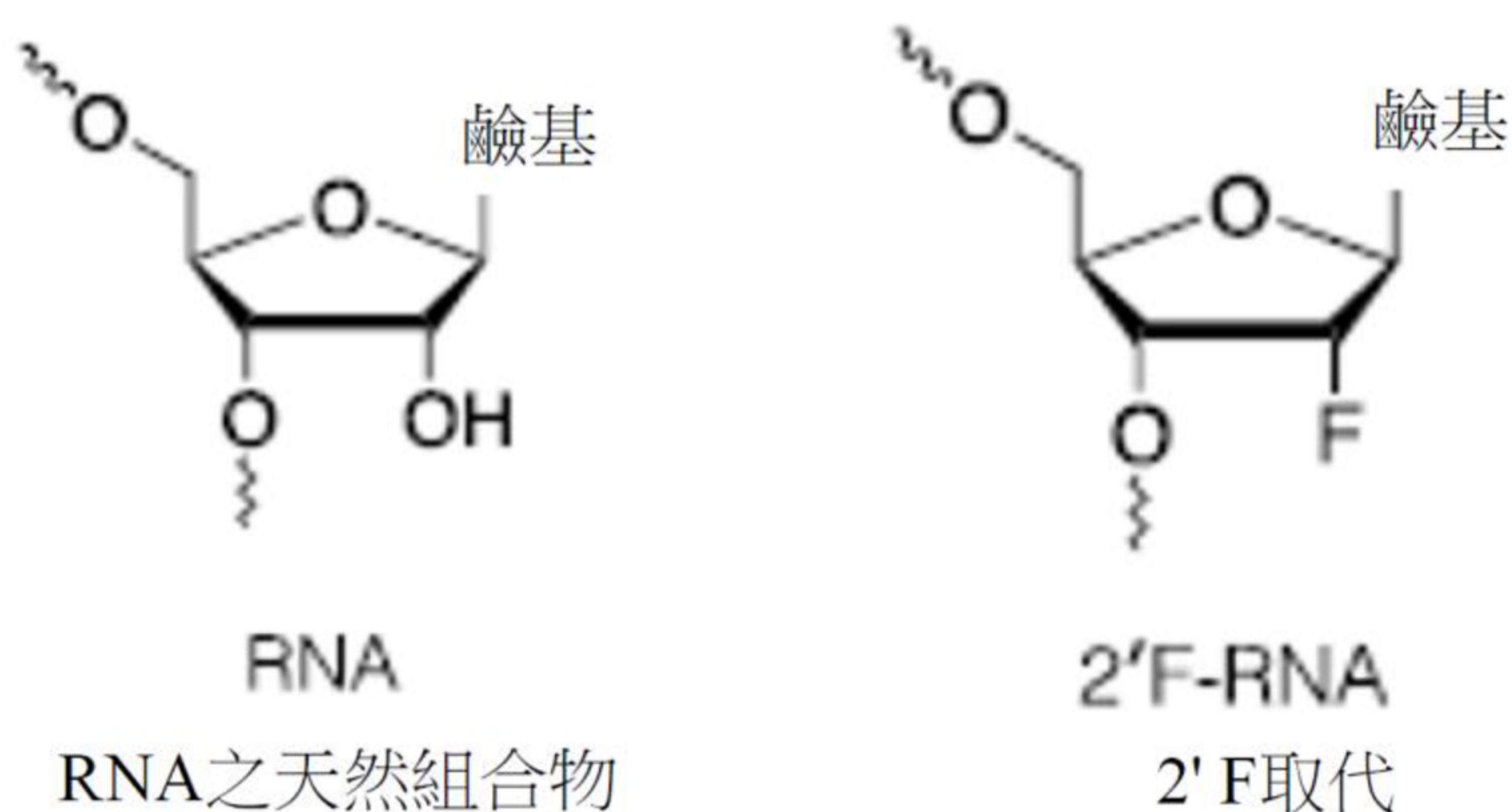
【0224】2'-O-甲基之修飾可如下描繪：



【0225】已顯示影響核苷酸糖環之另一化學修飾為鹵素取代。舉例而言，核苷酸糖環上之2'-氟基(2'-F)取代可增加寡核苷酸結合親和力及核酸酶穩定性。

【0226】在本申請案中，術語「fA」、「fC」、「fU」或「fG」可用於指示經2'-F取代之核苷酸。

【0227】2'-F之取代可如下描繪：

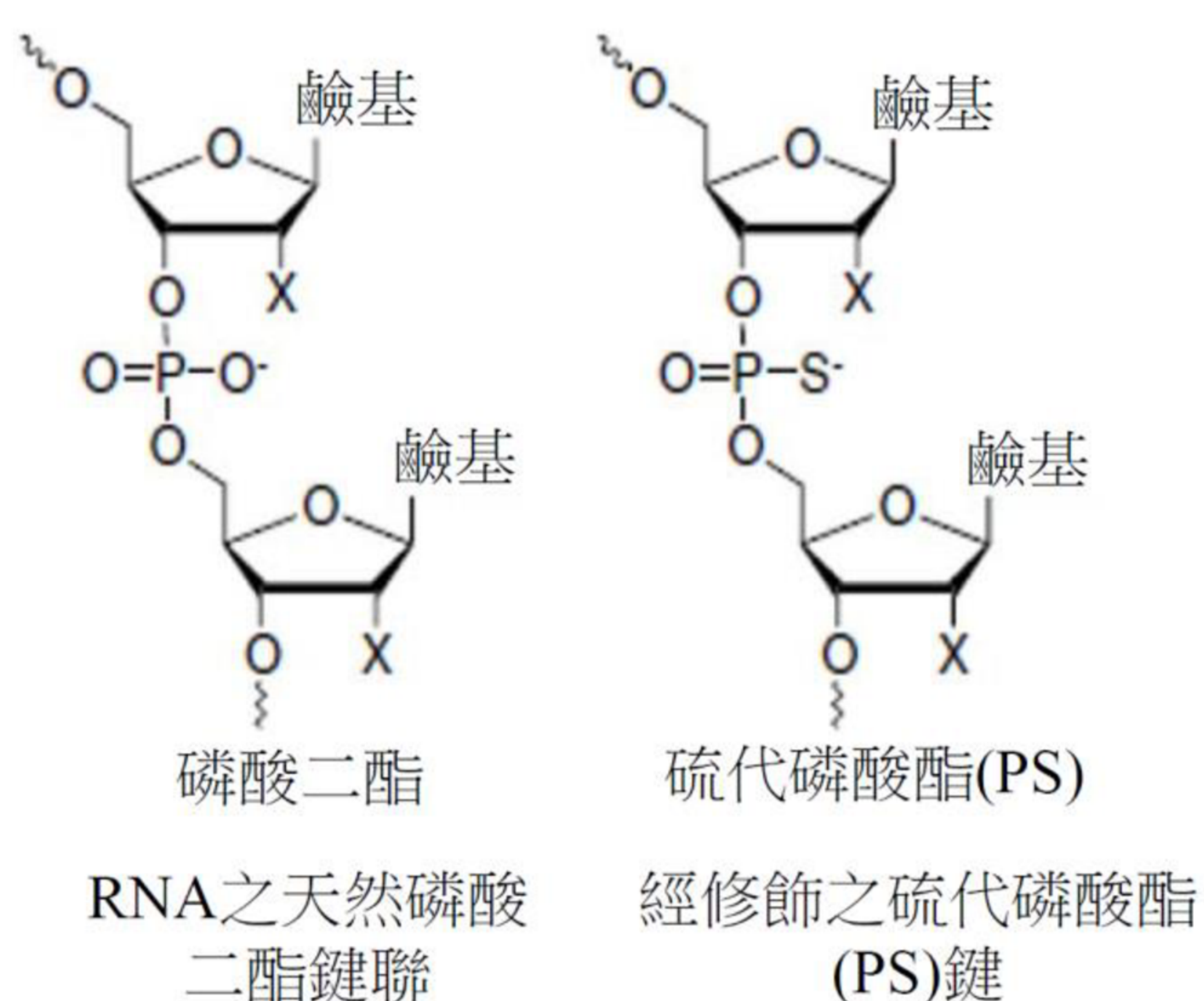


【0228】硫代磷酸酯(PS)鍵聯或鍵係指硫取代磷酸二酯鍵聯，例如核苷酸鹼基之間的鍵中之一個非橋聯磷酸酯氧的鍵。當硫代磷酸酯用於產生寡核苷酸時，經修飾之寡核苷酸亦可稱為S-寡核苷酸。

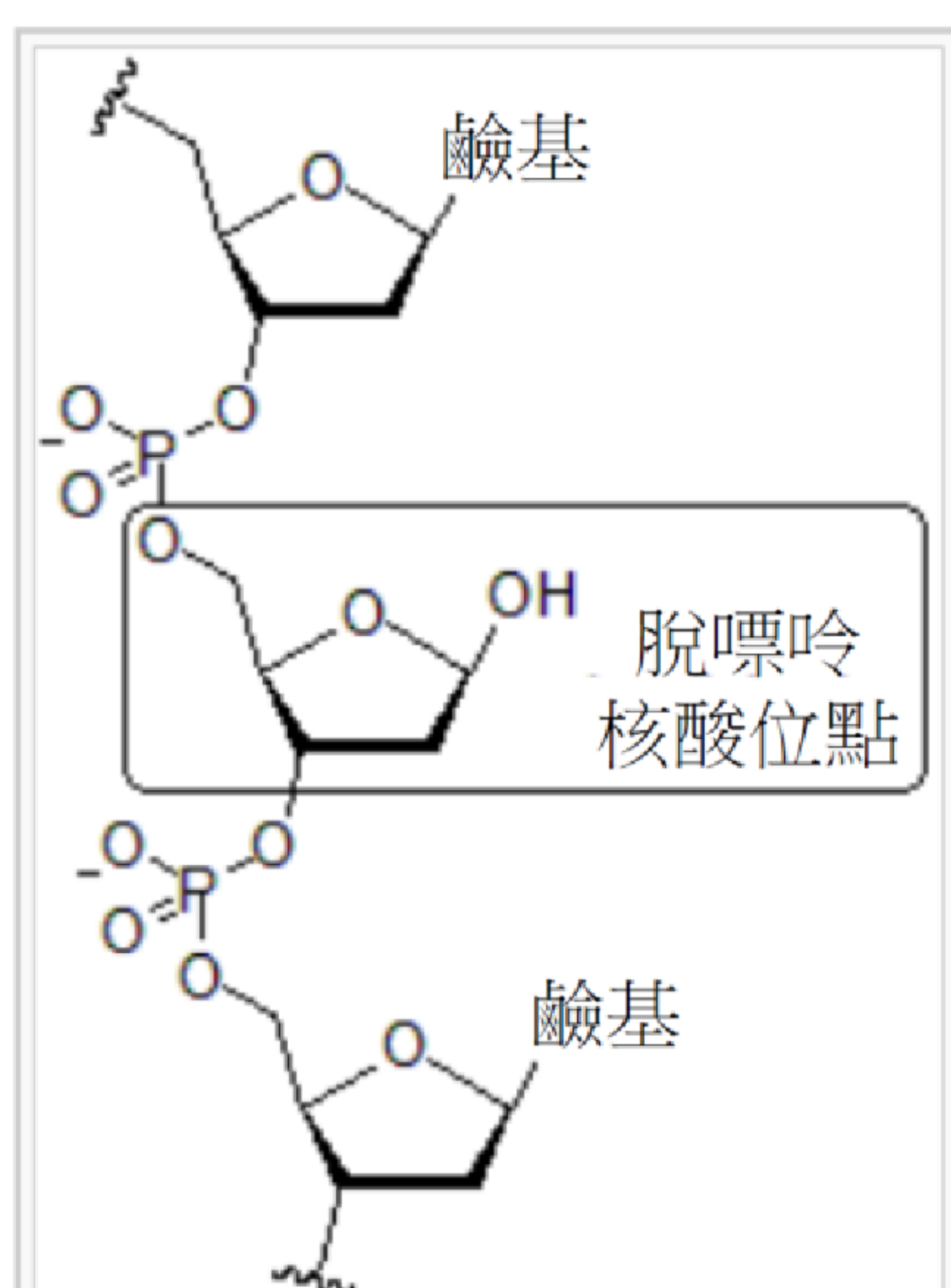
【0229】 「\*」可用於描述PS修飾。在本申請案中，術語A\*、C\*、U\*或G\*可用於指示經PS鍵連接至後續(例如3')核苷酸之核苷酸。

【0230】 在本申請案中，術語「mA\*」、「mC\*」、「mU\*」或「mG\*」可用於指示已經2'-O-Me取代且經PS鍵連接至下一個(例如3')核苷酸之核苷酸。

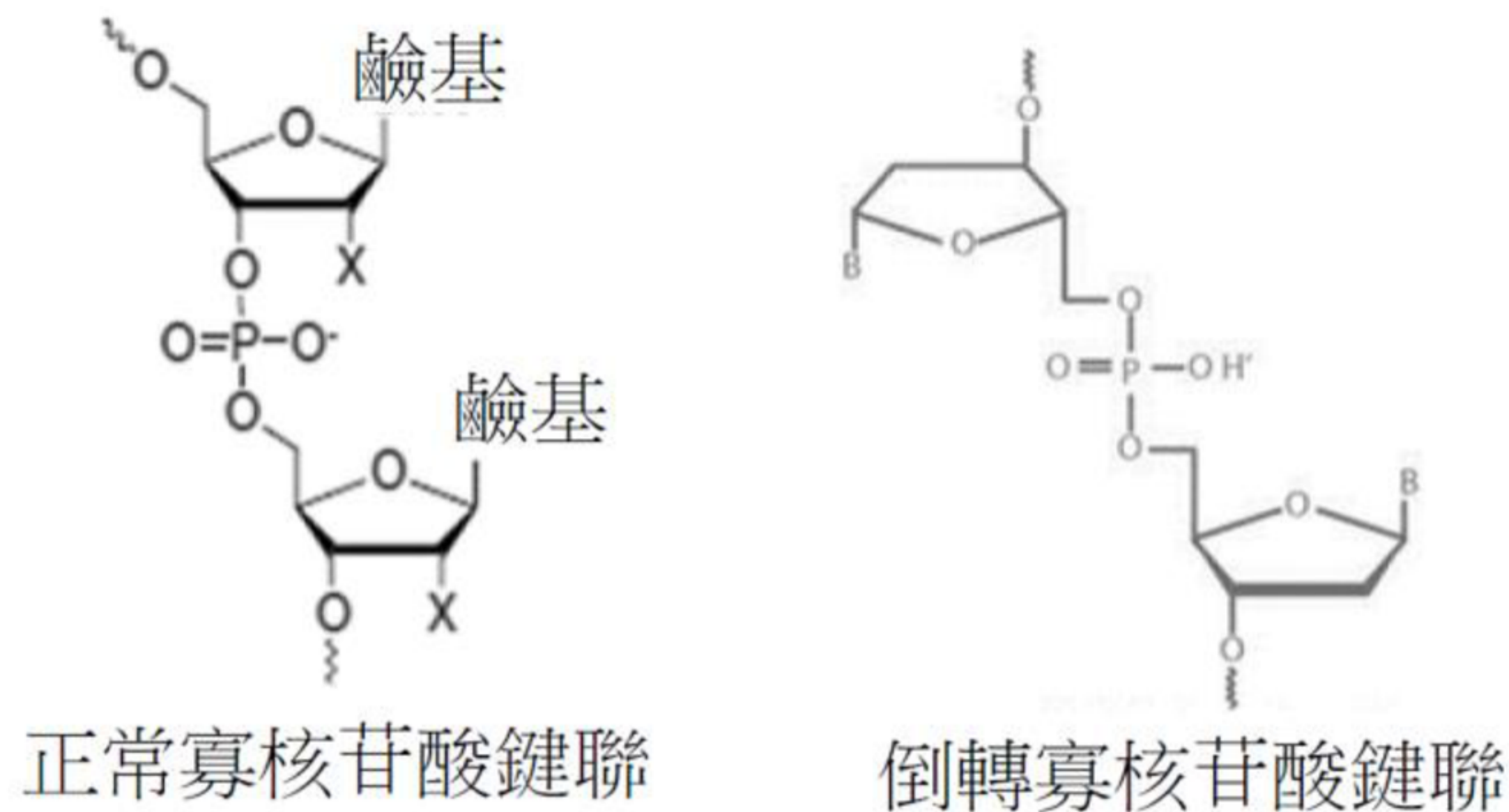
【0231】 下圖顯示將S-取代為非橋聯磷酸酯氧，產生PS鍵來替代磷酸二酯鍵：



【0232】 無鹼基核苷酸係指缺乏含氮鹼基之彼等核苷酸。下圖描述具有缺乏鹼基之無鹼基(亦稱為無嘌呤核酸)位點的寡核苷酸：



【0233】 倒轉鹼基係指具有自正常5'至3'鍵聯倒轉之鍵聯(亦即5'至5'鍵聯或3'至3'鍵聯)之彼等鹼基。舉例而言：



【0234】 無鹼基核苷酸可附接有倒轉鍵聯。舉例而言，無鹼基核苷酸可經由5'至5'鍵聯連接至末端5'核苷酸，或無鹼基核苷酸可經由3'至3'鍵聯連接至末端3'核苷酸。末端5'或3'核苷酸之倒轉無鹼基核苷酸亦可稱為倒轉無鹼基端帽。

【0235】 在一些實施例中，對5'末端之前三、四或五個核苷酸中之一或多者及3'末端之最後三、四或五個核苷酸中之一或多者進行修飾。在一些實施例中，修飾為2'-O-Me、2'-F、倒轉無鹼基核苷酸、PS鍵或此項技術中熟知之其他核苷酸修飾以增加穩定性及/或效能。

【0236】 在一些實施例中，5'末端處之前四個核苷酸，及3'末端處之最後四個核苷酸與硫代磷酸酯(PS)鍵連接。

【0237】 在一些實施例中，5'末端處之前三個核苷酸及3'末端處之最後三個核苷酸包含2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾之核苷酸。在一些實施例中，5'末端處之前三個核苷酸及3'末端處之最後三個核苷酸包含2'-氟(2'-F)修飾之核苷酸。在一些實施例中，5'末端之前三個核苷酸及3'末端之最後三個核苷酸包含倒轉無鹼基核苷酸。

【0238】 在一些實施例中，引導RNA包含經修飾之sgRNA。在一些實施例中，sgRNA包含以SEQ ID NO：401所示之修飾模式，其中N為任

何天然或非天然核苷酸，且其中全部N均包含將核酸酶引導至例如如表1及2中所示之TRBC1、TRBC2及/或TRAC中之目標序列中的引導序列。

**【0239】** 在一些實施例中，引導RNA包含SEQ ID NO：179-184中之任一者中所示之sgRNA。在一些實施例中，引導RNA包含有包含SEQ ID NO：1-178引導序列及SEQ ID NO：401核苷酸中任一者的sgRNA，其中SEQ ID NO：401核苷酸係於引導序列之3'端上，且其中sgRNA可如本文所示經修飾或為SEQ ID NO：300。

**【0240】** 如上文所指出，在一些實施例中，本文所揭示之組合物或調配物包含mRNA，其包含編碼經RNA引導之DNA結合劑，諸如如本文所述之Cas核酸酶之開放閱讀框架(ORF)。在一些實施例中，提供、使用或投與mRNA，其包含編碼經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas核酸酶之ORF。在一些實施例中，編碼經RNA引導之DNA核酸酶之ORF為「經修飾之經RNA引導之DNA結合劑ORF」或簡稱為「經修飾之ORF」，其以簡寫用於指示ORF經修飾。

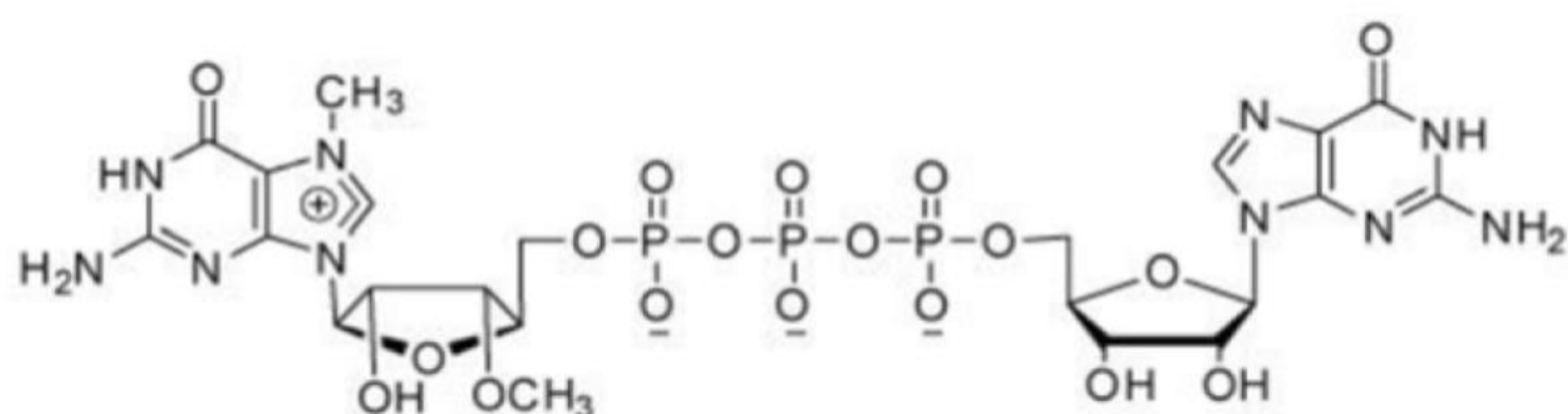
**【0241】** 在一些實施例中，經修飾之ORF可包含至少在一個、複數個或所有尿苷位置包含經修飾之尿苷。在一些實施例中，經修飾之尿苷為在5位，例如用鹵素、甲基或乙基修飾之尿苷。在一些具體實例中，經修飾之尿苷為在1位，例如用鹵素、甲基或乙基修飾之假尿苷。經修飾之尿苷可為例如假尿苷、N1-甲基假尿苷、5-甲氧基尿苷、5-碘尿苷或其組合。在一些實施例中，經修飾之尿苷為5-甲氧基尿苷。在一些實施例中，經修飾之尿苷為5-碘尿苷。在一些實施例中，經修飾之尿苷為假尿苷。在一些實施例中，經修飾之尿苷為N1-甲基-假尿苷。在一些實施例中，經修飾之尿苷為假尿苷及N1-甲基-假尿苷之組合。在一些實施例中，經修飾之

尿苷為假尿苷及5-甲氧基尿苷之組合。在一些實施例中，經修飾之尿苷為N1-甲基假尿苷及5-甲氧基尿苷之組合。在一些實施例中，經修飾之尿苷為5-碘尿苷及N1-甲基-假尿苷之組合。在一些具體實例中，經修飾之尿苷為假尿苷及5-碘尿苷之組合。在一些實施例中，經修飾之尿苷為5-碘尿苷及5-甲氧基尿苷之組合。

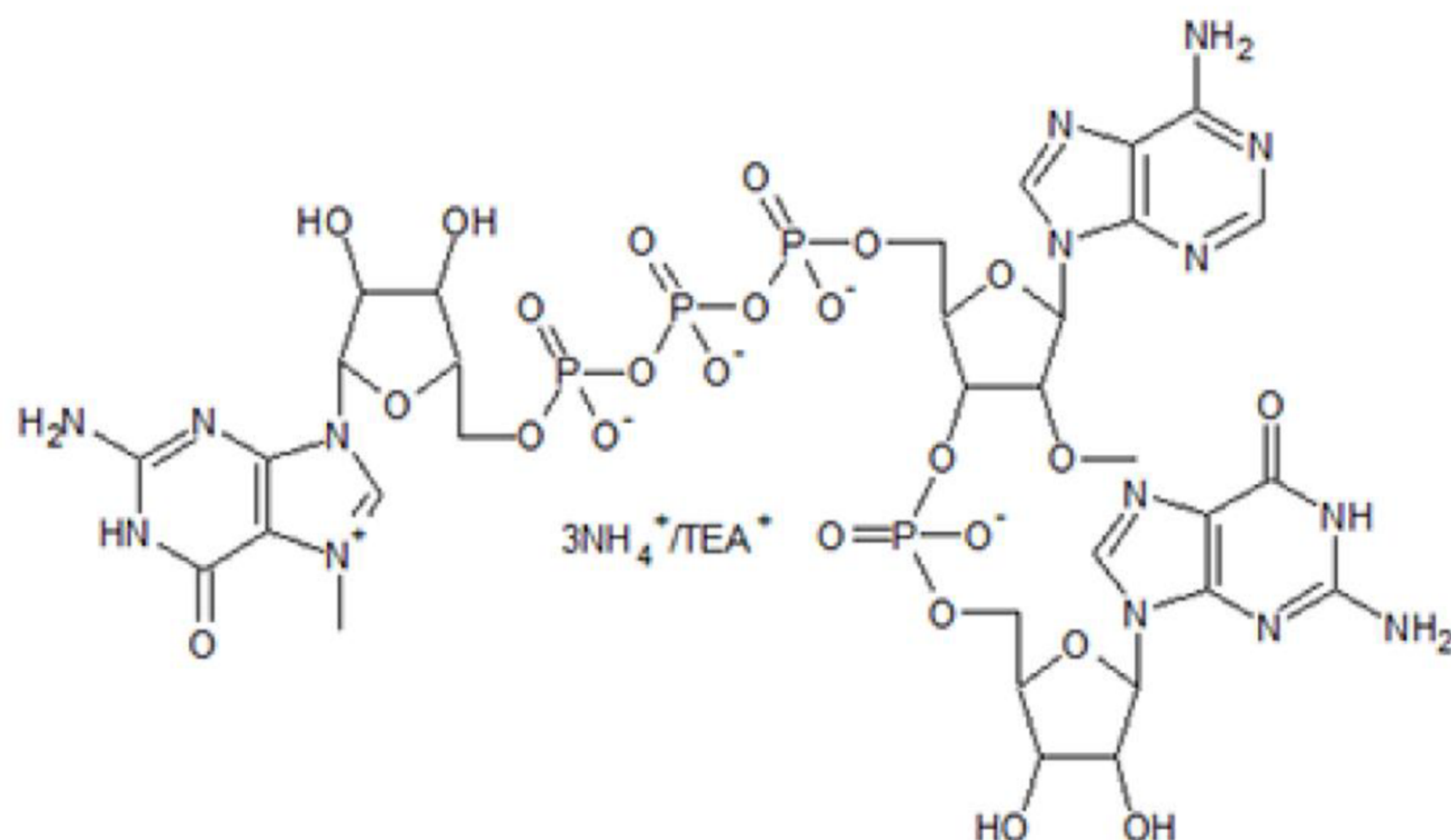
**【0242】** 在一些實施例中，本文所揭示之mRNA包含5'帽，諸如Cap0、Cap1或Cap2。5'帽通常為經由5'-三磷酸連接至mRNA之5'至3'鏈之第一核苷酸之5'位的7-甲基鳥嘌呤核糖核苷酸(其可進一步修飾，如下文例如相對於ARCA所論述)，亦即第一帽近端核苷酸。在Cap0中，mRNA之第一與第二帽近端核苷酸之核糖包含2'-羥基。在Cap1中，mRNA之第一及第二轉錄核苷酸之核糖分別包含2'-甲氧基及2'-羥基。在Cap2中，mRNA之第一與第二帽近端核苷酸之核糖包含2'-甲氧基。參見例如Katibah等人 (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33):12025-30；Abbas等人 (2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114(11):E2106-E2115。大多數內源性高等真核生物mRNA，包括哺乳動物mRNA (諸如人類mRNA)包含Cap1或Cap2。由於根據諸如IFIT-1及IFIT-5之先天性免疫系統之組分辨識為「非自體」，故Cap0及與Cap1及Cap2不同之其他帽結構在諸如人類之哺乳動物中可具免疫原性，此可致使包括第I型干擾素之細胞介素量升高。先天免疫系統之組分，諸如IFIT-1及IFIT-5亦可與eIF4E競爭以結合具有除Cap1或Cap2外之帽的mRNA，此可能會抑制mRNA之轉譯。

**【0243】** 帽可以共轉錄方式包括在內。舉例而言，ARCA (抗反向帽類似物；Thermo Fisher Scientific目錄號AM8045)為包含連接至鳥嘌呤核糖核苷酸之5'位的7-甲基鳥嘌呤3'-甲氧基-5'-三磷酸的帽類似物，其可

在一開始時活體外併入轉錄物中。ARCA產生Cap0帽，其中第一個帽近端核苷酸之2'位為羥基。參見例如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結構展示如下。



【0244】 CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG；TriLink Biotechnologies目錄號N-7113)或CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG；TriLink Biotechnologies目錄號N-7133)可用於以共轉錄方式提供Cap1結構。CleanCap™ AG及CleanCap™ GG之3'-O-甲基化形式亦可分別以目錄號N-7413及N-7433購自TriLink Biotechnologies。CleanCap™ AG結構顯示如下。



【0245】或者，可以轉錄後方式將帽添加至RNA。舉例而言，牛痘病毒加帽酶可為市售的(New England Biolabs目錄號M2080S)，且具有由其D1次單位提供之RNA三磷酸酶及鳥苷醯基轉移酶活性及由其D12次單

位提供之鳥嘌呤甲基轉移酶。因此，在S-腺苷甲硫胺酸及GTP存在下，可將7-甲基鳥嘌呤添加至RNA，以產生Cap0。參見例如Guo, P.及Moss, B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4023-4027；Mao, X.及Shuman, S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 24472-24479。

【0246】 在一些實施例中，mRNA進一步包含聚腺苷酸化(poly-A)尾。在一些實施例中，poly-A尾包含至少20、30、40、50、60、70、80、90或100個腺嘌呤，視情況多至300個腺嘌呤。在一些實施例中，poly-A尾包含95、96、97、98、99或100個腺嘌呤核苷酸。

### C. 核糖核蛋白複合物

【0247】 在一些實施例中，涵蓋一種組合物，其包含一或多種gRNA，包含表1及2之一或多種引導序列或表3之一或多種sgRNA，及經RNA引導之DNA結合劑，例如核酸酶，諸如Cas核酸酶，諸如Cas9。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑，例如Cas9，具有裂解酶活性，其亦可稱為雙股核酸內切酶活性。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑包含Cas9核酸酶。Cas9核酸酶之實例包括釀膿鏈球菌(*S. pyogenes*)、金黃色葡萄球菌(*S. aureus*)及其他原核生物(參見例如下一段落中之清單)之第II型CRISPR系統者及其經修飾(例如經工程改造或突變型)形式。參見例如US2016/0312198 A1；US 2016/0312199 A1。Cas核酸酶之其他實例包括第III型CRISPR系統之Csm或Cmr複合物或其Cas10、Csm1或Cmr2次單元；及第I型CRISPR系統之級聯複合物，或其Cas3次單元。在一些實施例中，Cas核酸酶可來自第IIA型、第IIB型或第IIC型系統。對於不同CRISPR系統及Cas核酸酶之論述，參見例如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)。

【0248】可衍生Cas核酸酶之非限制性例示性物種包括釀膿鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、嗜熱鏈球菌(*Streptococcus thermophilus*)、鏈球菌屬、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、無害李氏菌(*Listeria innocua*)、加氏乳桿菌(*Lactobacillus gasseri*)、新兇手弗朗西斯氏菌 (*Francisella novicida*)、產琥珀酸沃廉菌(*Wolinella succinogenes*)、華德薩特菌(*Sutterella wadsworthensis*)、伽馬變形菌 (*Gammaproteobacterium*)、奈瑟氏腦膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、空腸彎曲桿菌(*Campylobacter jejuni*)、多殺巴斯德菌(*Pasteurella multocida*)、產琥珀酸纖維桿菌(*Fibrobacter succinogene*)、深紅紅螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*)、達松維爾擬諾卡氏菌(*Nocardiopsis dassonvillei*)、始旋鏈黴菌(*Streptomyces pristinaespiralis*)、產綠色鏈黴菌(*Streptomyces viridochromogenes*)、產綠色鏈黴菌、粉紅鏈孢囊菌 (*Streptosporangium roseum*)、粉紅鏈孢囊菌、嗜酸熱脂環桿菌 (*Alicyclobacillus acidocaldarius*)、假蕈狀芽孢桿菌(*Bacillus pseudomycooides*)、砷還原芽孢桿菌(*Bacillus selenitireducens*)、西伯利亞微小桿菌(*Exiguobacterium sibiricum*)、戴白氏乳桿菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、唾液乳桿菌(*Lactobacillus salivarius*)、布氏乳桿菌 (*Lactobacillus buchneri*)、齒垢密螺旋體(*Treponema denticola*)、海洋微顫菌(*Microscilla marina*)、伯克霍爾德氏細菌(*Burkholderiales bacterium*)、食萘單胞菌(*Polaromonas naphthalenivorans*)、單胞菌屬 (*Polaromonas sp.*)、瓦氏鱷球藻(*Crocospaera watsonii*)、鱷球藻屬、銅

綠微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、聚球藻屬(*Synechococcus sp.*)、阿拉伯糖醋桿菌(*Acetohalobium arabaticum*)、根制氨菌(*Ammonifex degensii*)、熱解纖維素菌(*Caldicelulosiruptor becscii*)、金礦菌(*Candidatus Desulforudis*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、艱難梭菌(*Clostridium difficile*)、大芬戈爾德菌(*Finegoldia magna*)、嗜熱鹽鹼厭氧菌(*Natranaerobius thermophilus*)、熱丙酸消化腸狀菌(*Pelotomaculum thermopropionicum*)、嗜酸性喜溫硫桿菌(*Acidithiobacillus caldus*)、嗜酸氧化亞鐵硫桿菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、酒色異著色菌(*Allochromatium vinosum*)、海桿菌屬、嗜鹽亞硝化球菌(*Nitrosococcus halophilus*)、瓦氏亞硝化球菌(*Nitrosococcus watsoni*)、遊海假交替單胞菌(*Pseudoalteromonas haloplanktis*)、消旋纖維線桿菌(*Ktedonobacter racemifer*)、甲烷鹽菌(*Methanohalobium evestigatum*)、變異念珠藻(*Anabaena variabilis*)、泡沫節球藻(*Nodularia spumigena*)、念珠藻屬(*Nostoc sp.*)、極大節旋藻(*Arthrospira maxima*)、鈍頂節旋藻(*Arthrospira platensis*)、節旋藻屬、螺旋藻屬(*Lyngbya sp.*)、原型微鞘藻(*Microcoleus chthonoplastes*)、顫藻屬(*Oscillatoria sp.*)、運動石袍菌(*Petrotoga mobilis*)、非洲高熱桿菌(*Thermosiphon africanus*)、巴氏鏈球菌(*Streptococcus pasteurianus*)、灰色奈瑟球菌(*Neisseria cinerea*)、紅嘴鷗彎曲桿菌(*Campylobacter lari*)、食清潔劑細小棒菌(*Parvibaculum lavamentivorans*)、白喉棒狀桿菌(*Corynebacterium diphtheria*)、胺基酸球菌屬(*Acidaminococcus sp.*)、毛螺科菌(*Lachnospiraceae bacterium*)ND2006及海洋無核氯菌(*Acaryochloris marina*)。

【0249】 在一些實施例中，Cas核酸酶為來自釀膿鏈球菌之Cas9核酸酶。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自嗜熱鏈球菌之Cas9核酸酶。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自奈瑟氏腦膜炎菌之Cas9核酸酶。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自金黃色葡萄球菌之Cas9核酸酶。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自新兇手弗朗西斯氏菌之Cpf1核酸酶。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自胺基酸球菌屬之Cpf1核酸酶。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自毛螺科菌ND2006之Cpf1核酸酶。在其他實施例中，Cas核酸酶為來自以下之Cpf1核酸酶：土拉熱弗朗西絲菌(*Francisella tularensis*)、毛螺科菌、瘤胃溶纖維丁酸弧菌(*Butyrivibrio proteoclasticus*)、佩氏細菌(*Peregrinibacteria bacterium*)、帕庫氏菌(*Parcubacteria bacterium*)、史密斯氏菌(*Smithella*)、胺基酸球菌屬、白蟻甲烷支原體菌候選種(*Candidatus Methanoplasma termitum*)、挑剔真桿菌(*Eubacterium eligens*)、牛眼莫拉菌(*Moraxella bovoculi*)、稻田鉤端螺旋體(*Leptospira inadai*)、狗口腔卟啉單胞菌(*Porphyromonas crevioricanis*)、解糖腺普雷沃菌(*Prevotella disiens*)或獼猴卟啉單胞菌(*Porphyromonas macacae*)。在某些實施例中，Cas核酸酶為來自胺基酸球菌屬或毛螺菌科之Cpf1核酸酶。

【0250】 在一些實施例中，gRNA連同經RNA引導之DNA結合劑一起稱為核糖核蛋白複合物(RNP)。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑為Cas核酸酶。在一些實施例中，gRNA連同Cas核酸酶一起稱為Cas RNP。在一些實施例中，RNP包含第I型、第II型或第III型組分。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自第II型CRISPR/Cas系統之Cas9蛋白質。在一些具體實例中，gRNA連同Cas9一起稱為Cas9 RNP。

【0251】 野生型Cas9具有兩個核酸酶域：RuvC及HNH。RuvC域裂解非目標DNA股，且HNH域裂解目標DNA股。在一些實施例中，Cas9蛋白質包含多於一個RuvC域及/或多於一個HNH域。在一些實施例中，Cas9蛋白質為野生型Cas9。在組合物、用途及方法實施例中之各者中，Cas誘導目標DNA中之雙股斷裂。

【0252】 在一些實施例中，使用嵌合Cas核酸酶，其中該蛋白質之一個域或區經不同蛋白質之一部分置換。在一些實施例中，Cas核酸酶域可經來自諸如Fok1之不同核酸酶的域置換。在一些實施例中，Cas核酸酶可為經修飾之核酸酶。

【0253】 在其他實施例中，Cas核酸酶可來自第I型CRISPR/Cas系統。在一些實施例中，Cas核酸酶可為第I型CRISPR/Cas系統之級聯複合物之組分。在一些實施例中，Cas核酸酶可為Cas3蛋白質。在一些實施例中，Cas核酸酶來自第III型CRISPR/Cas系統。在一些實施例中，Cas核酸酶可具有RNA裂解活性。

【0254】 在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑具有單股切口酶活性，亦即可切割一個DNA股以產生單股斷裂，亦稱為「切口」。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑包含Cas切口酶。切口酶為在dsDNA中產生切口，亦即切割一個股但不切割DNA雙螺旋之另一股的酶。在一些實施例中，Cas切口酶為其中例如藉由催化域之一或多種改變(例如點突變)，使核酸內切酶活性位點不活化的Cas核酸酶之形式(例如上文所論述之Cas核酸酶)。參見例如關於Cas切口酶及例示性催化域改變之論述之美國專利第8,889,356號。在一些實施例中，Cas切口酶，諸如Cas9切口酶具有不活化之RuvC或HNH域。

【0255】 在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑經修飾而僅含有一個功能核酸酶域。舉例而言，藥劑蛋白質可經修飾以使得核酸酶域中之一者經突變或完全或部分缺失以降低其核酸裂解活性。在一些實施例中，使用具有活性降低之RuvC域之切口酶。在一些實施例中，使用具有非活性RuvC域之切口酶。在一些實施例中，使用具有活性降低之HNH域之切口酶。在一些實施例中，使用具有非活性HNH域之切口酶。

【0256】 在一些實施例中，Cas蛋白質核酸酶域中之保守胺基酸經取代以降低或改變核酸酶活性。在一些實施例中，Cas核酸酶可在RuvC或類RuvC核酸酶域中包含胺基酸取代。RuvC或類RuvC核酸酶域中之例示性胺基酸取代包括D10A (基於釀膿鏈球菌Cas9蛋白質)。參見例如Zetsche等人 (2015) *Cell* Oct 22:163(3): 759-771。在一些實施例中，Cas核酸酶可包含HNH或類HNH核酸酶域中之胺基酸取代。HNH或類HNH核酸酶域中之例示性胺基酸取代包括E762A、H840A、N863A、H983A及D986A (基於釀膿鏈球菌Cas9蛋白質)。參見例如Zetsche等人 (2015)。其他例示性胺基酸取代包括D917A、E1006A及D1255A (基於新兇手弗朗西斯氏菌U112 Cpf1 (FnCpf1)序列(UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1\_FRATN)))。

【0257】 在一些實施例中，編碼切口酶之mRNA將與一對分別與目標序列之有義股及反義股互補之引導RNA組合提供。在此實施例中，引導RNA將切口酶引導至目標序列且藉由在目標序列之相對股上產生切口引入DSB (亦即雙切口)。在一些實施例中，使用雙切口可提高特異性及減少脫靶效應。在一些實施例中，連同目標DNA之相對股之兩個個別引導RNA使用切口酶以在目標DNA中產生雙切口。在一些實施例中，連同經選擇以非常接近之兩個個別引導RNA使用切口酶以在目標DNA中產生雙

切口。

**【0258】** 在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑缺乏裂解酶及切口酶活性。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑包含dCas DNA結合多肽。dCas多肽具有DNA結合活性，而基本上缺乏催化(裂解酶/切口酶)活性。在一些實施例中，dCas多肽為dCas9多肽。在一些實施例中，缺乏裂解酶及切口酶活性之經RNA引導之DNA結合劑或dCas DNA結合多肽為其中例如藉由催化域之一或多種改變(例如點突變)，使核酸內切酶活性位點不活化的Cas核酸酶之形式(例如上文所論述之Cas核酸酶)。參見例如US 2014/0186958 A1；US 2015/0166980 A1。

**【0259】** 在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑包含一或多個異源功能域(例如為或包含融合多肽)。

**【0260】** 在一些實施例中，異源功能域可促進將經RNA引導之DNA結合劑輸送至細胞核中。舉例而言，異源功能域可為核定位信號(NLS)。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可與1至10個NLS融合。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可與1至5個NLS融合。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可與一個NLS融合。在使用一個NLS之情況下，NLS可連接於經RNA引導之DNA結合劑序列之N端或C端處。其亦可插入經RNA引導之DNA結合劑序列內。在其他實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可與多於一個NLS融合。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可與2、3、4或5個NLS融合。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可與兩個NLS融合。在某些情況下，兩個NLS可相同(例如兩個SV40 NLS)或不同。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑與連接在羧基末端處之兩個SV40 NLS序列融合。在一些實施例中，經

RNA引導之DNA結合劑可與兩個NLS融合，一個NLS連接在N端處且一個連接在C端處。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可與3個NLS融合。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可不與NLS融合。在一些實施例中，NLS可為單聯(monopartite)序列，諸如SV40 NLS、PKKKRKV (SEQ ID NO：600)或PKKKRRV (SEQ ID NO：601)。在一些實施例中，NLS可為雙聯序列，諸如核質蛋白之NLS、KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO：602)。在一特定實施例中，單一PKKKRKV (SEQ ID NO：600) NLS可連接在經RNA引導之DNA結合劑之C端處。一或多個連接子視情況包括在融合位點處。

**【0261】** 在一些實施例中，異源功能域可能夠修改經RNA引導之DNA結合劑的細胞內半衰期。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑之半衰期可得以提高。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑之半衰期可得以降低。在一些實施例中，異源功能域可能夠增加經RNA引導之DNA結合劑的穩定性。在一些實施例中，異源功能域可能夠降低經RNA引導之DNA結合劑的穩定性。在一些實施例中，異源功能域可充當蛋白質降解之信號肽。在一些實施例中，蛋白質降解可由蛋白水解酶，諸如蛋白酶體、溶酶體蛋白酶或鈣蛋白酶蛋白酶介導。在一些實施例中，異源功能域可包含PEST序列。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可藉由添加泛素或多泛素鏈來修飾。在一些實施例中，泛素可為類泛素蛋白質(UBL)。類泛素蛋白質之非限制性實例包括小類泛素修飾因子(SUMO)、泛素交叉反應蛋白(UCRP，亦稱為干擾素刺激基因-15 (ISG15))、泛素相關修飾因子-1 (URM1)、神經元-前驅體-細胞表現之發育下調蛋白-8 (NEDD8，在釀酒酵母(*S. cerevisiae*)中亦稱為Rub1)、人類

白血球抗原F相關(FAT10)、自噬-8 (ATG8)及自噬-12 (ATG12)、Fau類泛素蛋白(FUB1)、膜錨定UBL (MUB)、泛素摺疊修飾因子-1 (UFM1)及類泛素蛋白-5 (UBL5)。

**【0262】** 在一些實施例中，異源功能域可為標記域。標記域之非限制性實例包括螢光蛋白質、純化標籤、抗原決定基標籤及報導基因序列。在一些實施例中，標記域可為螢光蛋白。適合之螢光蛋白之非限制實例包括綠色螢光蛋白(例如GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、sfGFP、EGFP、翡翠色(Emerald)、Azami綠(Azami Green)、單Azami綠(Monomeric Azami Green)、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1)、黃色螢光蛋白(例如YFP、EYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1)、藍色螢光蛋白(例如EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal、GFPuv、藍寶石色(Sapphire)、T-藍寶石色(T-sapphire))、強化型藍螢光蛋白(例如ECFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、Midoriishi強化型藍(Midoriishi-Cyan))、紅色螢光蛋白(例如mKate、mKate2、mPlum、DsRed單色、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed單色、HcRed串色、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、Jred)及橙色螢光蛋白(mOrange、mKO、Kusabira橙色(Kusabira-Orange)、單Kusabira橙色(Monomeric Kusabira-Orange)、mTangerine、tdTomato)或任何其他適合之螢光蛋白。在其他實施例中，標記域可為純化標籤及/或抗原決定基標籤。非限制性之例示性標籤包括麩胱甘肽-S-轉移酶(glutathione-S-transferase, GST)、殼質結合蛋白(CBP)、麥芽糖結合蛋白(MBP)、硫氧還蛋白(thioredoxin, TRX)、聚(NANP)、串聯親和純化(tandem affinity purification, TAP)標籤、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、6×His、8×His、生物素羧基載體蛋白(BCCP)、聚His及調鈣蛋白。非限制性之例示性報導基因包括麩胱甘肽-S-轉移酶(GST)、辣根過氧化酶(HRP)、氯黴素乙醯基轉移酶(CAT)、β-半乳糖苷酶、β-葡糖苷酸酶、螢光素酶或螢光蛋白。

【0263】 在其他實施例中，異源功能域可將經RNA引導之DNA結合劑靶向至特定細胞器、細胞型、組織或器官。在一些實施例中，異源功能域可將經RNA引導之DNA結合劑靶向至粒線體。

【0264】 在其他實施例中，異源功能域可為效應子域。當經RNA引導之DNA結合劑導引至其目標序列時，例如當Cas核酸酶藉由gRNA導引至目標序列時，效應子域可修飾或影響目標序列。在一些實施例中，效應子域可選自核酸結合域、核酸酶域(例如非Cas核酸酶域)、表觀遺傳修飾域、轉錄活化域或轉錄抑制子域。在一些實施例中，異源功能域為核酸酶，諸如FokI核酸酶。參見例如美國專利第9,023,649號。在一些實施例中，異源功能域為轉錄活化因子或抑制子。參見例如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，經RNA引導之DNA結合劑基本上變成可使用引導RNA引導以結合所需目標序列之轉錄因子。

#### D. gRNA功效之測定

**【0265】** 在一些實施例中，當與RNP之其他組分一起遞送或表現時，測定gRNA之功效。在一些實施例中，gRNA與經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白質，例如Cas9一起表現。在一些實施例中，gRNA於已穩定表現經RNA引導之DNA核酸酶，諸如Cas核酸酶或切口酶，例如Cas9核酸酶或切口酶之細胞株中遞送或表現。在一些實施例中，gRNA作為RNP之一部分遞送至細胞。在一些實施例中，將gRNA以及mRNA遞送至細胞，該mRNA編碼經RNA引導之DNA核酸酶，諸如Cas核酸酶或切口酶，例如Cas9核酸酶或切口酶。

**【0266】** 如本文所述，使用本文所揭示之經RNA引導之DNA核酸酶及引導RNA可導致DNA中之雙股斷裂，該等雙股斷裂可在藉由細胞機械設備修復時產生呈插入或缺失(插入或缺失)突變形式之誤差。歸因於插入或缺失之多種突變會改變閱讀框架或過早地引入終止密碼子，且因此產生非功能性蛋白質。

**【0267】** 在一些實施例中，特定gRNA之功效係基於活體外模型而判定。在一些實施例中，活體外模型為穩定地表現Cas9之HEK293細胞(HEK293\_Cas9)。在一些實施例中，活體外模型為周邊血液單核細胞(PBMC)。在一些實施例中，活體外模型為T細胞，諸如初級人類T細胞。相對於使用初級細胞，可使用市售初級細胞以在實驗之間提供較大一致性。在一些實施例中，活體外模型中(例如在T細胞中)發生缺失或插入之脫靶位點數目例如藉由分析來自經Cas9 mRNA及引導RNA活體外轉染之

細胞之基因組DNA來測定。在一些實施例中，此類測定包含分析來自經Cas9 mRNA、引導RNA及供體寡核苷酸活體外轉染之細胞之基因組DNA。使用HEK293細胞、PBMC及人類CD3<sup>+</sup> T細胞之實施例中提供用於此類測定之例示性程序。

**【0268】** 在一些實施例中，在用於gRNA選擇程序之多個活體外細胞模型上測定特定gRNA之功效。在一些實施例中，在所選gRNA之資料下進行細胞株比較。在一些實施例中，在多個細胞模型中進行交叉篩選。

**【0269】** 在一些實施例中，藉由TRBC1、TRBC2及/或TRAC之插入或缺失百分比量測引導RNA之功效。在一些實施例中，藉由TRBC及/或TRAC之插入或缺失百分比量測引導RNA之功效。在一些實施例中，藉由TRBC或TRAC之插入或缺失百分比量測引導RNA之功效。在一些實施例中，將TRBC1、TRBC2及/或TRAC之編輯百分比與實現TRBC1、TRBC2及/或TRAC蛋白質產物之阻斷基因表現所需之插入或缺失百分比相比。

**【0270】** 在一些實施例中，藉由T細胞受體(TCR)組分之表現降低或去除量測引導RNA之功效。在實施例中，T細胞受體(TCR)組分之表現降低或去除包括TRAC、TRBC1、TRBC2、CD3E、CD3G及/或CD3D之表現降低或去除。在實施例中，該TCR組分之表現降低或去除為一或多個，例如一或兩個，例如一個本文所述之gRNA分子之引入至該TCR組分達至該細胞中之結果。在實施例中，TCR組分之表現降低或去除如藉由流式細胞測量術，例如如本文所述來量測。

**【0271】** 在一些實施例中，藉由目標細胞類型(諸如T細胞)之基因組內之脫靶序列之插入或缺失之數目及/或頻率來量測引導RNA之功效。在

一些實施例中，提供有效引導RNA，其在細胞群體中及/或相對於靶點之插入或缺失產生頻率在脫靶位點以極低頻率(例如<5%)產生插入或缺失。因此，本發明提供引導RNA，其並不展現目標細胞類型(例如T細胞)中之脫靶插入或缺失形成，或其在細胞群體中及/或相對於靶點之插入或缺失產生頻率產生<5%之脫靶插入或缺失形成頻率。在一些實施例中，本發明提供並不展現目標細胞類型(例如T細胞)中之任何脫靶插入或缺失形成之引導RNA。在一些實施例中，例如如藉由一或多種本文所述方法所評估，提供在少於5個脫靶位點產生插入或缺失之引導RNA。在一些實施例中，例如如藉由一或多種本文所述方法所評估，提供在少於或等於4、3、2或1個脫靶位點產生插入或缺失之引導RNA。在一些實施例中，脫靶位點不出現於目標細胞(例如肝細胞)基因組中之蛋白質編碼區中。

**【0272】** 在一些實施例中，偵測基因編輯事件，諸如目標DNA中之插入或缺失(「插入或缺失(indel)」)突變之形成及同源定向修復(HDR)事件會利用伴隨經標記之引子且分離經標記之擴增產物的線性擴增(後文稱為「LAM-PCR」或「線性擴增(LA)」法)。

**【0273】** 在一些實施例中，藉由包含基因之所表現蛋白產物的功能蛋白複合物之含量來量測引導RNA之功效。在一些實施例中，藉由TCR表現之流動式細胞量測分析來量測引導RNA之功效，經編輯活細胞群體藉由該分析來分析TCR之缺失。

### III. 包括治療方法及製備經工程改造之細胞或免疫療法試劑之方法的方法

**【0274】** 本文所揭示之gRNA及相關方法及組成物適用於免疫療法及適用於製造免疫療法試劑，諸如經工程改造之細胞。

**【0275】** 在一些實施例中，包含表1或2之引導序列的gRNA與經

RNA引導之DNA核酸酶一起誘導DSB，且修復期間之非同源末端連接(NHEJ)會引起TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中發生突變。在一些實施例中，NHEJ致使核苷酸缺失或插入，其誘導TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中發生框移或無意義突變。

**【0276】** 在一些實施例中，個體為哺乳動物。在一些實施例中，個體為人類。在一些實施例中，個體為母牛、豬、猴、綿羊、狗、貓、魚或家禽。

**【0277】** 在一些實施例中，使用包含表1或2之引導序列中之任何一或多者或表3之一或多種sgRNA的引導RNA(例如在本文所提供之組合物中)製備用於治療需要免疫療法之人類個體之藥劑。

**【0278】** 在一些實施例中，引導RNA、組合物及調配物用於離體產生具有突變之TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因的T細胞。經修飾T細胞可為自然殺手(NK) T細胞。經修飾T細胞可表現T細胞受體，諸如普遍TCR或經修飾TCR。T細胞可表現CAR或具有 $\zeta$ 鏈信號傳導基元之CAR構築體。

**【0279】** 在一些實施例中，單次投與包含本文提供之引導RNA的組合物足以減少TRBC1、TRBC2或TRAC表現。在其他實施例中，投與包含本文提供之引導RNA的組合物超過一次可有益於增加治療功效。

### 遞送gRNA組合物

**【0280】** 脂質奈米粒子(LNP)為適用於遞送核苷酸及蛋白質貨物之手段，且可用於遞送本文所揭示之引導RNA、組合物或醫藥調配物。在一些實施例中，LNP遞送核酸、蛋白質、或核酸連同蛋白質一起。

**【0281】** 引導RNA或其他核酸(例如編碼多肽之核酸)可與脂質奈米

粒子(LNP)締合。適合之LNP在此項技術中已知。參見例如 PCT/US2018/053559、WO/2017/173054、WO2015/095340及 WO2014/136086以及其中所提供之參考文獻之脂質。

**【0282】** 在一些實施例中，本發明包含一種向個體遞送本文所揭示之gRNA中任一者之方法，其中該gRNA經由LNP遞送。在一些實施例中，gRNA/LNP亦與Cas9或編碼Cas9之mRNA締合。

**【0283】** 在一些實施例中，本發明包含一種包含所揭示gRNA中之任一者及LNP之組合物。在一些實施例中，組合物進一步包含Cas9或編碼Cas9之mRNA。

**【0284】** 在一些實施例中，LNP包含可電離脂質。在一些實施例中，LNP包含十八-9,12-二烯酸(9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯(亦稱為(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯酸3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯)或另一可電離脂質。參見例如PCT/US2018/053559 (2018年9月28日申請)、WO/2017/173054、WO2015/095340及 WO2014/136086以及其中所提供之參考文獻之脂質。在一些實施例中，在LNP脂質之情形下，術語陽離子型及可電離可互換，例如其中可電離脂質視pH而定為陽離子型的。

**【0285】** 在一些實施例中，與本文所揭示之gRNA締合之LNP用於製備供治療疾病或病症用之藥劑。

**【0286】** 電穿孔為適用於遞送貨物之另一手段，且任何電穿孔方法均可用於遞送本文所揭示之gRNA中之任一者。在一些實施例中，電穿孔可用於遞送本文所揭示之gRNA中之任一者及Cas9或編碼Cas9之mRNA。

【0287】 在一些實施例中，本發明包含一種向細胞離體遞送本文所揭示之gRNA中任一者之方法，其中該gRNA與LNP締合或不與LNP締合。在一些實施例中，gRNA/LNP或gRNA亦與Cas9或編碼Cas9之mRNA締合。

【0288】 在一些實施例中，單獨或在一或多個載體上經編碼之本文所述之引導RNA組合物係在脂質奈米粒子中調配或經由脂質奈米粒子投予；參見例如WO/2017/173054，其內容以全文引用之方式併入本文中。

【0289】 在某些實施例中，本發明包含DNA或RNA載體，其編碼包含本文所述之引導序列中之任何一或多者的引導RNA中之任一者。在一些實施例中，除引導RNA序列以外，載體進一步包含不編碼引導RNA之核酸。不編碼引導RNA之核酸包括(但不限於)啟動子、增強子、調節序列及編碼經RNA引導之DNA核酸酶(其可為核酸酶，諸如Cas9)之核酸。在一些實施例中，載體包含一或多個編碼crRNA、trRNA或crRNA及trRNA之核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含一或多個編碼sgRNA及mRNA之核苷酸序列，該mRNA編碼經RNA引導之DNA核酸酶，其可為Cas核酸酶，諸如Cas9或Cpf1。在一些實施例中，載體包含一或多個編碼crRNA、trRNA及mRNA之核苷酸序列，該mRNA編碼經RNA引導之DNA核酸酶，其可為Cas蛋白質，諸如Cas9。在一個實施例中，Cas9係來自釀膿鏈球菌(亦即Spy Cas9)。在一些實施例中，編碼crRNA、trRNA或crRNA及trRNA (其可為sgRNA)之核苷酸序列包含或由以下組成：側接來自天然產生之CRISPR/Cas系統的重複序列之全部或一部分的引導序列。包含或由crRNA、trRNA或crRNA及trRNA組成之核酸可進一步構成載體序列，其中該載體序列包含或由以下組成：不會與crRNA、trRNA或

crRNA及trRNA一起經天然發現的核酸。

**【0290】** 在一些實施例中，組分可以裸核酸形式、以與諸如脂質體或泊洛沙姆之藥劑複合之核酸的形式引入，或其可以核酸(例如gRNA)及呈核糖核蛋白複合物(RNP)之蛋白質形式引入。在一些實施例中，組分可藉由諸如病毒載體(例如腺病毒、AAV、疱疹病毒、反轉錄病毒、慢病毒)之載體遞送。用於非病毒遞送核酸之方法及組合物包括電穿孔、脂質體轉染、顯微注射、基因槍、病毒顆粒、脂質體、免疫脂質體、LNP、聚陽離子或脂質：核酸結合物、裸核酸(例如裸DNA/RNA)、人工病毒粒子及經藥劑增強之DNA攝取。使用例如Sonitron 2000系統(Rich-Mar)進行之聲致穿孔亦可用於遞送核酸。

**【0291】** 多肽可藉由將諸如編碼所關注多肽之核酸模板的核酸遞送至細胞引入至細胞中。核酸模板可編碼視情況作為表現卡匣之一部分的所關注多肽，其中該模板另外包含側接序列。此類側接序列視情況為經設計以促成細胞中同源定向修復及模板核酸之整合的同源臂。核酸模板可包括側接與第一目標基因座同源之序列以促成目標基因座之同源重組之用於所關注多肽之開放閱讀框架(ORF)。模板可包括側接gRNA裂解位點之同源臂，例如其中同源臂包含側接序列。在某些實施例中，側接序列經設計以省略裂解位點或周圍之目標基因座區，以產生此區缺失，因此防止修復後之位點切割且亦防止gRNA/Cas9切割模板核酸。包括gRNA裂解位點之省略之區或「間隙」之長度可為5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150或更多個核苷酸。側接序列可經設計以缺失例如10至100個核苷酸間隙、10至50個核苷酸間隙、25至100個核苷酸間隙或50至100個核苷酸間隙。

【0292】 編碼所關注多肽之核酸可包含於病毒模板或非病毒模板中。病毒載體可為任何適合之病毒，諸如反轉錄病毒、腺病毒、慢病毒、腺相關病毒或其雜合體。在一些實施例中，病毒載體可為腺相關病毒(AAV)載體。核酸模板在ORF上游可包含外源性啟動子序列。核酸模板可為無啟動子的，因為內源性TRAC啟動子在插入其之後可驅動所關注多肽表現。

【0293】 除編碼所關注多肽之序列以外，核酸模板可包含啟動子序列、Kozak序列、IRES序列、剪接受體、polyA序列及編碼諸如P2A、T2A、E2A及其類似物之可裂解肽之序列中之一或多者。

【0294】 在一些實施例中，本文所述之方法進一步包含向細胞遞送一或多種序列，該或該等序列包含一或多種編碼一或多種所關注多肽之基因。在一些實施例中，所關注多肽涉及調節免疫耐受性。在一些實施例中，所關注多肽涉及調節癌症表現型。

【0295】 在一些實施例中，一或多種多肽包含受體，例如免疫受體。免疫受體意謂可識別抗原之受體。免疫受體之例示性類型為T細胞受體(TCR)及嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，免疫受體識別癌症抗原，諸如WT1。在某些實施例中，所關注多肽為WT1 TCR。WT1 TCR可識別VLDFAPPGA (VLD)或RMFPNAPYL (RMF) WT1肽。在某些具體實施例中，WT1 TCR識別VLD肽。所關注多肽可包含WT1 TCR  $\alpha$ 鏈。所關注多肽可包含WT1 TCR  $\beta$ 鏈。在某些實施例中，所關注多肽可包含WT1 TCR  $\alpha$ 鏈及WT1 TCR  $\beta$ 鏈。示例性WT1特異性TCR序列在此項技術中已知且包括：

表4

TCR ID	胺基酸序列	SEQ ID NO:
TCR-A ( $\beta$ -鏈接子- $\alpha$ 組態)	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRKTGGY SNQPQHFGDGTRLSILEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRGGSGAT NFSLLKQAGDVEENPGPMETLLKVLSGTLLWQLTWVRSQ QPVQSPQAVILREGEDAVINCSSSKALYSVHWYRQKHGEA PVFLMILLKGGEQKGHEKISASFNEKKQQSSLYLTASQLS YSGTYFCGTAWINDYKLSFGAGTTVTVRANIQNPDPAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLL MTLRLWSS	500
TCR-A, $\alpha$ 鏈	METLLKVLSGTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGEDAV INCSSSKALYSVHWYRQKHGEAPVFLMILLKGGEQKGHE KISASFNEKKQQSSLYLTASQLSYSGTYFCGTAWINDYKLS FGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNL NFQNL SVIGFRILLK VAGFNLL MTLRLWSS	501
TCR-A, $\beta$ 鏈	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRKTGGY SNQPQHFGDGTRLSILEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG	502
TCR-B ( $\beta$ -鏈接子- $\alpha$ 組態)	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRKTGGY SNQPQHFGDGTRLSILEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ	503

	KATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRGGSGAT NFSLLKQAGDVEENPGPMETLLKVLSGTLLWQLTWVRSQ QPVQSPQAVILREGEDAVINCSSSKALYSVHWYRQKHGEA PVFLMILLKGGEQKGHEKISASFNEKKQQSSLYLTASQLS YSGTYFCGTAWINDYKLSFGAGTTVTVRANIQNPDPAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLL MTLRLWSS	
TCR-B, $\alpha$ 鏈	METLLKVLSGTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGEDAV INCSSSKALYSVHWYRQKHGEAPVFLMILLKGGEQKGHE KISASFNEKKQQSSLYLTASQLSYSGTYFCGTAWINDYKLS FGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNL NFQNL SVIGFRILLK VAGFNLL MTLRLWSS	504
TCR-B, $\beta$ 鏈	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHDYLFWYRQTM MRGLELLIYFN NNVPIDDSGM PEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRKTGGY SNQPQHFGDGTRLSILEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG	505
TCR-C ( $\beta$ -鏈接子- $\alpha$ 組 態)	MSNQVLCCVFLCFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVT LSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGD IAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSPGALYE QYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDE WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVL SATIL YEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRGGSGATNFSL LKQAGDVEENPGPMTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHP STLSVQEGDSAVIKCTYSDSASNYFPWYKQELGKRPQLIID IRSNVGEKKDQRIAVTLNK TAKHFSLHITETQPEDSAVYFC AATEDLTLIWGAGTKLIKPD IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSV	506

	CLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDV KLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLM TLRLWSS	
TCR-C, $\alpha$ 鏈	MTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGD SAVIKCTYSDSASNYFPWYKQELGKRPLIIDIRSNV GEKKDQRIAVTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAVYF CAATEDLTLIWGAGTKLIIKPDIQNPDPVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKC VLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSI IPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS	507
TCR-C, $\beta$ 鏈	MSNQVLCCVVL CFLGANTVDGGITQSPKYLFRKE GQNVTLSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYS QIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQK NPTAFYLCASSPGALYEQYFGPGTRLTVTEDLKN VFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFY PDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFT SESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALV LMAMVKRKDSRG	508
TCR-D ( $\beta$ -連接子- $\alpha$ 組 態)	MGCRLCCAVLCLL GAGELVPMETGVTQTTPRH LVMGMTNKKSLKCEQHLGHNAMEWYKQSAKKP LELMFVYSLEERVENNSVPSRFSPECNSSLHFL HLHTLQPEDSALYLCASSQDYLVSNEKLF FGSGTQLSVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVH SGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSA TILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDS RGGSGATNFSLKQAGDVEENPGPMISLRVLL VILWLQLSWVWSQRKEVEQDPGPFNVPEGA TVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLL MSVYSSGNEDGRFTAQLNRSQYISLLIRDSK LSDSATYLCVVNLLSNQGGKLIFGQGTELSV KPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS PESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRIL LLK VAGFNLLMTLRLWSS	509
TCR-D, $\alpha$ 鏈	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQDPGPF NVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKE PKLLMSVYSSGNEDGRFTAQLNRSQYISLLIR DSKLSDSATYLCVVNLLSNQGGKLIFGQGTE LSVKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSN	510

	KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKSFETDTN LNFQNLSVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS	
TCR-D, $\beta$ 鏈	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTTPRHLVGMGM KKSLKCEQHLGHNAMYWYKQSAKKPLELMFVYSLEERV ENNSVPSRFSPECPNSSHLFLHLHTLQPEDSALYLCASSQD YLVSNELFFGSGTQLSVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYDPHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG	511
TCR-E ( $\beta$ -鏈子- $\alpha$ 組 態)	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTTPRHLVGMGM KKSLKCEQHLGHNAMYWYKQSAKKPLELMFVYSLEERV ENNSVPSRFSPECPNSSHLFLHLHTLQPEDSALYLCASSQD YLVSNELFFGSGTQLSVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYDPHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRGGSG ATNFSLLKQAGDVEENPGPMISLRVLLVILWLQLSWVWSQ RKEVEQDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDC RKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLIRDSKLS DSATYLCVVNLLSNQGGKLIFGQGTELSVKPNIQNPDAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIGFRILLK VAGFNLL MTLRLWSS	512
TCR-E, $\alpha$ 鏈	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQDPGPFNVPEGATV AFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDG RFTAQLNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVNLLSNQGGK LIFGQGTELSVKPNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKSFETDTN LNFQNLSVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS	513
TCR-E, $\beta$ 鏈	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTTPRHLVGMGM KKSLKCEQHLGHNAMYWYKQSAKKPLELMFVYSLEERV ENNSVPSRFSPECPNSSHLFLHLHTLQPEDSALYLCASSQD YLVSNELFFGSGTQLSVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYDPHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYG	514

	LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG	
TCR-F (β-連接子-α組 態)	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPRHL IKEKRETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEK MQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSSELELGDSALYFCA SSLRGGLEKLFFGSGTQLSVLEDLNKVPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVWVNGKEVHSGVCTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDFGSG ATNFSLLKQAGDVEENPGPMSLSSLLKVVTASLWLGP GIAQKITQTQPGMFVQEKEAVTLDCTYDTS DPSYGLFWYKQPSSGEMIFLIYQGSYDQQNATEGRYSLNFQKARKSANLVISAS QLGDSAMYFCAISGNTPLVFGKGTRLSVIANIQNPDP PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPE SSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLL MTLRLWSS	515
TCR-F , α鏈	MSLSSLLKVVTASLWLGP GIAQKITQTQPGMFVQEKEAVT LDCTYDTS DPSYGLFWYKQPSSGEMIFLIYQGSYDQQNAT EGRYSLNFQKARKSANLVISASQLGDSAMYFCAISGNTPLV FGKGTRLSVIANIQNPDP PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKDSDVYITDKCVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPE SSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLL MTLRLWSS	516
TCR-F , β鏈	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPRHL IKEKRETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEK MQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSSELELGDSALYFCA SSLRGGLEKLFFGSGTQLSVLEDLNKVPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVWVNGKEVHSGVCTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF	517
TCR-G (β-連接子-α組 態)	MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIKRQSVAF WCNPISGHATLYWYQQILGQGP KLLIQFNNGVVDDSQLP KDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSLYRGEQ YFGPGTRLTVTEDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC LATGFYPDHVELSWVWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWT	518

	<p>QDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEI  LLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRGGSGATNFSLLKQ  AGDVEENPGPMAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQ  QVKQNSP SLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAE  GPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKSAKHL SLHIVPSQPGD  SAVYFCAARGQGNLIFGKGTKLSVKPNIQNPDPAVYQLRD  SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRS  MDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCD  VKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMLTLR  LWSS</p>	
TCR-G, $\alpha$ 鏈(氨基酸序列)	<p>MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSP SLS  VQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIK  DKNEDGRFTVFLNKSAKHL SLHIVPSQPGDSAVYFCAARG  QGNLIFGKGTKLSVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLF  TDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVA  WSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET  DTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMLTLRLWSS</p>	519
TCR-G, $\beta$ 鏈(氨基酸序列)	<p>MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKII EKRSVAF  WCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFNNGVVDDSQLP  KDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSLYRGEQ  YFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC  LATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN  DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWT  QDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEI  LLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG</p>	520
TCR-H ( $\beta$ -鏈子- $\alpha$ 組態)	<p>MSLGLLCCGAFSLLWAGPVNAGVTQTPKFRVLKTGQSMT  LLCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGTTAKG  EVPDGYNVSRLLKKNFLGLESAAPSQTSVYFCASRGYHR  LNNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK  ATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKE  QPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSE  NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLS  ATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRGGSGATN  FLLKQAGDVEENPGPMISLRVLLVILWLQLSWVWSSGGGS  WSHPQFEKGGGSGGGSSGSAWSHPQFEKQRKEVEQDPGP  FNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSV  YSSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVK  PDPGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSD  KSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKS</p>	521

	NSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVE KSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS	
TCR-H, $\alpha$ 鏈(胺 基酸序列)	MISLRVLLVILWLQLSWVWSGGGSWSHPQFEKGGGSGGG SGGSAWSHPQFEKQRKEVEQDPGFNVPEGATVAFNCTYS NSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQLN RASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVKPDPGAGSYQLTFGKG TKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV SQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFAC ANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS	522
TCR-H, $\beta$ 鏈(胺 基酸序列)	MSLGLLCCGAFSLLWAGPVNAGVTQTPKFRVLKTGQSMT LLCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGETTAKG EVPDGYNVSRLLKQNFLGLESAAPSQTSVYFCASRGYHR LNNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKE QPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG	523

【0296】 互補決定區(CDR)存在於例如TCR及抗體之可變域內。在TCR $\alpha$ 及TCR $\beta$ 之各可變域中存在三個CDR，其為各可變域之指定CDR1、CDR2及CDR3。此等CDR之確切邊界可根據已知方法界定，參見例如Kabat等人，「Sequences of Proteins of Immunological Interest」及Dunbar等人，「ANARCI: antigen receptor numbering and receptor classification」，其提供適用於可變域以及界定三個CDR之殘基邊界之殘基編號系統。其他CDR界定方法可產生與基於Kabat之CDR重疊且根據特定殘基或殘基群組或甚至整個CDR並不顯著影響抗原結合之預測或實驗研究結果縮短或拉長的CDR。在本文中，CDR可根據此等方法中之任一者界定。

【0297】 一或多種序列可插入(例如經歷整合)至諸如TRAC、TRBC1及/或TRBC2之基因座中。在一些實施例中，一或多種基因插入

(例如經歷整合)至TRAC基因座中。可提供一或多種呈可操作地連接於諸如EF-1 $\alpha$ 啟動子之異源啟動子之形式的基因。或者，可提供一或多種基因以使得其經組態以在整合時自內源性啟動子(例如TRAC、TRBC1或TRBC2啟動子)表現。一或多種基因可包含藉由自裂解序列連接之兩種或更多種多肽之轉譯融合體。此方法可為有幫助的，其中提供用於多鏈受體(例如T細胞受體)之編碼序列且需要使用單一啟動子(不論內源或異源)以驅動受體表現。因此，啟動子之活性產生一種mRNA，其包含有包括複數個受體鏈之胺基酸的連續編碼序列且轉譯成多肽，該多肽經歷裂解以提供個別受體鏈。

**【0298】** 一或多種序列可藉由任何適當手段遞送，例如轉染、脂質奈米粒子、電穿孔、顯微注射或病毒載體。在一些實施例中，使用諸如腺相關病毒載體之病毒載體。

#### IV. 另外示例性實施例

**【0299】** 提供以下另外例示性實施例。

實施例001. 一種改變TRBC1及/或TRBC2基因內之DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

a. 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID No：1-24中任一者之引導序列；及

- v. 包含SEQ ID No：1-6中任一者之引導序列；或
- b. 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況
- c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例002. 一種降低TRBC1及/或TRBC2基因之表現之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

- a. 包含選自以下之序列的引導RNA：
  - i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；
  - ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID No：1-24中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID No：1-6中任一者之引導序列；或
- b. 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況
- c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例003. 一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞及/或同種異體細胞投與組合物，其中該組合物包含：

- a. 包含選自以下之序列的引導RNA：
  - i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；
  - ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

- iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID No：1-24中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID No：1-6中任一者之引導序列；或
- b. 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況
- c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例004. 一種改變TRAC基因內之DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

- a. 包含選自以下之序列的引導RNA：
    - i. 選自SEQ ID NO：90-178之引導序列；
    - ii. 選自SEQ ID NO：90-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
    - iii. 與選自SEQ ID NO：90-178之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
    - iv. 包含SEQ ID No：90-113中任一者之引導序列；及
    - v. 包含SEQ ID No：90-95中任一者之引導序列；或
- b. 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況
- c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例005. 一種降低TRAC基因之表現之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

- a. 包含選自以下之序列的引導RNA：

- i. 選自SEQ ID NO：90-178之引導序列；
  - ii. 選自SEQ ID NO：90-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii. 與選自SEQ ID NO：90-178之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID No：90-113中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID No：90-95中任一者之引導序列；或
- b. 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況
  - c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例006. 一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞及/或同種異體細胞投與組合物，其中該組合物包含：

- a. 包含選自以下之序列的引導RNA：
  - i. 選自SEQ ID NO：90-178之引導序列；
  - ii. 選自SEQ ID NO：90-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii. 與選自SEQ ID NO：90-178之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID No：90-113中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID No：90-95中任一者之引導序列；或
- b. 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況
- c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例007. 一種改變TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之DNA序

列之方法，其包含向細胞遞送第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

- i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；
  - ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID No：1-24中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID No：1-6中任一者之引導序列；及
- 其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

- i. 選自SEQ ID NO：90-178之引導序列；
- ii. 選自SEQ ID NO：90-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
- iii. 與選自SEQ ID NO：90-178之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
- iv. 包含SEQ ID No：90-113中之任一者之引導序列；及
- v. 包含SEQ ID No：90-95中任一者之引導序列。

實施例008. 一種降低TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現之方法，其包含向細胞遞送第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

- i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID No：1-24中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID No：1-6中任一者之引導序列；及

其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

i. 選自SEQ ID NO：90-178之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：90-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：90-178之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID No：90-113中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID No：90-95中任一者之引導序列。

實施例009. 一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞或同種異體細胞投與組合物，其中該組合物包含：第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID No：1-24中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID No：1-6中任一者之引導序列；及

其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

i. 選自SEQ ID NO：90-178之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：90-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：90-178之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID No：90-113中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID No：90-95中任一者之引導序列。

實施例010. 如前述實施例中任一者之方法，其中投與經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例011. 一種組合物，其包含：

a. 引導RNA，其包含

i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；或

ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；或

iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；或

iv. 包含SEQ ID No：1-24中任一者之引導序列；或

v. 包含SEQ ID No：1-6中任一者之引導序列；及視情況

b. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例012. 如實施例11之組合物，其係用於改變細胞中TRBC1及/或TRBC2基因內之DNA序列。

實施例013. 如實施例11之組合物，其係用於降低細胞中該等TRBC1及/或TRBC2基因之表現。

實施例014. 一種組合物，其包含：

a. 引導RNA，其包含：

i. 選自SEQ ID NO：90-178之引導序列；或

ii. 選自SEQ ID NO：90-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；或

iii. 與選自SEQ ID NO：90-178之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；或

iv. 包含SEQ ID No：90-113中任一者之引導序列；或

v. 包含SEQ ID No：90-95中任一者之引導序列；及視情況

b. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例015. 如實施例14之組合物，其係用於改變細胞中TRAC基因內之DNA序列。

實施例016. 如實施例14之組合物，其係用於降低細胞中該TRAC基因之表現。

實施例017. 如實施例11至17中任一者之組合物，其係用於個體之免疫療法中。

實施例018. 一種細胞，其係藉由如實施例1至10中任一者之方法改變。

實施例019. 如實施例18之細胞，其中該細胞經離體改變。

實施例020. 如實施例18或實施例19之細胞，其中該細胞為T細胞。

實施例021. 如實施例18至20中任一者之細胞，其中該細胞為CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及/或CD8<sup>+</sup>T細胞。

實施例022. 如實施例18至21中任一者之細胞，其中該細胞為哺乳動物、靈長類動物或人類細胞。

實施例023. 如實施例18至21中任一者之細胞，其係用於個體之免疫療法中。

實施例024. 如實施例1至10中任一者之方法，其進一步包含：

a. 誘導細胞及/或個體中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之雙股斷裂(DSB)；或

b. 誘導細胞及/或個體中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之單股斷裂(SSB)；或

c. 降低細胞及/或個體中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現。

實施例025. 如實施例1至3、7至13中任一者之方法或組合物，其中該組合物讓該等TRBC1及/或TRBC2基因發生編輯。

實施例026. 如實施例4至10及14至17中任一者之方法或組合物，其中該組合物讓該TRAC基因發生編輯。

實施例027. 如實施例7至10中任一者之方法或組合物，其中該組合物讓該TRBC基因及/或TRAC基因發生編輯。

實施例028. 如實施例25至27中任一者之方法或組合物，其中該編輯經計算為經編輯之群體之百分比(編輯百分比或插入或缺失百分比)。

實施例029. 如實施例25至28中任一者之方法或組合物，其中該編輯百分比係在群體之10%與100%之間，例如在群體之30%與99%之間。

實施例030. 如實施例25至29中任一者之方法或組合物，其中該編輯百分比係在群體之30%與35%、35%與40%、40%與45%、45%與50%、50%與55%、55%與60%、60%與65%、65%與70%、70%與75%、75%與80%、80%與85%、85%與90%、90%與95%或95%與99%之間。

實施例031. 如實施例1至3、7至13、17及24至30中任一者之方法或組合物，其中該組合物包含sgRNA，該sgRNA包含

- a. SEQ ID NO：179-184中之任一者；或
- b. 選自SEQ ID NO：1-89中任一者之引導序列；或
- c. 選自SEQ ID No：1-24之引導序列；或
- d. 選自SEQ ID No：1-6之引導序列。

實施例032. 如實施例4至10、14至17及24至30中任一者之方法或組合物，其中該組合物包含sgRNA，該sgRNA包含

- a. 選自SEQ ID NO：90-178中任一者之引導序列；或
- b. 選自SEQ ID No：90-113之引導序列；或
- c. 選自SEQ ID No：90-95之引導序列。

實施例033. 如實施例1至17及24至32中任一者之方法或組合物，其中該目標序列係於該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子1、2、3或4中。

實施例034. 如實施例33之方法或組合物，其中該目標序列係於該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子1中。

實施例035. 如實施例33之方法或組合物，其中該目標序列係於該等

TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子2中。

實施例036. 如實施例33之方法或組合物，其中該目標序列係於該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子3中。

實施例037. 如實施例33之方法或組合物，其中該目標序列係於該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子4中。

實施例038. 如實施例33至37中任一者之方法或組合物，其中該目標序列係於人類TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中。

實施例039. 如實施例1至17或24至38中任一者之方法或組合物，其中該引導序列與TRBC1、TRBC2及/或TRAC之正股中之目標序列互補。

實施例040. 如實施例1至17或24至38中任一者之方法或組合物，其中該引導序列與該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之負股中之目標序列互補。

實施例041. 如實施例1至17或24至40中任一者之方法或組合物，其中該第一引導序列與該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之正股中之第一目標序列互補，且其中該組合物進一步包含第二引導序列，其與該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之負股中之第二目標序列互補。

實施例042. 如實施例1至17或24至41中任一者之方法或組合物，其中該引導RNA包含選自SEQ ID No 1-178中任一者之引導序列，且進一步包含SEQ ID NO：200之核苷酸序列，其中SEQ ID NO：200之核苷酸位於該引導序列之3'端之後。

實施例043. 如實施例1至17或24至41中任一者之方法或組合物，其中該引導RNA包含選自SEQ ID No 1-178中任一者之引導序列，且進一步包含SEQ ID NO：201之核苷酸序列，其中SEQ ID NO：201之核苷酸位

於該引導序列之3'端之後。

實施例044. 如實施例1至17或24至43中任一者之方法或組合物，其中該引導RNA係根據SEQ ID NO：300之模式修飾，其中該等N集體為表1之引導序列(SEQ ID No 1-89)中之任一者。

實施例045. 如實施例44之方法或組合物，其中SEQ ID NO：300中各N為任何天然或非天然核苷酸，其中該等N形成引導序列，且該引導序列使Cas9靶向該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因。

實施例046. 如實施例42至44中任一者之方法或組合物，其中該sgRNA包含與選自SEQ ID No：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列。

實施例047. 如實施例1至17或24至46中任一者之方法或組合物，其中該引導RNA包含至少一種修飾。

實施例048. 如實施例47之方法或組合物，其中該至少一種修飾包括2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾之核苷酸。

實施例049. 如實施例47或48之方法或組合物，其包含核苷酸之間的硫代磷酸酯(PS)鍵。

實施例050. 如實施例47至49中任一者之方法或組合物，其包含2'-氟(2'-F)修飾之核苷酸。

實施例051. 如實施例47至50中任一者之方法或組合物，其包含該引導RNA之5'端之前五個核苷酸中之一或多者處之修飾。

實施例052. 如實施例47至51中任一者之方法或組合物，其包含該引導RNA之3'端之後五個核苷酸中之一或多者處之修飾。

實施例053. 如實施例47至52中任一者之方法或組合物，其包含該引

導RNA之前四個核苷酸之間的PS鍵。

實施例054. 如實施例47至53中任一者之方法或組合物，其包含該引導RNA之後四個核苷酸之間的PS鍵。

實施例055. 如實施例47至54中任一者之方法或組合物，其包含該引導RNA之5'端之前三個核苷酸處之2'-O-Me修飾之核苷酸。

實施例056. 如實施例47至55中任一者之方法或組合物，其包含該引導RNA之3'端之後三個核苷酸處之2'-O-Me修飾之核苷酸。

實施例057. 如實施例47至56中任一者之方法或組合物，其中該引導RNA包含SEQ ID NO：300之經修飾之核苷酸。

實施例058. 如實施例1至17或24至57中任一者之方法或組合物，其中該組合物進一步包含醫藥學上可接受之賦形劑。

實施例059. 如實施例1至58中任一者之方法或組合物，其中該引導RNA與脂質奈米粒子(LNP)締合。

實施例060. 如實施例59之方法或組合物，其中該LNP包含生物可降解之可電離脂質。

實施例061. 如實施例60之方法或組合物，其中該可電離脂質為十八-9,12-二烯酸(9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯，亦稱為(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯酸3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯。

實施例062. 如實施例59至61中任一者之方法或組合物，其中該LNP包含中性脂質。

實施例063. 如實施例62之方法或組合物，其中該中性脂質為

DSPC。

實施例064. 如實施例59至63中任一項之方法或組合物，其中該LNP包含輔助脂質。

實施例065. 如實施例64之方法或組合物，其中該輔助脂質為膽固醇。

實施例066. 如實施例59至65中任一項之方法或組合物，其中該LNP包含隱形脂質。

實施例067. 如實施例66之方法或組合物，其中該隱形脂質為PEG2k-DMG。

實施例068. 如實施例1至17或24至66中任一者之方法或組合物，其中該組合物進一步包含經RNA引導之DNA結合劑。

實施例069. 如實施例1至17或24至68中任一者之方法或組合物，其中該組合物進一步包含編碼經RNA引導之DNA結合劑的mRNA。

實施例070. 如實施例68或69之方法或組合物，其中該經RNA引導之DNA結合劑為Cas9。

實施例071. 如實施例1至17或24至70中任一者之方法或組合物，其中該組合物為醫藥調配物且進一步包含醫藥學上可接受之載劑。

實施例072. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法、組合物或細胞，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：1。

實施例073. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：2。

實施例074. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：3。

實施例075. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：4。

實施例076. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：5。

實施例077. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：6。

實施例078. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：7。

實施例079. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：8。

實施例080. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：9。

實施例081. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ

ID NO：10。

實施例082. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：11。

實施例083. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：12。

實施例084. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：13。

實施例085. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：14。

實施例086. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：15。

實施例087. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：16。

實施例088. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：17。

實施例089. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71

中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：18。

實施例090. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：19。

實施例091. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：20。

實施例092. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：21。

實施例093. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：22。

實施例094. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：23。

實施例095. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：24。

實施例096. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：25。

實施例097. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：26。

實施例098. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：27。

實施例099. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：28。

實施例100. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：29。

實施例101. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：30。

實施例102. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：31。

實施例103. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：32。

實施例104. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ

ID NO：33。

實施例105. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：34。

實施例106. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：35。

實施例107. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：36。

實施例108. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：37。

實施例109. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：38。

實施例110. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：39。

實施例111. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：40。

實施例112. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71

中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：41。

實施例113. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：42。

實施例114. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：43。

實施例115. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：44。

實施例116. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：45。

實施例117. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：46。

實施例118. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：47。

實施例119. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：48。

實施例120. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：49。

實施例121. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：50。

實施例122. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：51。

實施例123. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：52。

實施例124. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：53。

實施例125. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：54。

實施例126. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：55。

實施例127. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ

ID NO：56。

實施例128. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：57。

實施例129. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：58。

實施例130. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：59。

實施例131. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：60。

實施例132. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：61。

實施例133. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：62。

實施例134. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：63。

實施例135. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71

中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：64。

實施例136. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：65。

實施例137. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：66。

實施例138. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：67。

實施例139. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：68。

實施例140. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：69。

實施例141. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：70。

實施例142. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：71。

實施例143. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：72。

實施例144. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：73。

實施例145. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：74。

實施例146. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：75。

實施例147. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：76。

實施例148. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：77。

實施例149. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：78。

實施例150. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ

ID NO：79。

實施例151. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：80。

實施例152. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：81。

實施例153. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：82。

實施例154. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：83。

實施例155. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：84。

實施例156. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：85。

實施例157. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：86。

實施例158. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71

中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：87。

實施例159. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：88。

實施例160. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：89。

實施例161. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：90。

實施例162. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：91。

實施例163. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：92。

實施例164. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：93。

實施例165. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：94。

實施例166. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：95。

實施例167. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：96。

實施例168. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：97。

實施例169. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：98。

實施例170. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：99。

實施例171. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：100。

實施例172. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：101。

實施例173. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID

NO：102。

實施例174. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：103。

實施例175. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：104。

實施例176. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：105。

實施例177. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：106。

實施例178. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：107。

實施例179. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：108。

實施例180. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：109。

實施例181. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一

者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：110。

實施例182. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：111。

實施例183. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：112。

實施例184. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：113。

實施例185. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：114。

實施例186. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：115。

實施例187. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：116。

實施例188. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：117。

實施例189. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：118。

實施例190. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：119。

實施例191. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：120。

實施例192. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：121。

實施例193. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：122。

實施例194. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：123。

實施例195. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：124。

實施例196. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID

NO：125。

實施例197. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：126。

實施例198. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：127。

實施例199. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：128。

實施例200. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：129。

實施例201. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：130。

實施例202. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：131。

實施例203. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：132。

實施例204. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一

者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：133。

實施例205. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：134。

實施例206. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：135。

實施例207. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：136。

實施例208. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：137。

實施例209. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：138。

實施例210. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：139。

實施例211. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：140。

實施例212. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：141。

實施例213. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：142。

實施例214. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：143。

實施例215. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：144。

實施例216. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：145。

實施例217. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：146。

實施例218. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：147。

實施例219. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID

NO：148。

實施例220. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：149。

實施例221. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：150。

實施例222. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：151。

實施例223. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：152。

實施例224. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：153。

實施例225. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：154。

實施例226. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：155。

實施例227. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一

者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：156。

實施例228. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：157。

實施例229. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：158。

實施例230. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：159。

實施例231. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：160。

實施例232. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：161。

實施例233. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：162。

實施例234. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：163。

實施例235. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：164。

實施例236. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：165。

實施例237. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：166。

實施例238. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：167。

實施例239. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：168。

實施例240. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：169。

實施例241. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：170。

實施例242. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID

NO：171。

實施例243. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：172。

實施例244. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：173。

實施例245. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：174。

實施例246. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：175。

實施例247. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：176。

實施例248. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：177。

實施例249. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：178。

實施例250. 一種如任何前述實施例之組合物、調配物或細胞之用

途，其係用於製備藥劑。

實施例251. 如任何前述實施例之組合物、調配物或細胞，其係用作藥劑。

實施例252. 如實施例18至23中任一者之細胞，其缺乏內源性T細胞受體，該細胞用於製備表現非內源性T細胞受體之T細胞。

實施例253. 如實施例18-23中任一者之細胞，其缺乏內源性T細胞受體，該細胞用於製備表現CAR之T細胞。

實施例254. 如實施例18至23中任一者之細胞，其中該經改變之細胞為CD3<sup>-</sup>細胞。

實施例255. 如實施例18至23中任一項之細胞，其中該細胞在改變之前為CD3<sup>+</sup>細胞，且該經改變之細胞為CD3<sup>-</sup>細胞。

實施例256. 一種細胞群體，其包含如實施例18至23中任一者之細胞，其中經改變之群體之大於約50%、大於約55%、大於約60%、大於約65%、大於約70%、大於約75%、大於約80%、大於約85%、大於約90%、大於約95%、大於約98%或大於約99%為CD3<sup>-</sup>細胞。

實施例257. 如實施例256之群體，其中該群體之大於約90%為CD3<sup>-</sup>。

實施例258. 如實施例256之群體，其中該群體之大於約95%為CD3<sup>-</sup>。

實施例259. 如實施例256之群體，其中該群體之大於約99%為CD3<sup>-</sup>。

實施例260. 一種細胞群體，其包含如實施例18至23中任一者之細胞，其中該群體之大於約50%、大於約55%、大於約60%、大於約65%、

大於約70%、大於約75%、大於約80%、大於約85%、大於約90%、大於約95%、大於約98%或大於約99%為缺乏內源性T細胞受體。

實施例261. 如實施例260之群體，其中該群體之大於約90%缺乏內源性T細胞受體。

實施例262. 如實施例260之群體，其中該群體之大於約95%缺乏內源性T細胞受體。

實施例263. 如實施例260之群體，其中該群體之大於約99%缺乏內源性T細胞受體。

實施例264. 一種細胞群體，其包含如實施例18至23中任一者之細胞，其中在該群體中TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現相對於未經改變之相同細胞群體已降低至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約98%或至少約99%。

實施例265. 如實施例264之群體，其中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現降低係至少約90%。

實施例266. 如實施例264之群體，其中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現降低係至少約95%。

實施例267. 如實施例264之群體，其中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現降低係至少約99%。

實施例268. 如實施例264至267中任一者之群體，其中該降低係該TRBC1基因之表現降低。

實施例269. 如實施例264至267中任一者之群體，其中該降低係該TRBC2基因之表現降低。

實施例270. 如實施例264至267中任一者之群體，其中該降低係該TRAC基因之表現降低。

實施例271. 一種細胞群體，其包含如實施例18至23中任一者之細胞，其中該群體之10%與100%之間，例如該群體之30%與99%之間在該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中具有插入或缺失。

實施例272. 如實施例271之群體，其中該群體之30%與35%之間、35%與40%之間、40%與45%之間、45%與50%之間、50%與55%之間、55%與60%之間、60%與65%之間、65%與70%之間、70%與75%之間、75%與80%之間、80%與85%之間、85%與90%之間、90%與95%之間，或95%與99%之間可在該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中具有插入或缺失。

實施例273. 如實施例271或272之群體，其中該插入或缺失係於該TRBC1基因中。

實施例274. 如實施例271或272之群體，其中該插入或缺失係於該TRBC2基因中。

實施例275. 如實施例271或272之群體，其中該插入或缺失係於該TRAC基因中。

\* \* \*

**【0300】** 本說明書及例示性實施例不應視為限制性的。出於本說明書及隨附申請專利範圍之目的，除非另外指明，否則表示量、百分比或比例之所有數目及說明書及申請專利範圍中使用之其他數值應理解為在所有情況下藉由術語「約」修飾，程度為其尚未如此修飾。因此，除非有相反指示，否則以下說明書及所附申請專利範圍中所闡述之數值參數為可視設

法獲得之所需特性而變化的近似值。最低限度地，且不試圖限制等效物之原則對申請專利範圍之範疇的應用，各數值參數至少應根據所報導之有效數位的數目且藉由應用一般捨入技術來解釋。

**【0301】** 應注意，如本說明書及申請專利範圍中所用，除非明確地且肯定地限於一個指示物，否則單數形式「一(a/an)」與「該」及任何詞之任何單數使用形式包括複數個指示物。如本文所用，術語「包括」及其文法變化形式意欲具有非限制性，因此清單中之各項的敘述不排除可以取代或添加至所列項中的其他類似項。

## 實例

**【0302】** 提供以下實例以說明某些所揭示實施例且不應視為以任何方式限制本發明之範疇。

實例1：材料及方法

### 基因組DNA分離

**【0303】** 轉染後24小時時收集HEK293\_Cas9轉染細胞。根據製造商之方案使用50微升/孔QuickExtract™ DNA萃取溶液(Lucigen，目錄號QE09050)自96孔盤之各孔萃取gDNA。如本文所述，對DNA樣品進行PCR及後續NGS分析。

### 對於中靶(on-target)裂解效率之下一代定序(「NGS」)及分析

**【0304】** 為定量測定基因組中目標位置之編輯效率，使用深度定序來鑑別藉由基因編輯引入之插入及缺失的存在。PCR引子設計於所關注基因(例如TRAC)內之靶點周圍，且將所關注基因組區擴增。引子序列設計係以此領域中之標準進行。

**【0305】** 根據製造商之方案(Illumina)進行另外PCR以添加化學定

序。擴增子係經Illumina MiSeq儀器定序。在去除具有低品質評分之讀段之後，將讀段與人類參考基因組(例如hg38)比對。選擇與所關注目標區重疊之讀段，且計算野生型讀段數目相對於含有插入或缺失(「indel」)之讀段數目。

【0306】 編輯百分比(例如「編輯效率」或「插入或缺失百分比」)定義為具有插入或缺失(「indel」)之序列讀段之總數目除以包括野生型之序列讀段之總數目。

【0307】 實例2：在HEK細胞中之TRAC引導物設計及篩選  
人類TRAC引導物設計

【0308】 使用人類參考基因組(例如hg38)及使用者定義之所關注基因組區(例如TRAC蛋白質編碼外顯子)經由電腦模擬(*in silico*)進行初始引導物選擇以鑑別所關注區中之PAMs。對於各經鑑別之PAM，進行分析且報導統計資料。基於此項技術中已知的多種準則(例如GC含量、預測之中靶活性和可能之脫靶活性)進一步選擇gRNA分子且進行等級排序。

【0309】 針對TRAC (ENSG00000277734)靶向蛋白質外顯子編碼區及內含子1設計總計88種引導RNA。提供引導序列及對應基因組座標(表2)。

【0310】 在HEK293\_Cas9細胞中針對編輯效率篩選引導物。在補充有10%胎牛血清之DMEM培養基中培養組成性表現Spy Cas9 (「HEK293\_Cas9」)之人類胚胎腎臟腺癌細胞株HEK293。在轉染之前約24小時，將細胞以10,000個細胞/孔之密度接種於96孔盤中(在轉染時約70%滿度(confluent))。根據製造商之方案用脂染胺(Lipofectamine) RNAiMAX (ThermoFisher，目錄號13778150)轉染細胞一式二份。用含有個別引導物

(25 nM)、trRNA (25 nM)、脂染胺RNAiMAX (0.3微升/孔)及OptiMem之脂複合體(lipoplex)轉染細胞。如實例1所述進行DNA分離及NGS分析。圖1及表5顯示HEK293\_Cas9細胞中藉由此等引導物在TRAC基因座之插入或缺失%。

【0311】 表5：在HEK293\_Cas9細胞中之TRAC引導物編輯

SEQ ID NO:	插入或缺失% (平均值)	SD	SEQ ID NO:	插入或缺失% (平均值)	SD
90	53.1	13	135	0.7	0.3
91	51.9	5.2	136	0.1	0.1
92	29.8	15.8	137	0.1	0.1
93	35.1	16.1	138	0.5	0.2
94	55.4	9	139	0.5	0.1
96	6.6	2.3	140	0.3	0.1
97	35.3	9.8	141	0.1	0
98	15.6	4.2	142	0.4	0.1
99	32	9.5	143	0.4	0.1
100	40	14.3	144	1.3	0.8
101	17	4.1	145	0.2	0.1
102	32.9	7.8	146	0.1	0
103	24.8	3.1	147	0.1	0.1
104	47.2	15.7	148	2.5	1.2
105	34.7	13.9	149	3	1
106	27.4	3.8	150	0.2	0.1
107	54.9	17.8	151	0.7	0.4
108	28.2	7.9	152	0.2	0.1
109	54.4	14	153	0.7	0.1
110	52.9	9.5	154	0.3	0.1
111	22.6	5	155	0.1	0.1
112	46.8	15.3	156	0.1	0
113	41.6	10.8	157	0.1	0.1
114	0.4	0.1	158	0.1	0.1
115	26.4	9.4	159	0.2	0.1
116	22.8	3.3	160	0.1	0
117	8.9	1.8	161	0.7	0.2
118	0	0	162	0.1	0.1

SEQ ID NO:	插入或缺失% (平均值)	SD	SEQ ID NO:	插入或缺失% (平均值)	SD
119	5.3	1.1	163	0.7	0
120	0.4	0.1	164	0.1	0
121	0.2	0.1	165	0	0
122	1.2	0.6	166	0.3	0
123	2.2	0.4	167	0.3	0.3
124	0.3	0.1	168	0.1	0.1
125	0.1	0	169	0.5	0.2
126	0.1	0.1	170	0.2	0.1
127	0	0	171	0.2	0.1
128	0.4	0.4	172	0.2	0.1
129	1.1	0.3	173	0	0
130	1.6	0.7	174	0.1	0
131	0.2	0.1	175	0.1	0.1
132	0.4	0.1	176	0.1	0
133	2.5	0.5	177	0.1	0.1
134	0.5	0.2	178	0.1	0

【0312】 實例3：人類CD3<sup>+</sup> T細胞中之TRAC引導物篩選

【0313】 在人類CD3<sup>+</sup> T細胞中針對編輯效率及T細胞受體(TCR)阻斷基因表現篩選來自實例2之HEK293\_Cas9細胞中具有最高插入或缺失編輯百分比之24種引導物。CD3<sup>+</sup> T細胞由多個包括CD4<sup>+</sup> T輔助細胞及CD8<sup>+</sup> 細胞毒性T細胞之T細胞群體構成。此等細胞可自全血中分離或自白血球分離術樣品中分離。T細胞可使用Cas9介導之編輯藉由工程改造患者T細胞進行修飾以特異性靶向癌細胞且具有較小免疫原性。此實例描述用以在T細胞中遞送Cas9 RNP，例如靶向TRAC之Cas9 RNP的基礎方法。僅需要改變RNP中之目標crRNA以使此方案適於不同T細胞目標(例如本文提供之彼等目標中之任一者)。

### 將RNP遞送至T細胞

【0314】 T細胞以市售方式獲得(例如人類周邊血液CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>

T細胞，冷凍，Stem Cell Technology，目錄號70029)或在內部由leukopak製備。對於內部製備，首先使用市售套組(例如EasySep™人類T細胞分離套組，Stem Cell Technology)由leukopak增濃T細胞。將經增濃之T細胞等分且冷凍(以 $5 \times 10^6$ /小瓶)以供未來使用。小瓶隨後視需要解凍，且藉由添加於T細胞培養基(RPMI 1640、FBS、L-麩醯胺酸、非必需胺基酸、丙酮酸鈉、HEPES緩衝液、2-巰基乙醇及視情況IL2)中之3:1比率之CD3/CD28珠粒(戴諾磁珠(Dynabeads)，Life Technologies)而活化。RNP藉由混合等量之試劑且在95°C下培育2 min且冷卻至室溫使個別crRNA及trRNA預黏接而產生。將由經預退火之crRNA及trRNA組成之雙引導物(dgRNA)與Sp將由經預黏接之crRNA及trRNA組成之雙引導物(dgRNA)與Spy Cas9蛋白質一起培育以形成核糖核蛋白(RNP)複合物。CD3<sup>+</sup> T細胞用含有Cas9 (10 nM)、個別引導物(10 nM)及示蹤劑RNA (10 nM)之RNP重複三次轉染，使用關於刺激之人類T細胞之製造商之Amaxa™ 96孔Shuttle™方案使用P3初級細胞96孔Nucleofector™套組(Lonza，目錄號V4SP-3960)核轉染。在核轉染之後緊接著將T細胞培養基添加至細胞中且培養2天或更多天。

**【0315】** 核轉染後兩天，如實例1中所述製備基因組DNA且進行NGS分析。表6及圖2顯示CD3<sup>+</sup> T細胞中用多種引導物TRAC編輯之後插入或缺失頻率之結果。

**【0316】** 表6：人類CD3<sup>+</sup> T細胞中TRAC編輯之插入或缺失頻率

SEQ ID NO:	插入或缺失頻率	標準差	樣品編號(n)
90	79.3%	1.5%	3
91	86.9%	1.2%	3
92	79.0%	1.9%	3
93	82.6%	1.4%	3
96	0.7%	0.1%	3

SEQ ID NO:	插入或缺失頻率	標準差	樣品編號(n)
97	55.2%	3.1%	3
98	15.5%	1.0%	3
99	27.9%	0.9%	3
100	57.7%	3.0%	3
101	26.2%	0.8%	3
102	31.2%	0.8%	3
103	58.1%	1.8%	3
104	62.0%	2.8%	3
105	47.8%	2.0%	3
106	52.0%	2.7%	3
108	27.7%	1.9%	3
109	72.7%	3.7%	3
110	33.0%	2.2%	3
111	36.9%	1.3%	3
112	76.7%	1.0%	3
113	65.7%	4.3%	3

**【0317】 TCR表現之流式細胞測量分析**

**【0318】** 核轉染後4天量測TCR之表現。細胞用可固定活死亡染料(Thermo fisher L34975)染色，且使用Alexa Fluor® 647抗人類TCR  $\alpha/\beta$  抗體(Biolegend，目錄號306714)偵測TCR。在冰上用2 ul抗體培育細胞至少20分鐘，藉由流式細胞測量術使用例如Beckman Coulter CytotflexS)分析。使用Flow Jo軟體分析資料。分析活細胞群體之TCR缺失。結果顯示於表7及圖3中。

**【0319】 表7：CD3<sup>+</sup> T細胞中TRAC編輯後之TCR表現**

SEQ ID NO:	供體1 - TCR 陰性%	供體1 - 標準差	供體2 - TCR 陰性%	供體2 - 標準差
90	80.2	19.5	84.9	3.6
91	95.3	1.4	80.7	20.5
92	93.5	0.3	87.6	3.4
93	95.9	0.6	91.7	5
94	73.5	28.3	90.2	2.1
96	3.6	0.8	1.8	0.4

SEQ ID NO:	供體1 - TCR 陰性%	供體1 - 標準差	供體2 - TCR 陰性%	供體2 - 標準差
97	59.9	0.9	51.3	0.4
98	17.9	1.1	11.5	1.2
99	32.9	1.1	30.4	2.3
100	61.4	1.7	55.8	3.4
101	28.8	1.3	24.6	2
102	28.7	0.5	20.7	1
103	58.2	6.4	41.6	0.4
104	68	5.7	58	3.2
105	46.8	3.3	46.2	1.5
106	58	1.6	51.6	1.7
107	62.3	4.6	62.2	0.9
108	3.3	0.3	2.6	0.4
109	4.5	0.5	4.2	0.5
110	33.1	2.5	35.1	10.9
111	5.1	0.1	3.7	0.3
112	10.5	0.2	17.7	12.3
113	6.3	0.7	5.7	1
116	19.3	1.5	13.7	0.4

#### 【0320】 實例4：HEK細胞中之TRBC引導物設計及篩選

##### 人類TRBC引導物設計

【0321】 用於編輯人類*TRBC1* (ENSG00000211751)及*TRBC2* (ENSG00000211772)之最初引導物選擇如實例2中所述。設計總計89種引導RNA：2種僅靶向*TRBC1* (SEQ ID NO：11及SEQ ID NO：26)，2種僅靶向*TRBC2* (SEQ ID NO：8)且86種靶向*TRBC1*與*TRBC2*。引導物經設計以靶向蛋白質外顯子編碼區。上文提供引導物及對應基因組座標(表1)。

【0322】 在HEK293\_Cas9細胞中針對編輯效率篩選TRBC引導物。如實例2中所述進行轉染。如實例1所述進行DNA分離及NGS分析。圖4A及4B及表8顯示HEK293\_Cas9細胞中藉由此等引導物在*TRBC1*及*TRBC2*基因座之插入或缺失%。

【0323】表8：在HEK293\_Cas9細胞中之TRBC引導物編輯

SEQ ID NO:	TRBC1平均 插入或缺失 %	TRBC1 SD	值數(n)	TRBC2平均 插入或缺失 %	TRBC2 SD	值數(n)
1	22.7	4.8	3	28.0	5.9	3
2	50.6	2.9	3	56.9	3.1	3
3	28.7	3.5	3	41.9	4	3
4	53.4	8.6	3	34.4	NA	1
5	33.9	7.7	3	29.5	7.1	3
6	54.8	8	3	48.7	7.7	3
7	47.3	4	3	43.9	3.8	3
8	30.2	3.5	3	38.6	2.5	3
9	29.5	6.4	3	30	6.5	3
10	31.5	4.6	3	41.7	5.9	3
11	38.4	9.7	3	2.6	0.8	3
12	29.6	5	3	28.1	6	3
13	61.7	4.9	3	65.7	4.4	3
14	31.5	7.8	3	38.3	8	3
15	24.2	7.5	3	31.7	10.3	3
16	33	2.6	3	34.9	3.2	3
17	37.4	9.3	3	32.3	8.2	3
18	43	9.4	3	37.6	7.9	3
19	22.2	8.6	3	30.2	9.3	3
20	38.7	8.9	3	48.5	10.4	3
21	40.9	5	3	31.3	3.6	3
22	33.1	7.5	3	28.3	7.4	3
23	36.4	2.2	3	22.7	0.8	3
24	32.6	4.2	3	29.5	3.8	3
26	22.5	2.6	3	2.9	0.3	3
27	3.7	0.2	3	3.2	0.3	3
28	0.1	0	3	0.1	0.1	3
29	0.3	0.1	3	0.4	0.2	3
30	0.2	0.1	3	0.3	0.2	3
31	0.1	0	3	0.2	0.1	3
32	0.2	0.1	3	0.2	0.1	3
33	0.4	0.1	3	0.2	0.1	3
34	0.4	0.1	3	0.3	0.1	3
35	0	0.1	3	0.1	0.1	3

SEQ ID NO:	TRBC1平均 插入或缺失 %	TRBC1 SD	值數(n)	TRBC2平均 插入或缺失 %	TRBC2 SD	值數(n)
36	0.3	0.1	3	0.3	0.1	3
37	0.8	0.1	3	0.5	0.2	3
38	0.3	0.1	3	0.3	0.1	3
39	2.2	0.4	3	2.2	0.4	3
40	0.1	0.1	3	0.2	0.1	3
41	0.1	0	3	0.2	0.1	3
42	0.1	0.1	3	0.2	0.1	3
43	0.2	0	3	0.1	0.1	3
44	0.2	0	3	0.3	0.1	3
45	0.1	0.1	3	0.1	0	3
46	0.1	0	3	0.1	0	3
47	0.1	0	3	0.2	0.1	3
48	0.2	0.2	3	0.3	0.1	3
49	0.1	0	3	0.1	0	3
50	0.3	0.1	3	0.2	0.1	3
51	0.4	0.1	3	0.4	0.1	3
52	0.2	0.1	3	0.1	0.1	3
53	1.6	0.2	3	1.8	0.2	3
54	0.2	0.1	3	0.3	0.1	3
55	0.1	0.1	3	0	NA	1
56	0.2	0.1	3	0.4	0.1	3
57	0.1	0	3	0.1	0	3
58	5.8	1.3	3	5	1.1	3
59	0.3	0.1	3	0.2	0.1	3
60	0.3	0.1	3	0.2	0.1	3
61	1	0.2	3	1.6	0.3	3
62	1.7	0.3	3	2.2	0.2	3
63	0.3	0.1	3	0.3	0.1	3
64	0.2	0.1	3	0.3	0.1	3
65	0.2	0	3	0.2	0	3
66	0.1	0.1	3	0.2	0.1	3
67	0.1	0	3	0.1	0.1	3
68	0.7	0.2	3	0.6	0.1	3
69	0	0.1	3	0.1	0.1	3
70	0.1	0.1	3	0.1	0.1	3

SEQ ID NO:	TRBC1平均插入或缺失 %	TRBC1 SD	值數(n)	TRBC2平均插入或缺失 %	TRBC2 SD	值數(n)
71	18.9	5.1	3	24.2	6	3
72	13.8	3	3	14.2	2.6	3
73	12.9	2.9	3	18.4	3.3	3
74	3.3	0.4	3	4.2	1.2	3
75	8.3	1.1	3	13	1.4	3
76	0.3	0	3	0.1	0.1	3
77	18.5	1.3	3	15.1	1.3	3
78	22.2	2.8	3	23.3	2.2	3
79	14.6	2.5	3	13.6	2.6	3
80	0.4	0.1	3	0.5	0.2	3
81	0.3	0.1	3	0.5	0.1	3
82	15.9	2.3	3	9.1	1.8	3
83	13.6	5	3	16.8	5.5	3
84	0.8	0.3	3	0.7	0.1	3
85	6.9	1.2	3	6.3	1.5	3
86	9.7	2	3	9	1.8	3
87	0.7	0.1	3	0.2	0.2	3
88	15.8	1.7	3	13.9	1.6	3
89	5	0.6	3	6.3	0.3	3

【0324】 實例5：人類CD3<sup>+</sup> T細胞中之TRBC引導物篩選

【0325】 在人類CD3<sup>+</sup> T細胞中針對編輯效率及T細胞受體(TCR)表現篩選來自實例4之HEK293\_Cas9細胞中具有最高插入或缺失編輯百分比之TRBC引導物。如實例3中進行核轉染、編輯分析及TCR表現分析。表9及圖5顯示CD3<sup>+</sup> T細胞中用多種引導物TRBC編輯後之插入或缺失頻率之結果。表10及圖6顯示CD3<sup>+</sup> T細胞中TRBC編輯後之TCR表現量測值(以TCR陰性細胞%)。

表9：CD3<sup>+</sup> T細胞中TRBC1之插入或缺失頻率

SEQ ID NO:	平均插入或缺失頻率	標準差	樣品編號(n)

1	42.40%	0.80%	3
2	50.50%	3.90%	3
3	45.80%	3.00%	3
4	42.50%	3.40%	3
5	45.00%	5.00%	3
6	53.50%	2.40%	3
7	37.30%	7.90%	3
8	27.40%	1.50%	3
9	34.00%	3.20%	3
10	28.20%	3.50%	3
11	25.10%	4.60%	3
12	8.30%	0.40%	3
13	34.20%	1.20%	3
14	21.00%	1.30%	3
15	11.60%	2.50%	3
16	45.70%	1.00%	3
17	35.10%	4.60%	3
18	14.10%	1.30%	3
19	30.40%	2.10%	3
20	30.50%	2.70%	3
21	23.80%	0.90%	3
22	35.50%	3.40%	3
23	30.00%	1.10%	3
24	24.80%	1.40%	3

表10：CD3<sup>+</sup>T細胞中TRBC編輯後之TCR表現

SEQ ID NO:	供體1 - TCR 陰性%	供體1 - 標準差	供體2 - TCR 陰性%	供體2 - 標準差
1	71.2	1.4	74.4	1.3
2	72.4	2.6	79.9	1.5
3	73.3	2.3	76.4	2.8
4	74	0.9	79.2	0.7
5	66.4	1.1	71.5	0.5
6	75	2.2	85.7	1.4
7	53.5	2.2	60.7	2.3
8	18	5.1	30.6	7.6
9	44.4	1.3	59.6	4.1
10	41.2	7.9	47.9	2.3
11	16.3	0.3	20.9	0.7

第 145 頁(發明說明書)

SEQ ID NO:	供體1 - TCR 陰性%	供體1 - 標準差	供體2 - TCR 陰性%	供體2 - 標準差
12	11.8	0.7	14.6	1
13	48.2	12.3	67.2	2
14	23.3	6.5	34.8	3.9
15	22.1	0.8	23.3	1.6
16	60.8	1.7	70.5	0.5
17	42.8	1.4	49.7	0.7
18	20.6	1.8	28.7	8.7
19	45.9	0.8	50.7	1.4
20	55.3	3.2	60.2	1.1
21	39.7	3.4	46.1	0.8
22	39.6	2.1	44.1	1.4
23	33.5	1	43.6	1.1
24	29.5	2.1	32.8	1
25	43.2	1	57	1.5

【0326】 實例6：對於TRBC及TRAC引導物之脫靶分析

【0327】 使用生物化學方法(參見例如Cameron等人, *Nature Methods*. 6, 600-606 ; 2017)測定由靶向TRAC、TRBC1或TRBC2之Cas9裂解之潛在脫靶基因組位點。用此分析測試顯示實例3及實例5中之大部分CD3陰性細胞之引導物的潛在脫靶基因組裂解位點。在此實驗中，使用分離之HEK293\_Cas基因組DNA篩選靶向人類TRAC之7種sgRNA、靶向TRBC之6種sgRNA及具有已知脫靶特徵之兩種對照引導物。使在生物化學分析中使用16 nM之RNP濃度偵測到之潛在脫靶位點數目繪製於圖7A中且示於表11中。該分析鑑別用於所測試之sgRNA之潛在脫靶位點。

【0328】 表11：生物化學脫靶分析

SEQ ID NO:	目標	位點數目
179	TRBC1/2	48
180	TRBC1/2	11
181	TRBC1/2	54
182	TRBC1/2	72

SEQ ID NO:	目標	位點數目
183	TRBC1/2	65
184	TRBC1/2	61
186	TRAC	36
187	TRAC	40
188	TRAC	168
189	TRAC	35
190	TRAC	31
191	TRAC	207
192	TRAC	253
193	EMX1	118
194	VEGFA	1113

### 用於驗證潛在脫靶位點之靶向定序

【0329】 在諸如上文所用之生物化學方法之已知脫靶偵測分析中，典型地藉由設計來恢復大量潛在脫靶位點以便為可在其他情形下，例如在所關注初級細胞中驗證之潛在位點「廣泛撒網」。舉例而言，當分析利用不含細胞環境之經純化之高分子量基因組DNA且視所使用之Cas9 RNP之劑量而定時，生物化學方法典型地過度展示潛在脫靶位點之數目。因此，藉由此等方法識別之潛在脫靶位點可使用所識別之潛在脫靶位點之靶向定序來驗證。

【0330】 在一種方法中，將所關注之Cas9及sgRNA (例如用於評估之具有潛在脫靶位點之sgRNA)引入至初級T細胞中。接著將T細胞溶解且使用側接潛在脫靶位點之引子產生用於NGS分析之擴增子。某一水準之插入或缺失之鑑別可驗證潛在脫靶位點，然而在潛在脫靶位點所見之插入或缺失之缺乏在所用脫靶分析中可指示為假陽性。

【0331】 用此分析測試顯示目標插入或缺失活性之引導物的潛在脫靶基因組裂解位點。在此實驗中，除具有已知脫靶特徵之對照引導物SEQ

ID NO：194 (VEGFA)以外，使用自混合雄性人類周邊血液單核細胞 (PBMC)純化之基因組DNA篩選靶向人類TRBC1或TRBC2之5種sgRNA及靶向人類TRAC之3種引導物。在生物化學分析中使用64 nM之引導物濃度偵測到之潛在脫靶位點之數目示於圖7B及表12中。

【0332】 表12：64 nM脫靶分析

sgRNA之SEQ ID NO:	目標	引導序列(SEQ ID NO:)	脫靶位點計數
179	TRBC1/2	GGCUCUCGGAGAAUGACGAG (SEQ ID NO：1)	190
180	TRBC1/2	GGCCUCGGCGCUGACGAUCU (SEQ ID NO：2)	15
181	TRBC1/2	AUGACGAGUGGACCCAGGAU (SEQ ID NO：3)	92
183	TRBC1/2	UGAGGGUCUCGGCCACCUUC (SEQ ID NO：5)	127
184	TRBC1/2	AGAGAUCUCCCACACCCAAA (SEQ ID NO：6)	90
186	TRAC	CUCUCAGCUGGUACACGGCA (SEQ ID NO：90)	32
192	TRAC	UCAGGGUUCUGGAUAUCUGU (SEQ ID NO：185)	293
206	TRAC	UAGGCAGACAGACUUGUCAC (SEQ ID NO：214)	114
194	VEGFA	參見表3	2945

【0333】 實例7：使用TRAC及TRBC引導物進行多次編輯

【0334】 亦測試引導物之TRAC及TRBC基因座之同時編輯。使用用於密度梯度離心之Lymphoprep™ (Stem Cell Technology)自白血球層分離來自3個不同健康供者之周邊血液單核細胞(PBMC)。使用Dynabeads™ ClinExVivo™ CD3/CD28 (Invitrogen)遵循製造商說明書活化且分選此等細胞。將T細胞於補充有5% FBS以及IL7及IL15 (各5 ng/ml)之X-VIVO™

15造血性無血清培養基(Lonza™)中以10<sup>6</sup>個細胞/毫升之濃度接種。在刺激之後兩天，如實例3中所述同時用靶向TRAC之crRNA及靶向TRBC之crRNA將T細胞電穿孔。使用來自一個供體之細胞，將TRAC及TRBC引導物獨立電穿孔。在刺激後第6天，將珠粒分離且細胞於補充有5% FBS以及IL7及IL15 (各5 ng/ml)之X-VIVO™ 15中以1百萬/毫升之濃度接種。第7天之TRAC及TRBC基因剔除效率藉由流式細胞測量術評估不具有CD3分子之T細胞之百分比來評定，如圖8A及表13中所示。

【0335】 表13：TCR阻斷基因表現之效率

SEQ ID NO:	CD3+		CD3neg		樣品(n)
	平均值%	SD	平均值%	SD	
95	1	N/A	98	N/A	1
6	1	N/A	99	N/A	1
6及95	2	1	98	1	3
模擬	97	1	2	1	3

由TCR基因之慢病毒插入同時進行TRAC及TRBC編輯。

【0336】 刺激後三天，經編輯T細胞藉由隨機插入編碼來源於健康供體之WT1特異性TCR (HD1-TCR)之慢病毒載體(LV)而用LV轉導。簡言之，TCR  $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈基因在雙向啟動子下分離、密碼子最佳化、半胱胺酸修飾及選殖於LV中。下文給出HD1 TCR  $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈基因之DNA及胺基酸序列。 $\alpha$ 鏈在最小人類CMV啟動子下以反義位向選殖，且 $\beta$ 鏈在PGK啟動子下以正義位向選殖。LV藉由整合酶勝任型第三代構築體封裝且藉由水泡性口炎病毒(VSV)包膜假模式化。T淋巴球用LV感染24小時。隨後，將T細胞在10<sup>6</sup>個細胞/毫升下培養且擴增。在轉導之後兩天，轉導效率藉由確定表現特異性V $\beta$ 基因(TRBV12-3/TRBV12-4)以及特異性抗原決定基肽多聚體(抗原決定基：VLDFAPPGA)之T細胞之百分比來評估。在刺激後第

15天，T細胞表現型藉由細胞螢光分析來評估。圖8B及表14顯示超過45%之T細胞表現CD3分子(平均值 $\pm$  SEM = 45.3  $\pm$  5.7)。藉由量測抗原決定基肽多聚體陽性所評估之WT1特異性CD8<sup>+</sup> T細胞之百分比超過95% (平均值 $\pm$  SEM = 95.3  $\pm$  0.7)，當使用SEQ ID NO 6及95時，藉由量測抗原決定基肽多聚體陽性所評估之WT1特異性CD8<sup>+</sup> T細胞之百分比超過95% (平均值 $\pm$  SEM = 95.3  $\pm$  0.7) (圖8C、表14)。在第15天評估經編輯T細胞之T細胞表現型，如圖8D及表15中所示。

**【0337】** SEQ ID NO : 250 : HD1 TCR  $\alpha$ 鏈 - DNA序列

**【0338】** ATGGAAACCCTGCTGAAGGTGCTGAGCGGCACACTGCTGTGGCAGCTG  
ACATGGGTCCGATCTCAGCAGCCTGTGCAGTCTCCTCAGGCCGTGATTCTGAGAG  
AAGGCGAGGACGCCGTGATCAACTGCAGCAGCTCTAAGGCCCTGTACAGCGTGC  
ACTGGTACAGACAGAAGCACGGCGAGGCCCTGTGTTCTGATGATCCTGCTGA  
AAGGCGGCGAGCAGAAGGGCCACGAGAAGATCAGCGCCAGCTTCAACGAGAAG  
AAGCAGCAGTCCAGCCTGTACCTGACAGCCAGCCAGCTGAGCTACAGCGGCACC  
TACTTTTGTGGCACCGCCTGGATCAACGACTACAAGCTGTCTTTCGGAGCCGGCA  
CCACAGTGACAGTGCGGGCCAATATTCAGAACCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCT  
GAGAGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTACCGACTTCGACAG  
CCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGATAAGTG  
CGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTC  
CAACAAGAGCGATTTTCGCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGA  
GGACACATTCTTCCAAGTCCTGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAA  
GAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTGAGCGTGATCGGCTT  
CAGAATCCTGCTGCTCAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGAGACTG  
TGGTCCAGCTGA

**【0339】** SEQ ID NO : 251 : HD1TCR  $\alpha$ 鏈 - 胺基酸序列

**【0340】** METLLKVLSTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGEDAVINCSSSKALYS  
VHWYRQKHGEAPVFLMILLKGGEQKGHEKISASFNEKKQQSSLYLTASQLSYSGTYF  
CGTAWINDYKLSFGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV  
SQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPE  
SSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS\*

**【0341】** SEQ ID NO : 252 : HD1 TCR  $\beta$ 鏈 - DNA序列

【0342】

ATGGGATCTTGGACACTGTGTTGCGTGTCCCTGTGCATCCTGGTGGCCA  
 AGCACACAGATGCCGGCGTGATCCAGTCTCCTAGACACGAAGTGACCGAGATGG  
 GCCAAGAAGTGACCCTGCGCTGCAAGCCTATCAGCGGCCACGATTACCTGTTCTG  
 GTACAGACAGACCATGATGAGAGGCCTGGAAGTCTGATCTACTTCAACAACAA  
 CGTGCCCATCGACGACAGCGGCATGCCCAGGATAGATTACGCGCCAAGATGCC  
 CAACGCCAGCTTCAGCACCCCTGAAGATCCAGCCTAGCGAGCCCAGAGATAGCGC  
 CGTGTACTTCTGCGCCAGCAGAAAGACAGGCGGCTACAGCAATCAGCCCCAGCA  
 CTTTGGAGATGGCACCCGGCTGAGCATCCTGGAAGATCTGAAGAACGTGTTCCCA  
 CCTGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCCACACACAGAAA  
 GCCACACTCGTGTGTCTGGCCACCGGCTTCTATCCCGATCACGTGGAAGTGTCTT  
 GGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGTACCGATCCTCAGCCTC  
 TGAAAGAGCAGCCCGCTCTGAACGACAGCAGATACTGCCTGAGCAGCAGACTGA  
 GAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCAGAAACCACTTCAGATGCCAGGTGC  
 AGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGGATAGAGCCAAGCCTG  
 TGACACAGATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAG  
 CGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGTCTGCCACAATCCTGTACGAGATCCTGCTG  
 GGCAAAGCCACTCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCCCTGGTGCTGATGGCCATGG  
 TCAAGCGGAAGGATAGCAGGGGCTGA

【0343】 SEQ ID NO : 253 : HD1 TCR  $\beta$ 鏈 - 胺基酸序列

【0344】

MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDY  
 LFWYRQTMMRGLELLIYFNNNPIDDSGMPEDRFSKMPNASFSTLKIQPSEPRDSA  
 VYFCASRKTGGYSNQPQHFGDGTRLSILEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV  
 CLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATF  
 WQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG  
 VLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG\*

【0345】 表14：經編輯T細胞中TCR插入之效率

SEQ ID NO:	CD3+		CD3 neg		CD3+CD8+Dx+		樣品(n)
	平均值%	SD	平均值%	SD	平均值%	SD	
95	62	N/A	39	N/A	68	N/A	1
6	51	N/A	49	N/A	88	N/A	1
6及95	45	10	55	10	95	1	3
模擬	98	1	2	1	0	0	3

【0346】 表15：經TCR編輯T細胞之表現型

SEQ ID NO	N/Tscm		CM		EM		TemRa		樣品(n)
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	
PBMC	44	4	25	5	19	3	12	5	3
模擬	56	12	31	13	9	2	4	2	3
95	93	N/A	4	N/A	0	N/A	2	N/A	1
6	94	N/A	4	N/A	1	N/A	2	N/A	1
6及95	82	8	13	6	3	2	2	0	3

【0347】 測試具有TRAC及TRBC編輯及LV HD1-TCR插入之T細胞的殺死初級AML母細胞之能力。使用抗原決定基肽多聚體染色及磁性分選以磁性方式分選經編輯T細胞以富集WT1-CD8<sup>+</sup>特異性T細胞。轉導之後二十一天，將WT1-CD8<sup>+</sup> T細胞與獲自攜帶HLA-A\*02:01對偶基因之3位不同患者之初級AML母細胞及作為對照之不攜帶特異性HLA等位基因之初級母細胞共同培養。共同培養物以不同效應子:目標比率(1:1；5:1；10:1)接種。在6小時共同培養後，將卡斯蛋白酶3在活目標細胞中之表現用作讀數。結果示於圖9A-D及表16中。觀測到在多達43%之表現WT1且攜帶HLA-A\*02:01之白血病母細胞中誘發細胞凋亡(平均值± SEM = 31 ± 6.6)。偵測到無法識別不表現HLA-A\*02:01對偶基因之AML母細胞。

【0348】 表16：AML殺死

條件	E:F比率	模擬	HD1-TCR+ 平均值%	SD
pAML#14	1:1	5.9	22.1	4.9
	5:1	6.7	36.1	10.9
	10:1	7.5	38.6	11.6
pAML#15	1:1	3.6	15.7	16.9
	5:1	4.4	14.5	6.7
	10:1	5.3	18.1	8.1
pAML#16	1:1	3.1	9.4	3.1
	5:1	3.1	14.7	5.5
	10:1	3.4	16.4	5.6
pAML HLA-A*02:01	1:1	16.2	13.2	1.8
	5:1	13.8	9.8	2.2
	10:1	15.1	12.1	2.5

【0349】 實例8：用於多次編輯之另外TRAC及TRBC引導物

【0350】 亦測試另外crRNA之TRAC及TRBC基因座之同時編輯。T細胞用含有SEQ ID NO：185之RNP、含有SEQ ID NO：6之RNP或兩種RNP物種之混合物核轉染。如實例3中進行程序，但其中改用補充有5%

FBS、50  $\mu$ M  $\beta$ -巯基乙醇、10mM N-乙醯基L-胱胺酸、1X青黴素-鏈黴素溶液(Corning，目錄號30-002-CI)且視情況有IL7 (5 ng/ml)、IL15 (5 ng/ml)及IL2 (200-500 U/ml)之BioWhittaker™ X-VIVO™ 15造血性無血清培養基(Lonza™，目錄號04-418Q)。在核轉染之後十七天，收集T細胞且藉由NGS分析。圖10及表17顯示在同時核轉染之後各基因座之編輯(呈插入或缺失頻率)。亦可使用流式細胞測量術藉由量測在其表面上表現TCR蛋白質之T細胞之部分來測試編輯效率。

**【0351】** 表17：用多種引導物編輯

條件	擴增子	平均插入或缺失頻率	標準差
SEQ ID NO：6 及SEQ ID NO：185	TRAC	83.4%	0.3%
	TRBC1	82.2%	0.9%
	TRBC2	77.1%	0.2%
無引導物	TRAC	0.1%	0.1%
	TRBC1	0.4%	0.6%
	TRBC2	1.0%	0.7%

**【0352】** 實例9

**【0353】** 如實例7中所述測試靶向另外一對TRAC及TRBC之crRNA的組合編輯。T細胞用含有SEQ ID NO：95之RNP、含有SEQ ID NO：2之RNP或兩種RNP物種之混合物核轉染。TRAC及TRBC基因剔除效率藉由流式細胞測量術評估不具有CD3分子之T細胞之百分比來評定，如圖11A及表18中所示。

**【0354】** 表18：TCR阻斷基因表現之效率

SEQ ID NO:	CD3+		CD3neg		樣品(n)
	平均值%	SD	平均值%	SD	
95	0.5	N/A	99.5	N/A	1
2	10.2	N/A	89.3	N/A	1
2及95	1.8	1.0	98.1	1.0	3
模擬	96.8	N/A	2.4	N/A	1

【0355】在慢病毒轉導之後，T細胞表現型藉由細胞螢光分析來評估，如圖11B及表19中所示。WT1特異性CD8<sup>+</sup> T細胞之百分比藉由量測抗原決定基肽多聚體陽性來評估(圖11C、表19)。經編輯T細胞之T細胞表現型示於圖11D及表20中。

【0356】表19：經編輯T細胞中TCR轉導之效率

SEQ ID NO:	CD3+		CD3 neg		CD3+CD8+Dx+		樣品(n)
	平均值%	SD	平均值%	SD	平均值%	SD	
模擬	99.6	N/A	0.4	N/A	0	N/A	1
2及95	40.1	5.4	59.9	5.4	93	1	3

【0357】表20：經TCR編輯T細胞之表現型

SEQ ID NO	N/Tscm		CM		EM		TemRa		樣品(n)
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	
PBMC	44	4	25	5	19	3	12	5	3
模擬	86	N/A	10	N/A	1	N/A	3	N/A	1
2及95	89	4	8	3	1	0	3	1	3

【0358】實例7及9之經工程改造之細胞使TRAC gRNA及TRBC gRNA與編碼具有SEQ ID NO:251之TCR  $\alpha$ 鏈及SEQ ID NO:253之TCR  $\beta$ 鏈的WT1特異性TCR之慢病毒載體組合。經工程改造之細胞可藉由遞送第一及第二組合物至細胞來改變，且其中第一組合物包含：(a)包含選自以下之序列的引導RNA：(i)選自SEQ ID NO:1-89之引導序列；(ii)選自SEQ ID NO:1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；(iii)與選自SEQ ID NO:1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；(iv)包含SEQ ID NO:1-24中任一者的引導序列；及(iv)包含SEQ ID NO:1-6中任一者的引導序列；或(b)編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況(c)經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸；且其中第二組合物包含編碼具有SEQ ID NO:251之TCR  $\alpha$ 鏈及SEQ ID NO:253之TCR  $\beta$ 鏈

的WT1特異性TCR之慢病毒載體。

**【0359】** 在一些實施例中，經工程改造之細胞可藉由遞送組合物來改變，該組合物進一步包含：(a)包含選自以下之序列之引導RNA：(i)選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；(ii)選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；(iii)與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；(iv)包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者的引導序列；及(iv)包含SEQ ID NO：90-95中任一者的引導序列；或(b)編碼(a.)之引導RNA之核酸。

**【0360】** 實例10. 用單一引導物編輯

**【0361】** 除非實例中另外提及，否則以下實例藉由以下方法進行。

### 基因組DNA分離

**【0362】** 核轉染後> 48小時收集T細胞。如實例1中所述進行DNA分離。如實例1中所述，對DNA樣品進行PCR及後續NGS分析。

### 將RNP遞送至T細胞

**【0363】** 健康供體PBMC或leukopak以商業方式獲得且T細胞遵循製造商之方案使用來自微珠套組(Miltenyi Biotec)之筆直CD4/CD8藉由陽性選擇或使用EasySep人類T細胞分離套組(Stem Cell Technology，目錄號17951)藉由陰性選擇來分離。將T細胞極冷保藏於Cryostor CS10冷凍培養基(目錄號07930)中用於將來使用。解凍後，將T細胞靜置於補充有200 U/mL IL2(Peprotech)及各5 ng/ml之IL7及IL15的鹼性培養基(補充有2-巰基乙醇、N-乙醯基-半胱胺酸及5%人類AB血清或FBS之XVIVO15)中隔

夜。T細胞隨後用如製造商所推薦之T Cell TransAct (Miltenyi Biotec, 130-111-160)活化且培養48至72小時，之後進行電穿孔。

**【0364】** 包含Cas9蛋白質及ggRNA之核糖核蛋白(RNP)複合物藉由首先藉由混合等量之試劑且在95°C下培育2分鐘且冷卻至室溫使個別crRNA及trRNA預黏接而產生。RNP中之引導物利用先前藉由在95°C下培育2分鐘之後冷卻至環境溫度而黏接之以單一RNA分子(單導引RNA, sgRNA)或以兩個個別RNA分子(雙引導RNA, dgRNA)形式締合之crRNA及trRNA。靶向TRAC或TRBC基因座之RNP藉由以2:1莫耳比混合SEQ ID NO: 186 (TRAC)或SEQ ID NO: 180 (TRBC1/2)與SpyCas9而複合，達至最終濃度20  $\mu\text{M}$ 之Cas9-RNP。對於電穿孔，T細胞以5至 $20 \times 10^6$ 個細胞/100微升懸浮，且如所示添加TRAC及TRBC RNP至最終濃度2  $\mu\text{M}$ 之RNP。T細胞使用P3初級細胞96孔Nucleofector™套組(Lonza, 目錄號V4SP-3960)或Lonza 4D-核轉染子X單元(目錄號: AAF-1002X)使用Buffer P3及製造商之脈衝代碼用RNP來核轉染。電穿孔後即刻將鹼性培養基添加至細胞中，且使細胞靜置至少4小時。

**【0365】** 對於選擇分析，使用G-Rex方案擴增細胞。簡言之，在電穿孔之後，轉移 $1 \times 10^6$ 個細胞於24孔G-Rex之1個孔中於1 ml細胞介素培養基中，及轉移等於MOI  $3 \times 10^5$ 之病毒至孔中。在24小時之後，使用細胞介素培養基將體積補充至7 ml。每2至3天，在不干擾細胞下移除一半培養基(3.5 ml)，且添加2倍細胞介素培養基。在第11至13天之後收集。

#### 用於流式細胞測量術之細胞染色

**【0366】** 在RNP核轉染之後四至12天，將經編輯T細胞(200微升/200,000個細胞)收集於96孔圓底盤中且在500g下短暫離心5分鐘。接著使

細胞再懸浮於含有靶向CD3、CD4、CD8、CD45RO、CD45RA、CD27、CCR7、CD62L之抗體及/或TCR特異性pMHC四聚體或TCR特異性V $\beta$ 鏈抗體之組合的抗體混合物中。在室溫下在黑暗中培育混合物45分鐘。將樣品在500g下短暫離心5分鐘，收集細胞集結粒，且再懸浮於FACS緩衝液中之1:10,000 DAPI (Biolegend - #422801)中。接著使用cytoflex根據製造商之說明書進行流式細胞測量術。

【0367】亦測試經刺激T細胞中單一引導物之TRAC及TRBC基因座之個別及同時編輯。T細胞用2:1之引導物:Cas9比率之靶向TRBC1及TRBC2基因座之含有引導SEQ ID NO: 180之RNP、靶向TRAC之含有引導SEQ ID NO: 186之RNP或兩種RNP物種之混合物核轉染。電穿孔後兩天，使T細胞傳代且收集溶胞物。

【0368】如實例1中所述製備基因組DNA且進行NGS分析。一式三份測試樣品及單份模擬樣品。用於個別及同時編輯TRAC及TRBC引導物之TCR表面表現之阻斷效率藉由流式細胞測量術以存在或不存在CD3為目標來評定。不具有CD3分子之T細胞百分比示於表21及圖12A中。

【0369】表21：群體中之經編輯CD3-細胞

樣品	平均CD3-%	SD	n
TRAC RNP	98.47	0.06	3
TRBC RNP	91.20	0.17	3
TRAC/TRBC RNP	95.83	5.05	3

【0370】

【0371】在CD3<sup>-</sup>T細胞中TRAC及TRBC之個別及組合編輯之後藉由NGS分析評定插入或缺失頻率。TRAC及TRBC之引導物編輯百分比示於表22及圖12B中。

【0372】表22：在T細胞中之TRAC引導物編輯

SEQ ID NO :	TRAC 平均插入或缺失%	TRAC SD	TRBC1 平均插入或缺失%	TRBC1 SD	TRBC2 平均插入或缺失%	TRBC2 SD	N
TRAC KO	90	1.2	0.4	0	0.2	0.1	3
TRBC KO	0.2	0.1	85.4	3.2	91.2	1.5	3
TRAC KO + TRBC KO	81.8	4.7	78.2	4.4	83.6	2.7	3
模擬	0.2	-	0.2	-	0.1	-	1

【0373】 實例11. TRAC引導物插入篩選

【0374】 將AAV模板插入至T細胞中

【0375】 使用靶向TRAC基因座之12種引導物之位置設計腺病毒相關病毒(AAV)模板，該模板缺失TRAC基因座之80 bp區以防止修復後之位點切割且防止引導物/Cas9切割模板。由此將產生可將TCR插入至TRAC基因座中之基因座。使用具有80bp缺失之同源臂，構築體經設計以插入模型TCR且第二構築體經設計以插入GFP，兩者皆由EF1a啟動子驅動，接著藉由GenScript USA Inc.合成且插入至具有用於次選殖至AAV載體中之BglII限制位點之pUC19載體中。AAV模板設計成具有側接TRAC引導物切割位點之同源臂以在T細胞中位點特異性插入編碼TCR或報導分子(亦即GFP)之基因。

【0376】 如實例10中所述進行T細胞分離及RNP核轉染程序。電穿孔後十分鐘，將T細胞以 $1 \times 10^6$ 個細胞/毫升添加至細胞介素培養基，且添加MOI為 $3 \times 10^5$ 之AAV模板。電穿孔後二十四小時，將細胞分開且在用於功能分析之前於靜態培養物或G-REX多孔盤(Wilson Wolf Manufacturing)中再擴增4至12天，或極冷保藏。進行流式細胞測量術。

### TRAC引導物插入篩選

【0377】 在T細胞中篩選靶向TRAC基因座之外顯子1之雙引導物以

評估插入效率。最初篩選使用編碼GFP報導基因AV9之基於AAV之插入模板(AV9)，其設計成具有80 bp間隙，該間隙經設計以涵蓋表23中所列舉之引導物之靶點。AV9描述於以下表37中。T細胞用含有雙引導物之RNP重複兩次核轉染，但其中僅AAV且無RNP(模擬)樣品用作對照。用RNP進行細胞轉導之程序如實例10中所述進行，但其中引導物:Cas9比率改為1:1。TRAC引導物之插入效率藉由如實例10中所述之流式細胞測量術偵測插入之構築體的GFP之螢光來測定，如表23及圖13A中所示。用於TRAC引導物編輯之TCR表面表現之阻斷效率藉由流式細胞測量術以存在或不存在CD3為目標來評定。不具有CD3分子之T細胞百分比示於表23及圖13B中。

**【0378】** 表23. 插入之引導物之GFP表現百分比

引導物	GFP %	GFP % SD	CD3- 細胞% (n=1)
96	6.44	0.28	4.96
213	8.22	0.06	19.8
90	43.9	1.41	98.9
97	20.05	3.61	58.1
95	22.65	2.9	99.2
98	19.1	1.98	26.8
214	36.05	1.63	61.5
185	32.05	3.32	85.7
215	31	0.28	17.9
216	30.4	8.2	13.1
217	39.4	0.14	31.6
218	26.55	0.07	52.5
模擬	0	0	0.45
僅AAV	4.52	0.72	NA

**【0379】** 實例12. 用於TRAC插入之單引導物篩選

**【0380】** 接著在T細胞中篩選靶向TRAC基因座之外顯子1之單引導物以使用AV9評估插入效率。用於T細胞製備及RNP轉導之程序如實例10

中所述重複兩次進行，但其中引導物:Cas9比率改為1:1。AV9如實例11中所述用表24中所列舉之引導物設計。如實例1中所述進行NGS插入或缺失分析。

**【0381】** TRAC引導物之插入效率藉由流式細胞測量術偵測插入之構築體的GFP之螢光來測定，如表24及圖14A中所示。藉由TRAC引導物之TCR表面表現之基因剔除效率藉由流式細胞測量術以存在或不存在CD3為目標來評定。不具有CD3分子之T細胞百分比示於表24及圖14B中。亦分析經化學修飾及未經修飾之引導物之編輯效率且發現具有活性。

**【0382】** 表24. GFP陽性細胞之百分比

引導物	GFP% (平均值)	GFP% SD	CD3-細胞%	CD3- 細胞% SD
201	45.65	0.78	88.85	0.21
202	40.65	2.05	89.10	0.42
203	53.05	0.21	96.15	0.21
204	51.95	2.33	95.70	0.71
191	37.15	1.34	95.95	0.21
205	66.35	3.46	93.50	0.71
206	73.15	1.34	93.25	0.78
211	53.75	0.21	92.55	0.21
207	48.45	1.34	62.25	0.64
208	57.35	1.06	71.50	0.14
209	55.00	2.97	72.15	1.91
210	53.15	2.05	93.70	0.28
186	36.15	0.35	85.50	0.57
模擬	1.88	0.41	0.63	0.01
僅AAV	0.00	0.00	1.71	0.78

**【0383】** 實例13 - 評定用於外源TCR插入及表現之啟動子及ITR用於功能分析之基因編輯TCR-T細胞之工程改造

**【0384】** 在多種啟動子及兩種ITR長度下測試TCR插入及後續表面表現。T細胞分離及用引導SEQ ID NO：185進行RNP轉染如實例10中所

述進行，但其中改用1:1莫耳比之gRNA:SpyCas9。含有TCR-C之AAV構築體向T細胞中之RNP轉導如實例11中所述進行。AAV模板含有與側接TRAC基因座中SEQ ID NO: 185切割位點之各側的500 bp對應之500 bp同源臂。各AAV構築體之特徵為啟動子及ITR之不同組合，如表25中所示。經編輯T細胞為染色用於流動式細胞測量術分析之四聚體，如實例11中所述。

**【0385】** TCR-C插入效率藉由細胞螢光分析經由細胞表面上CD3<sup>+</sup>之存在評定T細胞身分與經由TCR特異性配位體之四聚體(RMF肽)評定表現所插入TCR之細胞的數目來評估(參見例如US20160083449A1，其內容以引用的方式併入本文中)。CD3<sup>+</sup> 四聚體 + 細胞之百分比示於表25及圖15A中。四聚體染色之T細胞之平均螢光強度(MFI)示於表25及圖15B中。

**【0386】** 表25. 用於AAV模板之啟動子及ITR

此表中所示之序列要素及序列進一步定義於表37中。

AAV模板ID	啟動子	ITR長度(bp)	四聚體 + CD3+% (平均值)	SD	CD3+螢光強度(平均值)	SD	n
AV2	Efla - 短	145	0.48	0.48	52752	34002	2
AV3	MND-1	141	15.85	1.48	77704	646	2
AV6	MND-1	145	18.55	0.49	67845	4084	2
AV4	MND-2	141	17.10	0.57	116978	6798	2
AV8	MND-2	145	14.55	2.62	65281	3117	2
AV5	PGK	135	2.35	0.03	23410	437	2
AV7	PGK	146	9.01	0.57	12596	78	2
AV1	EF1a	146	37	-	117223	-	1

實例14：使用內源性TRAC啟動子之經工程改造之T細胞中之GFP表現

**【0387】** 在另一實驗中，將依序含有P2A核糖體跨越位點、GFP報導基因(亦即無外源性啟動子)之AAV模板(AV10)插入至TRAC基因座之外顯子1中以判定內源性TRAC啟動子是否可驅動GFP表現。如實例10中所

述T細胞用含有引導SEQ ID NO：186之RNP核轉染且用AAV AV10轉導。對照條件包括未經編輯之T細胞(模擬)及接受RNP核轉染但無AAV之T細胞(僅RNP)。在培養4天之後，經編輯T細胞用用於CD3之結合APC-Cy7之抗CD3e (Biolegend, 300318)共染色，且藉由流式細胞測量術分析GFP表現及TCR基因剔除，如表26及圖16A-C中所示。

表26 群體中經編輯CD3-及GFP陽性細胞之百分比.

樣品	%CD3-	SD	%GFP+	SD
AV10-GFP + RNP	97.5	0.05	76.4	1.9
僅RNP	86.7	2.05	1.1	0.0
模擬品	0.8	0.04	0.0	0.0

實例15：使用內源性及外源性TRAC啟動子之經工程改造之T細胞中之TCR表現

【0388】 在另一實驗中，將含有TCR-A、TCR-CP或TCR-D且有或無外源性啟動子之AAV模板插入至TRAC基因座中以判定內源性TRAC啟動子是否可驅動插入之TCR表現及起作用。T細胞轉染及AAV插入分別如實例10及11中所述重複兩次進行。T細胞用含有TRAC (SEQ ID NO：186)及TRBC (引導SEQ ID NO：180)之RNP核轉染，其中含有引導物之RNP含有表27中所示之多種AAV模板。表現插入之TCR的T細胞藉由流式細胞測量術使用對CD4+及CD8+細胞中插入之TCR之TCR Vβ鏈具有特異性之抗體來偵測，如表27及圖17A-C中所示(用於TCR-A之抗Vβ8，[Biolegend目錄號140104]、圖17B中之用於TCR-D之Vβ7.2[Beckman Coulter，目錄號IM3604]及圖17C中所示之用於TCR-C之Vβ17[Beckman Coulter，目錄號IM2048])。

【0389】 表27. 有及無外源性啟動子存在下經工程改造之TCR之表面表現

AAV模板	TCR	啟動子	% CD4+ CD3+ Vb+ (平均值)	SD	% CD8+ CD3+ Vb+ (平均值)	SD
AV21	TCR-A	內源性(PL)	67.05	0.49	66.50	1.27
AV11	TCR-A	EF1a	65.45	0.49	66.05	1.20
AV20	TCR-D	內源性(PL)	69.85	0.07	70.25	0.64
AV18	TCR-D	EF1a	44.60	0.00	47.00	0.00
AV19	TCR-C	內源性(PL)	50.45	0.35	46.40	0.99
AV12	TCR-C	EF1a	60.20	0.71	54.70	0.85

\*PL - 無啟動子模板構築體

此表中所示之序列要素及序列進一步定義於表37中。

**【0390】** 進行響應於特異性WT1肽抗原之T細胞脫粒及細胞介素釋放以測試自內源性啟動子或外源性TRAC啟動子表現之經工程改造之效應T細胞之官能度。特定言之，評定經工程改造之T細胞與來自癌細胞株OCI-AML3之肽脈衝式細胞(DSMZ，目錄號ACC 582)共同培養後之CD107a之上調及IL2及IFN $\gamma$ 之表現。簡言之，100,000個OCI-AML3細胞在37度下在具有0至5000 nM範圍內之滴定量之9聚體肽VLDFAPPGA (VLD)或RMFPNAPYL (RMF)肽濃度的鹼性培養基(Xvivo鹼性培養基：無細胞介素 + 1  $\mu$ L/mL GolgiPlug + 0.7  $\mu$ L/mL GolgiStop及30  $\mu$ L/mL CD107a APC/Cy7 (3微升/孔))中脈衝處理4至5小時。經基因編輯之TCR+ T細胞以 $1 \times 10^6$ 個插入TCR之細胞/毫升懸浮於含有最終濃度30  $\mu$ l /mL CD107a APC/Cyanine7抗體(Biolegend)、1  $\mu$ l/ml Golgiplug (BD)及0.7  $\mu$ l/ml Golgistop (BD)之XVIVO15鹼性培養基中，且以1:1之效應細胞:目標細胞(E:T)比率添加至肽脈衝式細胞中。在37°C下培育共同培養物隔夜，且細胞針對表面標記物CD3、CD4、CD8及TCR-A或TCR-D之特異性TCR $\beta$ 鏈染色，且培育30分鐘。在表面染色之後，對於細胞內IFN- $\beta$ 及TNF $\alpha$ 染色，使用市售套組(Invitrogen)使細胞固定且滲透，之後在室溫下

培育30分鐘。在細胞內染色之後，將細胞洗滌且藉由流式細胞測量術進行分析。

【0391】 EF1a (或EF-1 $\alpha$ )及內源性啟動子對T細胞殺死及細胞介素釋放之作用藉由對於各樣品中所存在之CD107a、IFN $\gamma$ 及或TNF $\alpha$ 呈陽性之細胞的百分比來量測。具有TCR及啟動子類型之效應T細胞列於表28中。TCR+ T細胞之流式細胞測量術結果示於表28中且表現TCR-A之細胞的劑量反應曲線示於圖18A (AV21及AV11)中。表現TCR-D之CD107a+細胞之百分比示於表28及圖18B (AV20及AV18)中。由T細胞誘發之免疫反應藉由量測TNF- $\alpha$ 及干擾素 $\gamma$ 之百分比來評估，如表28及圖19A-B中所示。

表28. 有及無外源性啟動子存在下表現TCR之經工程改造之T細胞中之脫粒及干擾素 $\gamma$ 反應

構築體	TCR	啟動子	肽濃度	%CD107a+	SD	%TNF $\alpha$ + IFN $\gamma$ +	SD
AV21	TCR-A	內源性	0 nM	3.79	0.49	0.08	0.02
			0.5 nM	40.55	0.35	9.66	1.34
			5 nM	88.70	0.42	22.75	1.34
			50 nM	97.55	0.07	29.10	0.00
			500 nM	98.55	0.07	38.55	1.34
			5000 nM	98.65	0.35	32.80	1.56
			5000 nM RMF	11.50	0.71	1.60	0.57
AV11	TCR-A	EF1a	0 nM	3.83	0.33	0.02	0.03
			0.5 nM	42.85	0.07	4.92	0.40
			5 nM	90.15	0.78	17.20	0.85
			50 nM	97.65	0.21	28.90	0.28
			500 nM	98.15	0.07	37.15	2.19
			5000 nM	98.60	0.00	34.35	0.35
			5000 nM RMF	11.45	0.21	0.83	0.11
AV20	TCR-D	內源性	0 nM	1.73	0.18	0.05	0.04
			0.5 nM	2.16	0.19	0.21	0.08
			5 nM	11.95	0.21	3.40	0.23

構築體	TCR	啟動子	肽濃度	%CD107a+	SD	%TNFa+ IFNg+	SD
			50 nM	53.30	0.85	11.35	0.07
			500 nM	87.15	0.64	21.05	1.91
			5000 nM	92.30	0.28	26.20	0.85
			5000 nM RMF	1.82	0.13	0.01	0.01
AV18	TCR-D	EF1a	0 nM	2.56	0.11	0.01	0.02
			0.5 nM	3.52	0.45	0.12	0.08
			5 nM	12.70	1.98	2.12	0.00
			50 nM	53.25	4.60	10.58	1.87
			500 nM	85.10	2.40	17.25	1.34
			5000 nM	91.35	1.63	19.15	2.62
			5000 nM RMF	2.86	0.25	0.05	0.01

此表中所示之序列要素及序列進一步定義於表37中。

實例16：藉由基因剔除內源性T細胞受體 $\alpha$ 鏈與 $\beta$ 鏈增加TCR表現

**【0392】** 評估T細胞之包含插入之 $\alpha$ 鏈與插入之 $\beta$ 鏈的經工程改造之TCR-A、TCR-B或TCR-D之表面表現。測試增加插入之 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈配對之三個條件：(1)添加可形成半胱胺酸橋鍵以締合插入之 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈的半胱胺酸殘基，(2)自內源性TRAC啟動子或自外源性啟動子表現及(3)破壞TRAC、TRBC1及TRBC2 TRAC內源性複本。T細胞轉染及AAV轉導如實例10中所述進行。如上文所述，用僅靶向TRAC基因座之RNP或靶向TRAC、TRBC1與TRBC2基因座之RNP經由AAV模板、AV11、AV13、AV18或AV20插入TCR。轉染後，T細胞如實例10中所述擴增。細胞擴增後九天，經編輯T細胞用抗CD3e及適當V- $\beta$ 試劑(PE)共染色以經由流式細胞測量術鑑別經工程改造之TCR。各條件之TCR-A及TCR-B CD3+Vb7.2+細胞之百分比示於表29中。圖20A及20B針對表29中之資料繪製經工程改造之TCR-A及TCR-B CD3+Vb7.2+細胞之表面表現之代表性實例。亦量測CD8+及CD4+細胞群體中經工程改造之TCR-A及TCR-B之表

面表現，如表29及圖21C中所示。

【0393】 表29. 評定包含插入之 $\alpha$ 鏈與 $\beta$ 鏈的經工程改造之TCR-A及TCR-B之表現

樣品	RNP	CD8+				CD4+			
		平均 CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD	平均 CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD
AV13- TCR-B (有 cys)	TRAC	62.2	1.56	8487	290	68.85	0.64	8947	291
	TRAC + TRBC	69.05	2.05	20709	443.3 6	75.35	2.05	24521	492
AV11- TCR-A (無 cys)	TRAC	60.8	nd	12520	nd	69.3	nd	13782	nd
	TRAC + TRBC	67.55	0.21	40104	2203	74.75	0.50	49273	1743

【0394】 使用內源性或外源性啟動子之AV20-TCR-D及AV18-TCR-D CD3+ Vb7.2+細胞之百分比示於表30中。如表30及圖21A-D中所示量測CD8+及CD4+細胞群體中經工程改造之TCR-D之表面表現。

【0395】 表30 評定包含插入之 $\alpha$ 鏈與 $\beta$ 鏈的經工程改造之TCR-D之表現

樣品	RNP	CD8+				CD4+			
		CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD	CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD
AV18-TCR-D	TRAC	41.3	nd	13586	nd	58.6	nd	22324	nd
	TRAC + TRBC	71.4	1.6	58469	12479	74.05	1.15	85360	18034
AV20-TCR-E	TRAC	40.4	nd	25613	nd	62.1	nd	13406	nd
	TRAC + TRBC	83.5	0.3	44342	11035	84.1	0.3	71007	18790

【0396】 實例17：TRBC基因剔除對來自另外TCR之 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈配對之影響。

【0397】 用另外經工程改造之TCR評估T細胞之內源性 $\beta$ 鏈對插入之 $\alpha$ 鏈與插入之 $\beta$ 鏈配對之影響。如本文所述進行實驗，但其中改用四聚體染

色量測MFI，且改用表31中之AAV插入物用於轉導。細胞擴增後九天，經編輯T細胞用VLD-四聚體(一種Vβ染色之正交方法)共染色以如表31中所示藉由流式細胞測量術鑑別具有TCR表面表現之細胞，且來自代表性實驗之資料示於圖22、23及24中。平均螢光強度(MFI)亦藉由流式細胞測量術測定，如表31及圖25及26所示。

【0398】 表31. 經工程改造之T細胞中之表面TCR表現

樣品	RNP	CD8+				CD4+			
		平均四聚物+%	SD	平均四聚體MFI	SD	平均四聚物+%	SD	平均四聚體MFI	SD
AV11-TCR-A	TRAC	12.65	0.6	21853.5	12	7.6	0.4	10064.5	634
	TRAC + TRBC	51.2	3.9	23697	1605	48	2.5	11332	387
AV14-TCR-F	TRAC	61.05	6.2	50097	3828	78.9	0.8	67332.5	1379
	TRAC + TRBC	76.6	0.3	171770	7974.	81.8	2.3	231348	8432
AV15-TCR-G	TRAC	73.6	0.3	101676	2594	77.55	0.77	101366	4317
	TRAC + TRBC	81.9	0.1	190002	3919	85.35	2.05	251084	1569
AV16-TCR-H	TRAC	68.85	1.8	75226.5	1704	71.65	1.8	64255	3921
	TRAC + TRBC	77.1	3.8	138847	1916	80.25	3.5	131127	5313
僅RNP	TRAC	0.0555	0.05	n.a	n.a	0.112	0.04	n.a	n.a
	TRAC + TRBC	0.052	0.02	n.a	n.a	0.107	0.06	n.a	n.a

【0399】 實例18 - 經工程改造之T細胞細胞毒性及細胞介素釋放

【0400】 分別經由量測目標細胞中之細胞凋亡及量測釋放至生長培養基中之細胞介素來分析經工程改造之T細胞的細胞毒性及細胞介素反應。如本文所述使用表32中所述之AAV模板序列用僅靶向TRAC基因座之RNP或靶向TRAC與TRBC基因座之RNP對T細胞工程改造。如實例15中所述將HLA-02.01陽性T2細胞株目標細胞脈衝處理且與經編輯T細胞共同培養，但其中TCR+T細胞之細胞比率為2.5:1之E:T。將卡斯蛋白酶3/7紅

試劑(Essen Bioscience)以2  $\mu$ M之最終濃度添加至各孔中。在6小時之後使用Incucyte活細胞分析系統(Essen Bioscience)及Incucyte S3分析軟體(2018B版)定量來自卡斯蛋白酶3/7細胞凋亡細胞之紅色螢光。在24小時之後，收集來自各孔之上清液且藉由ELISA使用Duoset ELISA套組(R&D Systems)遵循製造商之方案定量IL2及IFN- $\gamma$ 細胞介素釋放。平均卡斯蛋白酶3/7整合強度示於表32及33及圖27A-C及28A-D中。細胞介素釋放示於表34AD及圖29A-G及30A-D中。

【0401】 表32 - 細胞毒性

樣品	肽(nM)	TRAC/TRBC		僅TRAC	
		平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD	平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD
AV11-TCR-A	0nM VLD	92,634	7,107	132,075	37,266
	0.005nM VLD	116,733	25,315	141,590	71,782
	0.05nM VLD	227,475	69,325	135,336	36,246
	0.5nM VLD	729,355	193,569	345,431	43,799
	5nM VLD	1,017,766	174,286	629,094	151,367
	50nM VLD	897,413	122,632	762,373	59,142
	500nM VLD	885,460	225,388	741,203	77,370
	500nM RMF	98,877	12,254	121,279	7,212
AV13-TCR-B	0nM VLD	97,684	21,060	93,536	19,338
	0.005nM VLD	126,983	7,518	88,855	42,431
	0.05nM VLD	174,492	11,465	119,259	14,122
	0.5nM VLD	388,825	71,913	180,269	23,378
	5nM VLD	835,068	86,910	382,323	94,136
	50nM VLD	922,968	49,804	724,521	280,318
	500nM VLD	876,706	57,316	748,140	249,718
	500nM RMF	78,919	21,138	81,044	8,512
AV12-TCR-C	0 nM RMF	279,375	93,562	276,204	65,787
	0.05 nM RMF	238,879	17,971	360,532	63,189
	0.5nM RMF	639,925	37,882	560,793	134,482
	5nM RMF	1,446,931	341,193	1,463,030	193,719
	50nM RMF	1,864,716	569,777	2,020,037	65,722

樣品	肽(nM)	TRAC/TRBC		僅TRAC	
		平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD	平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD
	500nM RMF	1,519,652	256,405	2,168,849	391,750
	500nM VLD	218,526	35,777	330,230	34,681

表33 - 細胞毒性

樣品	肽(nM)	TRAC / TRBC		僅TRAC	
		平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD	平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD
AV11-TCR-A	0 nM VLD	381,416	143,786	9,042	413
	0.005 nM VLD	374,092	69,482	9,184	1,881
	0.05 nM VLD	1,134,226	154,362	16,907	5,212
	0.5 nM VLD	1,173,265	110,362	38,844	19,238
	5 nM VLD	1,325,404	313,592	137,374	35,354
	50 nM VLD	1,197,360	92,955	207,010	81,220
	500 nM VLD	1,571,735	526,514	233,358	55,713
	500 nM RMF	280,465	54,951	7,342	1,113
AV14-TCR-F	0 nM VLD	21,702	8,974	18,238	3,665
	0.005 nM VLD	17,809	2,730	24,480	7,844
	0.05 nM VLD	25,664	9,946	31,096	6,502
	0.5 nM VLD	528,157	163,446	346,541	71,382
	5 nM VLD	1,297,535	240,491	930,724	169,903
	50 nM VLD	1,150,859	143,371	1,198,605	138,751
	500 nM VLD	1,228,755	146,056	845,589	119,495
	500 nM RMF	8,578	1,615	9,659	2,534
AV15-TCR-G	0 nM VLD	12,408	4,254	12,182	2,841
	0.005 nM VLD	20,974	7,838	21,046	12,983
	0.05 nM VLD	310,566	130,784	199,014	55,935
	0.5 nM VLD	963,870	113,005	1,007,001	378,833
	5 nM VLD	1,255,083	289,237	1,143,162	399,176
	50 nM VLD	1,037,328	87,408	1,276,265	379,466
	500 nM VLD	1,187,161	202,415	1,305,422	104,837
	500 nM RMF	6,795	1,439	4,949	1,238
AV16-TCR-H	0 nM VLD	7,388	1,738	6,560	1,298
	0.005 nM VLD	9,815	1,987	7,651	4,159
	0.05 nM VLD	32,360	3,457	23,556	6,335

樣品	肽(nM)	TRAC / TRBC		僅TRAC	
		平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD	平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD
	0.5 nM VLD	627,805	91,413	549,651	126,913
	5 nM VLD	983,752	124,769	991,625	147,487
	50 nM VLD	1,080,676	152,098	1,082,346	86,963
	500 nM VLD	1,181,699	122,175	1,180,497	276,768
	500 nM RMF	3,889	3,101	4,189	944

表34A - IL2細胞介素釋放

構築體	肽(nM)	IL2 TRAC/TRBC			IL2 僅TRAC		
		平均值 (pg/ml)	SD (pg/ml)	N	平均值 (pg/ml)	SD (pg/ml)	N
AV11-TCR-A	0nM VLD	46	3	3	1,715	119	3
	0.005nM VLD	34	3	3	1,490	79	3
	0.05nM VLD	52	19	3	1,436	18	3
	0.5nM VLD	50	10	3	1,186	170	3
	5nM VLD	506	29	3	1,713	264	3
	50nM VLD	1,902	104	3	3,554	223	3
	500nM VLD	4,804	345	3	5,003	112	3
	500nM RMF	46	3	3	1,615	194	3
AV13-TCR-B	0nM VLD	46	3	3	1,109	181	3
	0.005nM VLD	42	2	3	1,048	60	3
	0.05nM VLD	39	5	3	913	44	3
	0.5nM VLD	55	10	3	868	73	3
	5nM VLD	248	17	3	976	66	3
	50nM VLD	1,095	90	3	2,160	240	3
	500nM VLD	3,363	303	3	3,547	121	3
	500nM RMF	51	18	3	1,011	64	3
AV12-TCR-C	0 nM RMF	n.d.	n.d.	n.d.	498	49	3
	0.05 nM RMF	398	210	3	511	40	3
	0.5nM RMF	320	15	2	481	42	3
	5nM RMF	182	17	3	333	19	3
	50nM RMF	392	56	3	396	79	3
	500nM RMF	3,193	165	3	2,386	207	3
	500nM VLD	7,776	539	3	7,830	557	3
	0nM VLD	378	113	3	415	66	3

表34B - 干擾素 $\gamma$ 釋放

構築體	肽(nM)	TRAC/TRBC			僅TRAC		
		平均值 (pg/ml)	SD (pg/ml)	N	平均值 (pg/ml)	SD (pg/ml)	N
AV11-TCR-A	0nM VLD	<LLOD*	<LLOD	3	1,313	446	3
	0.005nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	904	243	3
	0.05nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	731	68	3
	0.5nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	1,442	148	3
	5nM VLD	7,361	399	3	4,323	332	3
	50nM VLD	15,845	1,783	3	9,221	381	3
	500nM VLD	25,242	3,021	3	11,558	407	3
	500nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	1,656	115	3
AV13-TCR-B	0nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	406	75	3
	0.005nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	265	36	3
	0.05nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	981	896	3
	0.5nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	471	140	3
	5nM VLD	4,643	154	3	1,865	183	3
	50nM VLD	11,273	643	3	3,645	184	3
	500nM VLD	19,868	1,925	3	6,476	434	3
	500nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	648	199	3
AV12-TCR-C	0 nM RMF	n.d.	n.d.	n.d.	1,243	92	3
	0.05 nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	839	144	3
	0.5nM RMF	<LLOD	<LLOD	2	1,151	93	3
	5nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	1,181	96	3
	50nM RMF	4,643	154	3	2,434	26	3
	500nM RMF	11,273	643	3	5,302	723	3
	500nM VLD	19,868	1,925	3	16,247	192	3
	0nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	1,058	93	3

\* LLOD指示讀數低於所用特定分析中之偵測水準。

表34C - IL2細胞介素釋放

TCR	肽(nM)	TRAC/TRBC			僅TRAC		
		平均值 (pg/ml)	SD (pg/ml)	N	平均值 (pg/ml)	SD (pg/ml)	N
AV11-TCR-A	0 nM VLD	314	46	3	2,259	156	3
	0.005 nM VLD	304	42	3	2,247	122	3
	0.05 nM VLD	227	29	3	2,046	188	3

	0.5 nM VLD	200	63	3	2,007	73	3
	5 nM VLD	494	15	3	4,266	96	3
	50 nM VLD	1,182	157	3	7,062	283	3
	500 nM VLD	1,511	141	3	8,375	385	3
	500 nM RMF	81	19	3	2,135	245	3
AV16-TCR-H	0 nM VLD	17	21	2	102	9	2
	0.005 nM VLD	15	0	1	44	27	3
	0.05 nM VLD	40	0	1	2	0	1
	0.5 nM VLD	17	17	2	23	11	3
	5 nM VLD	30	6	2	175	79	2
	50 nM VLD	286	8	2	111	32	3
	500 nM VLD	455	90	3	387	17	3
	500 nM RMF	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
AV15-TCR-G	0 nM VLD	306	144	3	338	28	3
	0.005 nM VLD	196	40	3	326	49	3
	0.05 nM VLD	198	42	3	284	14	3
	0.5 nM VLD	248	72	3	305	26	3
	5 nM VLD	351	27	3	442	21	3
	50 nM VLD	764	47	3	1,053	89	3
	500 nM VLD	1,203	111	3	1,566	112	3
	500 nM RMF	157	29	3	242	10	3
AV14-TCR-F	0 nM VLD	283	16	3	295	55	3
	0.005 nM VLD	303	84	3	316	24	3
	0.05 nM VLD	274	46	3	361	25	3
	0.5 nM VLD	836	103	3	724	129	3
	5 nM VLD	1,406	69	3	1,634	51	3
	50 nM VLD	3,755	180	3	3,850	116	3
	500 nM VLD	4,301	57	3	4,289	459	3
	500 nM RMF	117	53	3	190	19	2

表34D - 干擾素 $\gamma$ 釋放

TCR	肽(nM)	TRAC/TRBC			僅TRAC		
		平均值	SD	N	平均值	SD	N
AV11-TCR-A	0 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	3,491	108	3
	0.005 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	4,489	444	3
	0.05 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	5,126	262	3
	0.5 nM VLD	1,257	23	3	8,284	1,195	3
	5 nM VLD	21,739	653	3	16,572	1,237	3

	50 nM VLD	40,200	2,121	3	28,080	1,871	3
	500 nM VLD	47,628	1,520	3	31,541	3,672	3
	500 nM RMF	0	0	3	3,590	389	3
AV16-TCR-H	0 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.005 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.05 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.5 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	5 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	50 nM VLD	16,058	422	3	15,923	427	3
	500 nM VLD	24,426	61	3	24,319	849	3
	500 nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
AV15-TCR-G	0 nM VLD	219	15	3	260	33	3
	0.005 nM VLD	219	56	3	429	196	3
	0.05 nM VLD	549	102	3	854	54	3
	0.5 nM VLD	1,850	258	3	2,265	391	3
	5 nM VLD	7,034	497	3	6,424	616	3
	50 nM VLD	23,558	1,135	3	23,733	1,748	3
	500 nM VLD	31,629	1,790	3	27,473	663	3
	500 nM RMF	235	33	3	416	199	3
AV14-TCR-F	0 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.005 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.05 nM VLD	4,088	1,334	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.5 nM VLD	12,141	321	3	10,419	934	3
	5 nM VLD	26,510	1,161	3	25,934	611	3
	50 nM VLD	42,858	1,197	3	40,326	2,516	3
	500 nM VLD	50,607	2,350	3	51,106	2,385	3
	500 nM RMF	1,230	938	3	<LLOD	<LLOD	3

【0402】 實例19：如藉由CD107a脫粒及細胞內細胞介素染色(ICS)所分析之經工程改造之T細胞細胞毒性

【0403】 亦經由分別量測CD107a及細胞內細胞介素染色來評定經工程改造之T細胞之細胞毒性及細胞介素反應。如實例18中所述使用表35中所述之AAV模板序列用僅靶向TRAC基因座或靶向TRAC與TRBC基因座之RNP對T細胞工程改造。HLA-02.01陽性T2細胞株如實例18中所述脈

衝處理，但其中改將經編輯TCR+T細胞以1:1之E:T細胞比率添加至肽脈衝目標細胞中。在37°C下培育共同培養物隔夜，且細胞針對表面標記物CD3、CD4、CD8及特異性TCR $\beta$ 鏈或四聚體染色。在表面染色之後，對於細胞內IFN- $\gamma$ 及TNF $\alpha$ 染色，使用市售套組(Invitrogen)使細胞固定且滲透。誘發TCR表現之免疫反應示於表35A及圖31A-B中。有及無TRBC基因剔除下由表現之TCR產生之細胞毒性藉由量測經工程改造之T細胞中之CD107a來評估，如表35B及圖32A-B中所示。

表35A. 細胞內細胞介素染色

樣品名稱	VLD肽 (nM)	CD8+TNFa+ IFNg+			CD4+TNFa+ IFNg+		
		平均細胞 %	SD	N	平均細胞 %	SD	N
AV11-TCR-A TRAC/TRBC	0	9.4	0.2	2	1.1	0.5	2
	0.005	21.0	0.1	2	1.6	0.5	2
	0.05	53.0	0.4	2	1.2	0.1	2
	0.5	74.3	1.3	2	1.8	0.4	2
	5	79.8	0.1	2	11.1	0.7	2
	50	81.3	1.0	2	25.1	2.0	2
	50 RMF	10.0	0.3	2	1.6	0.1	2
AV14-TCR-F 僅TRAC	0	0.8	0.0	2	2.0	0.0	2
	0.005	1.0	0.2	2	1.9	0.0	2
	0.05	6.4	0.6	2	1.9	0.6	2
	0.5	44.1	1.5	2	1.3	0.1	2
	5	69.6	1.0	2	1.0	0.1	2
	50	74.1	0.2	2	1.3	0.5	2
	50 RMF	0.7	0.1	2	2.9	0.9	2
AV14-TCR-F TRAC/TRBC	0	1.3	0.0	2	1.2	0.3	2
	0.005	1.9	0.3	2	1.4	0.3	2
	0.05	8.5	0.3	2	1.1	0.5	2
	0.5	44.6	0.6	2	0.4	0.2	2
	5	68.0	1.8	2	0.3	0.0	2
	50	78.7	0.4	2	2.1	0.4	2
	50 RMF	1.8	0.1	2	1.5	0.0	2
AV15-TCR-G	0	0.4	0.1	2	2.1	0.1	2

TRAC/TRBC	0.005	7.6	0.9	2	1.6	0.2	2
	0.05	28.7	0.6	2	0.9	0.0	2
	0.5	46.5	1.3	2	0.6	0.0	2
	5	63.1	0.4	2	0.2	0.0	2
	50	71.4	1.2	2	0.1	0.1	2
	50 RMF	0.4	0.0	2	2.2	0.1	2
AV16-TCR-H TRAC/TRBC	0	0.5	0.1	2	3.1	0.1	2
	0.005	3.7	0.0	2	2.1	0.5	2
	0.05	27.1	1.0	2	3.0	0.6	2
	0.5	48.7	1.0	2	4.4	0.1	2
	5	67.5	1.5	2	6.0	0.1	2
	50	79.2	0.6	2	6.9	0.4	2
	50 RMF	0.6	0.4	2	2.9	0.5	2

表35B. CD107a脫粒

樣品名稱	VLD肽 (nM)	CD8+ CD107a+			CD4+ CD107a+		
		平均細胞 %	SD	N	平均細胞 %	SD	N
AV11-TCR-A TRAC/TRBC	0	21.95	1.06	2	4.45	1.51	2
	0.005	37.30	0.28	2	4.64	0.78	2
	0.05	64.10	0.57	2	4.68	0.44	2
	0.5	73.05	0.35	2	4.23	0.96	2
	5	75.80	1.84	2	11.85	0.49	2
	50	76.20	0.99	2	21.10	0.99	2
	50 RMF	22.05	0.49	2	4.30	0.28	2
AV14-TCR-F 僅TRAC	0	6.33	0.03	2	7.14	0.52	2
	0.005	5.93	0.13	2	7.73	1.29	2
	0.05	10.30	0.00	2	7.39	1.10	2
	0.5	42.75	0.78	2	9.08	0.46	2
	5	57.05	0.92	2	8.35	0.36	2
	50	60.75	0.07	2	9.38	0.88	2
	50 RMF	5.42	0.02	2	6.63	0.76	2
AV14-TCR-F TRAC/TRBC	0	15.90	0.14	2	5.84	0.41	2
	0.005	14.75	0.92	2	5.14	0.03	2
	0.05	22.55	1.06	2	4.89	0.40	2
	0.5	63.15	1.34	2	4.94	0.90	2
	5	78.25	0.78	2	4.71	1.35	2
	50	82.05	0.78	2	5.14	1.26	2
	50 RMF	12.00	0.00	2	3.78	0.23	2

AV15-TCR-G TRAC/TRBC	0	3.15	0.40	2	4.62	0.47	2
	0.005	12.15	1.34	2	5.06	0.47	2
	0.05	34.25	1.06	2	4.23	1.06	2
	0.5	53.30	0.99	2	4.74	1.32	2
	5	65.75	0.64	2	4.44	0.88	2
	50	73.25	0.21	2	4.52	0.05	2
AV16-TCR-H TRAC/TRBC	50 RMF	2.82	0.37	2	4.67	0.65	2
	0	2.29	0.07	2	3.42	0.60	2
	0.005	5.05	0.17	2	3.63	0.46	2
	0.05	23.60	0.85	2	4.48	0.24	2
	0.5	45.65	0.92	2	6.82	0.24	2
	5	60.70	0.28	2	8.09	0.30	2
	50	70.55	1.06	2	8.28	0.08	2
	50 RMF	2.64	0.84	2	3.70	0.15	2

**【0404】 實例20：同種異體反應性分析**

**【0405】** 亦在混合淋巴細胞反應(MLR)抑止分析中分析實例18中所製備之經工程改造之T細胞對抗原呈遞細胞之非特異性反應性。經工程改造之T細胞根據製造商之說明書用CellTrace紫(Invitrogen)標記。同種異體PBMC使用MACS (Miltenyi)耗盡CD3<sup>+</sup>細胞，且用以刺激經CTV標記之T細胞。特定言之，將 $5 \times 10^4$ 個T細胞與 $3 \times 10^4$ 個耗盡CD3之同種異體PBMC接種於96孔U底盤(Corning)中。五天後，收集細胞，用抗CD4染色且藉由流式細胞測量術分析。增生程度藉由稀釋CellTrace紫染料來定量。具有麩醯胺酸之羅斯維·帕克紀念研究所1640培養基(Roswell Park Memorial Institute, RPMI; Corning)補充有10% FBS、1× GlutaMAX、10 mM HEPES、1×青黴素/鏈黴素、1 mM丙酮酸鈉、50 μM 2-ME及1×非必需胺基酸，用於整個MLR分析中。用低含量之CellTrace紫(CTV)染色之細胞，亦即高增生之細胞的平均百分比示於表36及圖33A-B中。圖33A及33B示用以分析CTV含量之閘控。在CD4<sup>+</sup>與CD4<sup>-</sup> (CD8<sup>+</sup>)細胞中，對於所測試之各插入之TCR，用TRBC RNP處理之細胞展示比不用

TRBC RNP處理之細胞之增生小，如表36及圖33C及33D中所示。

【0406】 表36 - 響應於同種異體PBMC之增生

T細胞類型	樣品名稱	TRAC RNP + TRBC RNP			TRAC RNP		
		平均低CTV 細胞%	SD	n	平均低CTV 細胞%	SD	n
CD4-	AV12-TCR-C	18%	13%	3	52%	2%	3
	AV11-TCR-A	16%	3%	3	70%	2%	3
	AV13-TCR-B	21%	5%	3	61%	2%	3
CD4+	AV12-TCR-C	14%	1%	3	36%	3%	3
	AV11-TCR-A	16%	7%	3	40%	2%	3
	AV13-TCR-B	22%	2%	3	32%	1%	3

【0407】 表37 - 核酸模板. 注意，所有模板以ssAAV遞送且包含AAV2 5'及3'ITR。同源臂如上文所述。如下文所闡述，許多模板另外包含一或多個啟動子、裂解或polyA序列。下文「\*」指示終止密碼子。

表37

模板	轉殖基因	啟動子或(無 啟動子/肽)	TCR ORF組 態	PolyA
AV1 (SEQ ID NO : 613)	TCR-C	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV2 (SEQ ID NO : 614)	TCR-C	Ef1a - 短	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV3 (SEQ ID NO : 615)	TCR-C	MND-1	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV4 (SEQ ID NO : 616)	TCR-C	MND-2	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV5 (SEQ ID NO : 617)	TCR-C	PGK	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV6 (SEQ ID NO : 618)	TCR-C	MND-1	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV7 (SEQ ID NO : 619)	TCR-C	PGK	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV8 (SEQ ID NO : 620)	TCR-C	MND-2	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV9 (SEQ ID NO : 621)	EGFP	EF1a	n/a	SV40
AV10 (SEQ ID NO : 622)	EGFP	(T2A)	n/a	bGH
AV11 (SEQ ID NO : 623)	TCR-A	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV12 (SEQ ID NO : 624)	TCR-C	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV13 (SEQ ID NO : 625)	TCR-B	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV14 (SEQ ID NO : 626)	TCR-F	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV15 (SEQ ID NO : 627)	TCR-G	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV16 (SEQ ID NO : 628)	TCR-H	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV18 (SEQ ID NO : 629)	TCR-D	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH

模板	轉殖基因	啟動子或(無 啟動子/肽)	TCR ORF組 態	PolyA
AV19 (SEQ ID NO : 630)	TCR-C	(T2A)	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV20 (SEQ ID NO : 631)	TCR-E	(T2A)	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV21 (SEQ ID NO : 632)	TCR-B	(T2A)	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH

表37中所定義之模板之要素根據如下序列來定義：EF1a (SEQ ID NO : 603)；EF1 (SEQ ID NO : 604)；MND-1 (SEQ ID NO : 605)；MND-2 (SEQ ID NO : 606)；PGK (SEQ ID NO : 607)；T2A (SEQ ID NO : 608)；P2A (SEQ ID NO : 609)；EGFP (SEQ ID NO : 610)；SV40 Poly A (SEQ ID NO : 611)；bGH PolyA (SEQ ID NO : 612)。

## 【序列表】

<110> 美商英特利亞醫療公司(Intellia Therapeutics, Inc.)

<120> 用於免疫療法之組合物及方法

<130> 01155-0026-00PCT

<150> US 62/746,522

<151> 2018-10-16

<150> US 62/747,037

<151> 2018-10-17

<160> 283

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 1

ggcucucgga gaaugacgag

20

<210> 2

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 2

ggccucggcg cugacgau

20

<210> 3

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 3

augacgagug gaccaggau

20

<210> 4

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 4		
agaagguggc cgagaccuc		20
<210> 5		
<211> 20		
<212> RNA		
<213> 智人		
<400> 5		
ugagggucuc ggccaccuuc		20
<210> 6		
<211> 20		
<212> RNA		
<213> 智人		
<400> 6		
agagaucucc cacacccaaa		20
<210> 7		
<211> 20		
<212> RNA		
<213> 智人		
<400> 7		
uggcucaaac acagcgaccu		20
<210> 8		
<211> 20		
<212> RNA		
<213> 智人		
<400> 8		
ggcgugacg aucuggguga		20
<210> 9		
<211> 20		
<212> RNA		
<213> 智人		
<400> 9		
uggcagacag gaccccuugc		20

<210> 10  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 10  
 ugacgagugg acccaggaua 20

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 11  
 agacaggacc ccuugcuggu 20

<210> 12  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 12  
 uugacagcgg aagugguugc 20

<210> 13  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 13  
 cguagaacug gacuugacag 20

<210> 14  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 14  
 cgcugucaag uccaguucua 20

<210> 15  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 15  
acuggacuug acagcggaag 20

<210> 16  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 16  
guugcggggg uucugccaga 20

<210> 17  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 17  
cugccugagc agccgccuga 20

<210> 18  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 18  
gacagcggaa gugguugcgg 20

<210> 19  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 19  
ccacucaccu gcucuacccc 20

<210> 20  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 20  
gcugucaagu ccaguucuac 20

<210> 21

<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	智人	
<400>	21	
	acacuggugu gccuggccac	20
<210>	22	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	智人	
<400>	22	
	agaccucag gcggcugcuc	20
<210>	23	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	智人	
<400>	23	
	augggaagga ggugcacagu	20
<210>	24	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	智人	
<400>	24	
	agggcgggcu gcuccuugag	20
<210>	25	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	智人	
<400>	25	
	ucccuagcaa gaucucauag	20
<210>	26	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	智人	
<400>	26	

ggugcacagu ggggucagca 20

<210> 27

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 27

ccagcucagc uccacguggu 20

<210> 28

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 28

ccgcaaccac uuccgcuguc 20

<210> 29

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 29

guccacucgu cauucuccga 20

<210> 30

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 30

gcccguagaa cuggacuuga 20

<210> 31

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 31

ucaccagau cgucagcgcc 20

<210> 32

<211> 20

<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 32	
ggguccacuc gucauucucc	20
<210> 33	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 33	
uccaguucua cgggcucucg	20
<210> 34	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 34	
cggagaauga cgaguggacc	20
<210> 35	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 35	
accacuuccg cugucaaguc	20
<210> 36	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 36	
aaugacgagu ggaccagga	20
<210> 37	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 37	
acgggcucuc ggagaaugac	20

<210> 38  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 38  
 gacuccagau acugccugag 20

<210> 39  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 39  
 cgcuguguuu gagccaucag 20

<210> 40  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 40  
 agaacuggac uugacagcgg 20

<210> 41  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 41  
 gagaccuca ggcggcugcu 20

<210> 42  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 42  
 cgucaucuc cgagagcccg 20

<210> 43  
 <211> 20  
 <212> RNA

<213> 智人

<400> 43

cagccccgcc ucaaugacuc

20

<210> 44

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 44

ggcugcucag gcaguaucug

20

<210> 45

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 45

agugguugcg gggguucugc

20

<210> 46

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 46

ggucgcugug uuugagccau

20

<210> 47

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 47

gaucucauag aggauggugg

20

<210> 48

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 48

uguuugagcc aucagaagca

20

<210> 49  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 49  
uacugccuga gcagccgccu 20

<210> 50  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 50  
acccgcagcc ccucaaggag 20

<210> 51  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 51  
aggcaguauc uggagucuu 20

<210> 52  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 52  
uguguuugag ccaucagaag 20

<210> 53  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 53  
gguugcgggg guucugccag 20

<210> 54  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 54		
gggucucggc cacuucugg		20
<210> 55		
<211> 20		
<212> RNA		
<213> 智人		
<400> 55		
cagaaggugg ccgagaccu		20
<210> 56		
<211> 20		
<212> RNA		
<213> 智人		
<400> 56		
cgccgaggcc uggguagag		20
<210> 57		
<211> 20		
<212> RNA		
<213> 智人		
<400> 57		
gguucugcca gaagguggcc		20
<210> 58		
<211> 20		
<212> RNA		
<213> 智人		
<400> 58		
cagagaucuc ccacaccaa		20
<210> 59		
<211> 20		
<212> RNA		
<213> 智人		
<400> 59		
uugaggcgg gcuguccuu		20

<210> 60  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 60  
 aagccugugg ccaggcacac 20

<210> 61  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 61  
 cagcgccgag gccuggggua 20

<210> 62  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 62  
 cccacucacc ugcucuaccc 20

<210> 63  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 63  
 ugucugccac cauccucuau 20

<210> 64  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 64  
 ugcuucugau ggcucuaaca 20

<210> 65  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 65  
uucccauucaccccaccagcu 20

<210> 66  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 66  
gucagcgcgcg aggccugggg 20

<210> 67  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 67  
cccucagggcgc gcugcucagg 20

<210> 68  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 68  
aaugacucca gauacugccu 20

<210> 69  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 69  
cacacuggug ugccuggcca 20

<210> 70  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 70  
ucauagagga ugguggcaga 20

<210> 71

<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 71	
cacccagauc gucagcgccg	20
<210> 72	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 72	
ugacagcgga agugguugcg	20
<210> 73	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 73	
ucuccgagag cccguagaac	20
<210> 74	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 74	
aguccaguuc uacgggcucu	20
<210> 75	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 75	
aucgucagcg ccgaggccug	20
<210> 76	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 76	

aaggaggugc acaguggggu 20

<210> 77  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 77  
 uaucuggagu cauugaggc 20

<210> 78  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 78  
 gcggggguuc ugccagaagg 20

<210> 79  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 79  
 cuugacagcg gaagugguug 20

<210> 80  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 80  
 guguggccuu uugggugugg 20

<210> 81  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 81  
 gaucgucagc gccgaggccu 20

<210> 82  
 <211> 20

<212> RNA  
 <213> 智人  
  
 <400> 82  
 uguggccagg cacaccagug 20

<210> 83  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人  
  
 <400> 83  
 aggccucggc gcugacgauc 20

<210> 84  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人  
  
 <400> 84  
 gugaauugga aggaggugca 20

<210> 85  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人  
  
 <400> 85  
 gcggcugcuc aggcaguauc 20

<210> 86  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人  
  
 <400> 86  
 acugccugag cagccgccug 20

<210> 87  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人  
  
 <400> 87  
 aaaggccaca cuggugugcc 20

<210> 88  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 88  
 ugagggcggg cugcuccuug 20

<210> 89  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 89  
 gagcagccgc cugagggucu 20

<210> 90  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 90  
 cucucagcug guacacggca 20

<210> 91  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 91  
 uucggaacc aaucacugac 20

<210> 92  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 92  
 uaaaccggc cacuuucagg 20

<210> 93  
 <211> 20  
 <212> RNA

<213> 智人

<400> 93

gauuaaaccc ggccacuuc

20

<210> 94

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 94

cgucaugagc agauuaaacc

20

<210> 95

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 95

agagucucuc agcugguaca

20

<210> 96

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 96

acacggcagg gucagguuc

20

<210> 97

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 97

ucucucagcu gguacacggc

20

<210> 98

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 98

uggauuuaga gucucucagc

20

<210> 99  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 99  
 gagaaucaaa aucggugaau 20

<210> 100  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 100  
 acaaaacugu gcuagacaug 20

<210> 101  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 101  
 ugugcuagac augaggucua 20

<210> 102  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 102  
 gcaccaaagc ugccuuacc 20

<210> 103  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 103  
 aaguuccugu gaugucaagc 20

<210> 104  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 104  
cucgaccagc uugacaucac 20

<210> 105  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 105  
auccuccucc ugaaaguggc 20

<210> 106  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 106  
acccggccac uuucaggagg 20

<210> 107  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 107  
uuaaucugcu caugacgcug 20

<210> 108  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 108  
acacggauga acaauaaggc 20

<210> 109  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 109  
acuuacacgg augaacaaua 20

<210> 110  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 110  
 gcugguacac ggcaggguca 20

<210> 111  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 111  
 ggaagcuaca uaccuacauu 20

<210> 112  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 112  
 uccucacugu gugcaucagg 20

<210> 113  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 113  
 cugguuccuc uuccaaaugu 20

<210> 114  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 114  
 aaagucagau uuguugcucc 20

<210> 115  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 115  
uucaaaaccu gucagugauu 20

<210> 116  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 116  
ugcucaugac gcugcggcug 20

<210> 117  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 117  
ucaaggcccc ucaccucage 20

<210> 118  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 118  
ggcguuugca caugcaaagu 20

<210> 119  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 119  
gaccacagcc gcagcgucau 20

<210> 120  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 120  
augacgcugc ggcugugguc 20

<210> 121

<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 121  
auucggaacc caaucacuga 20

<210> 122  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 122  
aacccggcca cuuucaggag 20

<210> 123  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 123  
uuaaacccgg ccacuuucag 20

<210> 124  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 124  
agauuuuguug cuccaggcca 20

<210> 125  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 125  
ugagaaucaa aaucggugaa 20

<210> 126  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 126

gaugucaagc uggucgagaa 20

<210> 127

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 127

guuuccaagc uuuucucgac 20

<210> 128

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 128

ugaaggcguu ugcacaugca 20

<210> 129

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 129

accugaccc ugccguguac 20

<210> 130

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 130

agcuucaagg cccucaccu 20

<210> 131

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 131

guuccgauc cuccuccuga 20

<210> 132

<211> 20

<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 132	
agauuaaacc cggccacuuu	20
<210> 133	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 133	
cccugccgug uaccagcuga	20
<210> 134	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 134	
ucacuggauu uagagucucu	20
<210> 135	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 135	
uacuuacacg gaugaacaau	20
<210> 136	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 136	
uauacagac aaaacugugc	20
<210> 137	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 137	
ccacagcacu guugcucuug	20

<210> 138  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 138  
 ccugugaugu caagcugguc 20

<210> 139  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 139  
 acaugagguc uauggacuuc 20

<210> 140  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 140  
 acuguugcuc uugaagucca 20

<210> 141  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 141  
 agcuacauac cuacauuugg 20

<210> 142  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 142  
 uagaaaguuc cugugauguc 20

<210> 143  
 <211> 20  
 <212> RNA

<213> 智人

<400> 143

ucacugugug caucaggagg

20

<210> 144

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 144

gacaaaacug ugcugacau

20

<210> 145

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 145

cuucaacaac agcauuauuc

20

<210> 146

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 146

caacaacagc auuauuccag

20

<210> 147

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 147

ucucaaaaca augugucaca

20

<210> 148

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 148

augaggucua uggacuucaa

20

<210> 149  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 149  
 gaccugccg uguaccagcu 20

<210> 150  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 150  
 cccugucuu accuguuua 20

<210> 151  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 151  
 agcaacagug cuguggccug 20

<210> 152  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 152  
 cuacauaccu acuuuggaa 20

<210> 153  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 153  
 acuuugugac acuuuguuu 20

<210> 154  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 154  
aucacagaca aaacugugcu 20

<210> 155  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 155  
uucaacaaca gcuuuuucc 20

<210> 156  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 156  
caugaggucu auggacuuca 20

<210> 157  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 157  
gcuacauacc uacuuugga 20

<210> 158  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 158  
cucuuguccc acagauaucc 20

<210> 159  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 159  
gauucugaug uguauaucac 20

<210> 160  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 160  
 cugugauguc aagcuggucg 20

<210> 161  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 161  
 ccugccgugu accagcugag 20

<210> 162  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 162  
 acauaccuac auuuggaaga 20

<210> 163  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 163  
 ccucacugug ugcaucagga 20

<210> 164  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 164  
 acaaaugugu cacaaaguaa 20

<210> 165  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 165  
gagcaacagu gcuguggccu 20

<210> 166  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 166  
ucgaccagcu ugacaucaca 20

<210> 167  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 167  
auuaaacccg gccacuuuca 20

<210> 168  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 168  
cacggcaggg ucagguucu 20

<210> 169  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 169  
aaacccggcc acuuucagga 20

<210> 170  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 170  
caaggcccu caccucagcu 20

<210> 171

<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 171	
cccggccacu uucaggagga	20
<210> 172	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 172	
cauuucuaua auacuuacac	20
<210> 173	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 173	
acagccgcag cgucaugagc	20
<210> 174	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 174	
aucaaaaucg gugaauaggc	20
<210> 175	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 175	
gcguuugcac augcaaaguc	20
<210> 176	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 176	

cuguugcucu ugaaguccau 20

<210> 177

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 177

aaaucgguga auaggcagac 20

<210> 178

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 178

uugucuguga uauacacauc 20

<210> 179

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA序列

<400> 179

ggcucucgga gaaugacgag guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 180

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA序列

<400> 180

ggccucggcg cugacgaucu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 181

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA序列

<400> 181

augacgagug gaccaggau guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 182

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA序列

<400> 182

agaagguggc cgagaccuc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 183

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA序列

<400> 183

ugagggucuc ggccaccuuc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 184

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA序列

<400> 184

agagaucucc cacacccaaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 185

<211> 42

<212> RNA

<213> 智人

<400> 185

ucaggguuucu ggauaucugu guuuuagagc uaugcuguuu ug 42

<210> 186

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA序列

<400> 186

cucucagcug guacacggca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 187

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA序列

<400> 187

uucggaacc aaucacugac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 188

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA序列

<400> 188  
 uaaacccggc cacuuucagg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 189  
 <211> 100  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> sgRNA序列

<400> 189  
 gauuaaaccc ggccacuuc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 190  
 <211> 100  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> sgRNA序列

<400> 190  
 cgucaugagc agauuaaac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 191  
 <211> 100  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> sgRNA序列

<400> 191  
 agagucucuc agcugguaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 192  
 <211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA序列

<400> 192

ucagggguucu ggauaucugu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 193

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾sgRNA

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(4)

<223> 用核苷酸1至4之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (2)..(2)

<223> am

<220>

<221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (29)..(29)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (30)..(30)

<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (31)..(31)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (32)..(32)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (33)..(33)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (34)..(36)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (37)..(37)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (38)..(38)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (39)..(39)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (40)..(40)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (68)..(69)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (71)..(72)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (73)..(73)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (74)..(78)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (79)..(79)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (80)..(80)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (81)..(82)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (83)..(83)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (84)..(84)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (85)..(86)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (87)..(87)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (88)..(88)  
<223> am

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (89)..(89)

&lt;223&gt; gm

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (90)..(90)

&lt;223&gt; um

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (91)..(91)

&lt;223&gt; cm

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (92)..(93)

&lt;223&gt; gm

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (94)..(94)

&lt;223&gt; um

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (95)..(95)

&lt;223&gt; gm

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (96)..(96)

&lt;223&gt; cm

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (97)..(100)

&lt;223&gt; um

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (97)..(100)

&lt;223&gt; 用核苷酸97至100之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

&lt;400&gt; 193

gaguccgagc agaagaagaa guuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 194  
<211> 100  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 經修飾sgRNA

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (1)..(4)  
<223> 用核苷酸1至4之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (1)..(1)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (2)..(2)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (3)..(3)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (29)..(29)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (30)..(30)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (31)..(31)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (32)..(32)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (33)..(33)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (34)..(36)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (37)..(37)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (38)..(38)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (39)..(39)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (40)..(40)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (68)..(69)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (71)..(72)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (73)..(73)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (74)..(78)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (79)..(79)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (80)..(80)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (81)..(82)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (83)..(83)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (84)..(84)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (85)..(86)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (87)..(87)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (88)..(88)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (89)..(89)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (90)..(90)  
<223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (91)..(91)  
 <223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (92)..(93)  
 <223> gm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (94)..(94)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (95)..(95)  
 <223> gm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (96)..(96)  
 <223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (97)..(100)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (97)..(100)  
 <223> 用核苷酸97至100之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<400> 194  
 gaguccgagc agaagaagaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 195  
 <211> 74  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> sgRNA序列

<400> 195  
aacagcauag caaguuaaaa uaaggcuagu ccguuaucaa cuugaaaaag uggcaccgag 60  
ucggugcuuu uuuu 74

<210> 196  
<211> 100  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> sgRNA序列

<400> 196  
ggcucucgga gaaugacgag guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa aaggcuaguc 60  
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 197  
<211> 100  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> sgRNA序列

<400> 197  
ggccucggcg cugacgaucu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa aaggcuaguc 60  
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 198  
<211> 100  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> sgRNA序列

<400> 198  
augacgagug gaccaggau guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa aaggcuaguc 60  
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 199  
<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA序列

<400> 199

ugagggucuc ggccaccuuc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 200

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA序列

<400> 200

agagaucucc cacacccaaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 201

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾sgRNA

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(4)

<223> 用核苷酸1至4之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> am

<220>

<221> modified\_base

<222> (2)..(2)

<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (3)..(3)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (29)..(29)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (30)..(30)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (31)..(31)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (32)..(32)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (33)..(33)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (34)..(36)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (37)..(37)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (38)..(38)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (39)..(39)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (40)..(40)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (68)..(69)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (71)..(72)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (73)..(73)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (74)..(78)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (79)..(79)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (80)..(80)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (81)..(82)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (83)..(83)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (84)..(84)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (85)..(86)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (87)..(87)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (88)..(88)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (89)..(89)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (90)..(90)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (91)..(91)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (92)..(93)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (94)..(94)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (95)..(95)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (96)..(96)  
<223> cm

<220>

<221> modified\_base

<222> (97)..(100)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (97)..(100)

<223> 用核苷酸97至100之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<400> 201

acacggcagg gucagggguuc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 202

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾sgRNA

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(4)

<223> 用核苷酸1至4之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> am

<220>

<221> modified\_base

<222> (2)..(2)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> cm

<220>

<221> modified\_base

<222> (29)..(29)

<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (30)..(30)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (31)..(31)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (32)..(32)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (33)..(33)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (34)..(36)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (37)..(37)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (38)..(38)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (39)..(39)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (40)..(40)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (68)..(69)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (71)..(72)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (73)..(73)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (74)..(78)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (79)..(79)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (80)..(80)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (81)..(82)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (83)..(83)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (84)..(84)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (85)..(86)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (87)..(87)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (88)..(88)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (89)..(89)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (90)..(90)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (91)..(91)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (92)..(93)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (94)..(94)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (95)..(95)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (96)..(96)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (97)..(100)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (97)..(100)  
<223> 用核苷酸97至100之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<400> 202  
 agcugguaca cggcaggguc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 203  
 <211> 100  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 經修飾sgRNA

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(4)  
 <223> 用核苷酸1至4之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(1)  
 <223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (2)..(2)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (3)..(3)  
 <223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (29)..(29)  
 <223> gm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (30)..(30)  
 <223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (31)..(31)  
 <223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (32)..(32)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (33)..(33)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (34)..(36)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (37)..(37)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (38)..(38)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (39)..(39)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (40)..(40)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (68)..(69)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (71)..(72)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (73)..(73)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (74)..(78)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (79)..(79)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (80)..(80)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (81)..(82)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (83)..(83)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (84)..(84)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (85)..(86)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (87)..(87)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (88)..(88)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (89)..(89)  
<223> gm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (90)..(90)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (91)..(91)  
 <223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (92)..(93)  
 <223> gm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (94)..(94)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (95)..(95)  
 <223> gm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (96)..(96)  
 <223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (97)..(100)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (97)..(100)  
 <223> 用核苷酸97至100之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<400> 203  
 cucucagcug guacacggca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 204  
 <211> 100  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾sgRNA

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(4)

<223> 用核苷酸1至4之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (2)..(2)

<223> cm

<220>

<221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (29)..(29)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (30)..(30)

<223> cm

<220>

<221> modified\_base

<222> (31)..(31)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (32)..(32)

<223> am

<220>

<221> modified\_base

<222> (33)..(33)

<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (34)..(36)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (37)..(37)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (38)..(38)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (39)..(39)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (40)..(40)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (68)..(69)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (71)..(72)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (73)..(73)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (74)..(78)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (79)..(79)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (80)..(80)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (81)..(82)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (83)..(83)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (84)..(84)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (85)..(86)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (87)..(87)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (88)..(88)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (89)..(89)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (90)..(90)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (91)..(91)  
<223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (92)..(93)  
 <223> gm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (94)..(94)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (95)..(95)  
 <223> gm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (96)..(96)  
 <223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (97)..(100)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (97)..(100)  
 <223> 用核苷酸97至100之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<400> 204  
 ucucucagcu gguacacggc guuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 205  
 <211> 100  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 經修飾sgRNA

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(4)  
 <223> 用核苷酸1至4之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (1)..(1)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (2)..(2)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (3)..(3)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (29)..(29)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (30)..(30)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (31)..(31)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (32)..(32)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (33)..(33)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (34)..(36)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (37)..(37)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (38)..(38)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (39)..(39)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (40)..(40)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (68)..(69)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (71)..(72)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (73)..(73)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (74)..(78)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (79)..(79)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (80)..(80)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (81)..(82)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (83)..(83)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (84)..(84)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (85)..(86)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (87)..(87)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (88)..(88)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (89)..(89)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (90)..(90)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (91)..(91)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (92)..(93)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (94)..(94)  
<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (95)..(95)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (96)..(96)

<223> cm

<220>

<221> modified\_base

<222> (97)..(100)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (97)..(100)

<223> 用核苷酸97至100之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<400> 205

uggauuuaga gucucucagc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 206

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾sgRNA

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(4)

<223> 用核苷酸1至4之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (2)..(2)

<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (3)..(3)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (29)..(29)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (30)..(30)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (31)..(31)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (32)..(32)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (33)..(33)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (34)..(36)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (37)..(37)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (38)..(38)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (39)..(39)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (40)..(40)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (68)..(69)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (71)..(72)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (73)..(73)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (74)..(78)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (79)..(79)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (80)..(80)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (81)..(82)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (83)..(83)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (84)..(84)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (85)..(86)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (87)..(87)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (88)..(88)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (89)..(89)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (90)..(90)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (91)..(91)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (92)..(93)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (94)..(94)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (95)..(95)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (96)..(96)  
<223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (97)..(100)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (97)..(100)  
 <223> 用核苷酸97至100之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<400> 206  
 uaggcagaca gacuugucac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 207  
 <211> 100  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 經修飾sgRNA

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(4)  
 <223> 用核苷酸1至4之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(1)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (2)..(2)  
 <223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (3)..(3)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (29)..(29)  
 <223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (30)..(30)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (31)..(31)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (32)..(32)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (33)..(33)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (34)..(36)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (37)..(37)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (38)..(38)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (39)..(39)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (40)..(40)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (68)..(69)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (71)..(72)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (73)..(73)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (74)..(78)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (79)..(79)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (80)..(80)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (81)..(82)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (83)..(83)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (84)..(84)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (85)..(86)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (87)..(87)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (88)..(88)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (89)..(89)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (90)..(90)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (91)..(91)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (92)..(93)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (94)..(94)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (95)..(95)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (96)..(96)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (97)..(100)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (97)..(100)  
<223> 用核苷酸97至100之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<400> 207  
ucugugggac aagaggauca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 208  
<211> 100  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 經修飾sgRNA

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (1)..(4)  
<223> 用核苷酸1至4之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (1)..(1)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (2)..(2)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (3)..(3)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (29)..(29)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (30)..(30)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (31)..(31)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (32)..(32)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (33)..(33)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (34)..(36)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (37)..(37)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (38)..(38)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (39)..(39)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (40)..(40)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (68)..(69)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (71)..(72)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (73)..(73)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (74)..(78)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (79)..(79)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (80)..(80)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (81)..(82)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (83)..(83)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (84)..(84)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (85)..(86)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (87)..(87)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (88)..(88)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (89)..(89)  
<223> gm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (90)..(90)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (91)..(91)  
 <223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (92)..(93)  
 <223> gm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (94)..(94)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (95)..(95)  
 <223> gm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (96)..(96)  
 <223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (97)..(100)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (97)..(100)  
 <223> 用核苷酸97至100之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<400> 208  
 aucuguggga caagaggauc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 209  
 <211> 100  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾sgRNA

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(4)

<223> 用核苷酸1至4之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> cm

<220>

<221> modified\_base

<222> (2)..(2)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (3)..(3)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (29)..(29)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (30)..(30)

<223> cm

<220>

<221> modified\_base

<222> (31)..(31)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (32)..(32)

<223> am

<220>

<221> modified\_base

<222> (33)..(33)

<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (34)..(36)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (37)..(37)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (38)..(38)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (39)..(39)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (40)..(40)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (68)..(69)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (71)..(72)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (73)..(73)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (74)..(78)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (79)..(79)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (80)..(80)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (81)..(82)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (83)..(83)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (84)..(84)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (85)..(86)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (87)..(87)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (88)..(88)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (89)..(89)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (90)..(90)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (91)..(91)  
<223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (92)..(93)  
 <223> gm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (94)..(94)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (95)..(95)  
 <223> gm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (96)..(96)  
 <223> cm

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (97)..(100)  
 <223> um

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (97)..(100)  
 <223> 用核苷酸97至100之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<400> 209  
 cuggauaucu gugggacaag guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 210  
 <211> 100  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 經修飾sgRNA

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(4)  
 <223> 用核苷酸1至4之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (1)..(1)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (2)..(2)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (3)..(3)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (29)..(29)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (30)..(30)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (31)..(31)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (32)..(32)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (33)..(33)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (34)..(36)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (37)..(37)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (38)..(38)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (39)..(39)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (40)..(40)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (68)..(69)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (71)..(72)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (73)..(73)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (74)..(78)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (79)..(79)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (80)..(80)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (81)..(82)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (83)..(83)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (84)..(84)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (85)..(86)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (87)..(87)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (88)..(88)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (89)..(89)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (90)..(90)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (91)..(91)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (92)..(93)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (94)..(94)  
<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (95)..(95)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (96)..(96)

<223> cm

<220>

<221> modified\_base

<222> (97)..(100)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (97)..(100)

<223> 用核苷酸97至100之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<400> 210

gucagggguuc uggauaucug guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 211

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾sgRNA

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(4)

<223> 用核苷酸1至4之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(1)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (2)..(2)

<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (3)..(3)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (29)..(29)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (30)..(30)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (31)..(31)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (32)..(32)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (33)..(33)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (34)..(36)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (37)..(37)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (38)..(38)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (39)..(39)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (40)..(40)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (68)..(69)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (71)..(72)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (73)..(73)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (74)..(78)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (79)..(79)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (80)..(80)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (81)..(82)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (83)..(83)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (84)..(84)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (85)..(86)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (87)..(87)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (88)..(88)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (89)..(89)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (90)..(90)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (91)..(91)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (92)..(93)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (94)..(94)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (95)..(95)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (96)..(96)  
<223> cm

<220>

<221> modified\_base

<222> (97)..(100)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (97)..(100)

<223> 用核苷酸97至100之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<400> 211

ucaggguuucu ggauaucugu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 212

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA序列

<400> 212

uaggcagaca gacuugucac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 213

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 213

agcugguaca cggcagguc 20

<210> 214

<211> 20

<212> RNA

<213> 智人

<400> 214

uaggcagaca gacuugucac 20

<210> 215

<211> 20

<212> RNA  
<213> 智人

<400> 215  
ucugugggac aagaggauca 20

<210> 216  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 216  
aucuguggga caagaggauca 20

<210> 217  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 217  
cuggauaucu gugggacaag 20

<210> 218  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人

<400> 218  
gucagggguuc uggauaucug 20

<210> 250  
<211> 819  
<212> DNA  
<213> 智人

<400> 250  
atggaaacce tgctgaaggt gctgagcggc aactgctgt ggcagctgac atgggtccga 60

tctcagcagc ctgtgcagtc tctcaggcc gtgattctga gagaaggcga ggacgccctg 120

atcaactgca gcagctctaa ggccctgtac agcgtgcact ggtacagaca gaagcacggc 180

gaggcccctg tgttctgat gatcctgctg aaaggcggcg agcagaaggg ccacgagaag 240

atcagcgcca gcttcaacga gaagaagcag cagtccagcc tgtacctgac agccagccag 300

ctgagctaca gcggcaccta cttttgtggc accgcctgga tcaacgacta caagctgtct 360  
 ttccggagccg gcaccacagt gacagtgcgg gccaatattc agaaccccga tcctgccgtg 420  
 taccagctga gagacagcaa gagcagcgac aagagcgtgt gcctgttcac cgacttegac 480  
 agccagacca acgtgtccca gagcaaggac agcgacgtgt acatcaccga taagtgcgtg 540  
 ctggacatgc ggagcatgga cttcaagagc aacagcgccg tggcctggtc caacaagagc 600  
 gatttcgcct gcgccaacgc cttcaacaac agcattatcc ccgaggacac attcttccca 660  
 agtcctgaga gcagctgcga cgtgaagctg gtggaaaaga gcttcgagac agacaccaac 720  
 ctgaacttcc agaacctgag cgtgatcggc ttcagaatcc tgctgctcaa ggtggccggc 780  
 ttcaacctgc tgatgacct gagactgtgg tccagctga 819

<210> 251  
 <211> 272  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 251

Met Glu Thr Leu Leu Lys Val Leu Ser Gly Thr Leu Leu Trp Gln Leu  
 1 5 10 15

Thr Trp Val Arg Ser Gln Gln Pro Val Gln Ser Pro Gln Ala Val Ile  
 20 25 30

Leu Arg Glu Gly Glu Asp Ala Val Ile Asn Cys Ser Ser Ser Lys Ala  
 35 40 45

Leu Tyr Ser Val His Trp Tyr Arg Gln Lys His Gly Glu Ala Pro Val  
 50 55 60

Phe Leu Met Ile Leu Leu Lys Gly Gly Glu Gln Lys Gly His Glu Lys  
 65 70 75 80

Ile Ser Ala Ser Phe Asn Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ser Leu Tyr Leu  
 85 90 95

Thr Ala Ser Gln Leu Ser Tyr Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Gly Thr Ala  
 100 105 110

Trp Ile Asn Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr  
 115 120 125

Val Arg Ala Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg  
 130 135 140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp  
 145 150 155 160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr  
 165 170 175

Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser  
 180 185 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe  
 195 200 205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser  
 210 215 220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn  
 225 230 235 240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu  
 245 250 255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
 260 265 270

<210> 252

<211> 945

<212> DNA

<213> 智人

<400> 252

atgggatctt ggacactgtg ttgcgtgtcc ctgtgcatcc tggaggccaa gcacacagat 60  
 gccggcgtga tccagtctcc tagacacgaa gtgaccgaga tgggccaaga agtgaccctg 120  
 cgctgcaagc ctatcagcgg ccacgattac ctgttctggt acagacagac catgatgaga 180  
 ggccctggaac tgctgatcta cttcaacaac aacgtgccca tcgacgacag cggcatgccc 240  
 gaggatagat tcagcgccaa gatgcccac gccagcttca gcaccctgaa gatccagcct 300  
 agcagagccca gagatagcgc cgtgtacttc tgcgccagca gaaagacagg cggctacagc 360  
 aatcagcccc agcactttgg agatggcacc cggctgagca tcctggaaga tctgaagaac 420  
 gtgttcccac ctgaggtggc cgtgttcgag ctttctgagg ccgagatcag ccacacacag 480  
 aaagccacac tcgtgtgtct ggccaccggc ttctatcccg atcacgtgga actgtcttgg 540  
 tgggtcaacg gcaaagaggt gcacagcggc gtctgtaccg atcctcagcc tctgaaagag 600  
 cagccccctc tgaacgacag cagatactgc ctgagcagca gactgagagt gtccgccacc 660  
 ttctggcaga accccagaaa ccacttcaga tgccaggtgc agttctacgg cctgagcgag 720  
 aacgatgagt ggaccagga tagagccaag cctgtgacac agatcgtgtc tgccgaagcc 780  
 tggggcagag ccgattgtgg ctttaccagc gagagctacc agcagggcgt gctgtctgcc 840  
 acaatcctgt acgagatcct gctgggcaaa gccactctgt acgccgtgct ggtgtctgcc 900  
 ctggtgctga tggccatggt caagcggaag gatagcaggg gctga 945

<210> 253  
 <211> 314  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
  
 <400> 253

Met Gly Ser Trp Thr Leu Cys Cys Val Ser Leu Cys Ile Leu Val Ala  
 1                    5                    10                    15  
  
 Lys His Thr Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr  
                   20                    25                    30  
  
 Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His  
                   35                    40                    45

Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu  
50 55 60

Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu  
85 90 95

Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala  
100 105 110

Ser Arg Lys Thr Gly Gly Tyr Ser Asn Gln Pro Gln His Phe Gly Asp  
115 120 125

Gly Thr Arg Leu Ser Ile Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro  
130 135 140

Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln  
145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val  
165 170 175

Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys  
180 185 190

Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg  
195 200 205

Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn  
210 215 220

Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu  
225 230 235 240

Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val  
 245 250 255

Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser  
 260 265 270

Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu  
 275 280 285

Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met  
 290 295 300

Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
 305 310

<210> 300

<211> 100

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾sgRNA

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(4)

<223> 用核苷酸1至4之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> n係a、c、g或u

<220>

<221> modified\_base

<222> (29)..(29)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (30)..(30)

<223> cm

<220>

<221> modified\_base  
<222> (31)..(31)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (32)..(32)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (33)..(33)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (34)..(36)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (37)..(37)  
<223> um

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (38)..(38)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (39)..(39)  
<223> gm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (40)..(40)  
<223> cm

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (68)..(69)  
<223> am

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (71)..(72)  
<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (73)..(73)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (74)..(78)

<223> am

<220>

<221> modified\_base

<222> (79)..(79)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (80)..(80)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (81)..(82)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (83)..(83)

<223> cm

<220>

<221> modified\_base

<222> (84)..(84)

<223> am

<220>

<221> modified\_base

<222> (85)..(86)

<223> cm

<220>

<221> modified\_base

<222> (87)..(87)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (88)..(88)

<223> am

<220>

<221> modified\_base

<222> (89)..(89)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (90)..(90)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (91)..(91)

<223> cm

<220>

<221> modified\_base

<222> (92)..(93)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (94)..(94)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (95)..(95)

<223> gm

<220>

<221> modified\_base

<222> (96)..(96)

<223> cm

<220>

<221> modified\_base

<222> (97)..(100)

<223> um

<220>

<221> modified\_base

<222> (97)..(100)

<223> 用核苷酸97至100之間的3個磷酸二酯鍵取代硫代磷酸酯(PS)鍵

<400> 300

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 400  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 400  
 guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 401  
 <211> 80  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 401  
 guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 402  
 <211> 76  
 <212> RNA  
 <213> 智人

<400> 402  
 guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugc 76

<210> 500  
 <211> 608  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 500

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

Lys His Thr Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr  
 20 25 30

Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His  
 35 40 45

Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu  
50 55 60

Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu  
85 90 95

Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala  
100 105 110

Ser Arg Lys Thr Gly Gly Tyr Ser Asn Gln Pro Gln His Phe Gly Asp  
115 120 125

Gly Thr Arg Leu Ser Ile Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro  
130 135 140

Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln  
145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val  
165 170 175

Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser  
180 185 190

Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg  
195 200 205

Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn  
210 215 220

Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu  
225 230 235 240

Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val  
245 250 255

Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser  
 260 265 270

Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu  
 275 280 285

Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met  
 290 295 300

Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly Gly Ser Gly Ala Thr Asn  
 305 310 315 320

Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro  
 325 330 335

Met Glu Thr Leu Leu Lys Val Leu Ser Gly Thr Leu Leu Trp Gln Leu  
 340 345 350

Thr Trp Val Arg Ser Gln Gln Pro Val Gln Ser Pro Gln Ala Val Ile  
 355 360 365

Leu Arg Glu Gly Glu Asp Ala Val Ile Asn Cys Ser Ser Ser Lys Ala  
 370 375 380

Leu Tyr Ser Val His Trp Tyr Arg Gln Lys His Gly Glu Ala Pro Val  
 385 390 395 400

Phe Leu Met Ile Leu Leu Lys Gly Gly Glu Gln Lys Gly His Glu Lys  
 405 410 415

Ile Ser Ala Ser Phe Asn Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ser Leu Tyr Leu  
 420 425 430

Thr Ala Ser Gln Leu Ser Tyr Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Gly Thr Ala  
 435 440 445

Trp Ile Asn Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr  
 450 455 460

Val Arg Ala Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg  
 465 470 475 480

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp  
 485 490 495

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr  
 500 505 510

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser  
 515 520 525

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe  
 530 535 540

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser  
 545 550 555 560

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn  
 565 570 575

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu  
 580 585 590

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
 595 600 605

<210> 501

<211> 272

<212> PRT

<213> 智人

<400> 501

Met Glu Thr Leu Leu Lys Val Leu Ser Gly Thr Leu Leu Trp Gln Leu  
 1 5 10 15

Thr Trp Val Arg Ser Gln Gln Pro Val Gln Ser Pro Gln Ala Val Ile  
20 25 30

Leu Arg Glu Gly Glu Asp Ala Val Ile Asn Cys Ser Ser Ser Lys Ala  
35 40 45

Leu Tyr Ser Val His Trp Tyr Arg Gln Lys His Gly Glu Ala Pro Val  
50 55 60

Phe Leu Met Ile Leu Leu Lys Gly Gly Glu Gln Lys Gly His Glu Lys  
65 70 75 80

Ile Ser Ala Ser Phe Asn Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ser Leu Tyr Leu  
85 90 95

Thr Ala Ser Gln Leu Ser Tyr Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Gly Thr Ala  
100 105 110

Trp Ile Asn Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr  
115 120 125

Val Arg Ala Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg  
130 135 140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp  
145 150 155 160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr  
165 170 175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser  
180 185 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe  
195 200 205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser

210

215

220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn  
 225 230 235 240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu  
 245 250 255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
 260 265 270

&lt;210&gt; 502

&lt;211&gt; 314

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 502

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

Lys His Thr Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr  
 20 25 30

Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His  
 35 40 45

Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu  
 50 55 60

Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu  
 85 90 95

Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala  
 100 105 110

Ser Arg Lys Thr Gly Gly Tyr Ser Asn Gln Pro Gln His Phe Gly Asp  
 115 120 125

Gly Thr Arg Leu Ser Ile Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro  
 130 135 140

Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln  
 145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val  
 165 170 175

Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser  
 180 185 190

Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg  
 195 200 205

Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn  
 210 215 220

Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu  
 225 230 235 240

Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val  
 245 250 255

Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser  
 260 265 270

Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu  
 275 280 285

Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met  
 290 295 300

Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
 305 310

<210> 503  
 <211> 608  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 503

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

Lys His Thr Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr  
 20 25 30

Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His  
 35 40 45

Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu  
 50 55 60

Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu  
 85 90 95

Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala  
 100 105 110

Ser Arg Lys Thr Gly Gly Tyr Ser Asn Gln Pro Gln His Phe Gly Asp  
 115 120 125

Gly Thr Arg Leu Ser Ile Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro  
 130 135 140

Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln  
 145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val

165

170

175

Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser  
180 185 190

Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg  
195 200 205

Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn  
210 215 220

Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu  
225 230 235 240

Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val  
245 250 255

Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser  
260 265 270

Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu  
275 280 285

Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met  
290 295 300

Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly Gly Ser Gly Ala Thr Asn  
305 310 315 320

Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro  
325 330 335

Met Glu Thr Leu Leu Lys Val Leu Ser Gly Thr Leu Leu Trp Gln Leu  
340 345 350

Thr Trp Val Arg Ser Gln Gln Pro Val Gln Ser Pro Gln Ala Val Ile  
355 360 365

Leu Arg Glu Gly Glu Asp Ala Val Ile Asn Cys Ser Ser Ser Lys Ala  
370 375 380

Leu Tyr Ser Val His Trp Tyr Arg Gln Lys His Gly Glu Ala Pro Val  
385 390 395 400

Phe Leu Met Ile Leu Leu Lys Gly Gly Glu Gln Lys Gly His Glu Lys  
405 410 415

Ile Ser Ala Ser Phe Asn Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ser Leu Tyr Leu  
420 425 430

Thr Ala Ser Gln Leu Ser Tyr Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Gly Thr Ala  
435 440 445

Trp Ile Asn Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr  
450 455 460

Val Arg Ala Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg  
465 470 475 480

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp  
485 490 495

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr  
500 505 510

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser  
515 520 525

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe  
530 535 540

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser  
545 550 555 560

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn

565

570

575

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu  
 580 585 590

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
 595 600 605

&lt;210&gt; 504

&lt;211&gt; 272

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 504

Met Glu Thr Leu Leu Lys Val Leu Ser Gly Thr Leu Leu Trp Gln Leu  
 1 5 10 15

Thr Trp Val Arg Ser Gln Gln Pro Val Gln Ser Pro Gln Ala Val Ile  
 20 25 30

Leu Arg Glu Gly Glu Asp Ala Val Ile Asn Cys Ser Ser Ser Lys Ala  
 35 40 45

Leu Tyr Ser Val His Trp Tyr Arg Gln Lys His Gly Glu Ala Pro Val  
 50 55 60

Phe Leu Met Ile Leu Leu Lys Gly Gly Glu Gln Lys Gly His Glu Lys  
 65 70 75 80

Ile Ser Ala Ser Phe Asn Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ser Leu Tyr Leu  
 85 90 95

Thr Ala Ser Gln Leu Ser Tyr Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Gly Thr Ala  
 100 105 110

Trp Ile Asn Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr  
 115 120 125

Val Arg Ala Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg  
 130 135 140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp  
 145 150 155 160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr  
 165 170 175

Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser  
 180 185 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe  
 195 200 205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser  
 210 215 220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn  
 225 230 235 240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu  
 245 250 255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
 260 265 270

<210> 505

<211> 314

<212> PRT

<213> 智人

<400> 505

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

Lys His Thr Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr  
 20 25 30

Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His  
35 40 45

Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu  
50 55 60

Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu  
85 90 95

Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala  
100 105 110

Ser Arg Lys Thr Gly Gly Tyr Ser Asn Gln Pro Gln His Phe Gly Asp  
115 120 125

Gly Thr Arg Leu Ser Ile Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro  
130 135 140

Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln  
145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val  
165 170 175

Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser  
180 185 190

Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg  
195 200 205

Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn  
210 215 220

Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu

225 230 235 240

Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val  
245 250 255

Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser  
260 265 270

Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu  
275 280 285

Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met  
290 295 300

Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
305 310

<210> 506

<211> 602

<212> PRT

<213> 智人

<400> 506

Met Ser Asn Gln Val Leu Cys Cys Val Val Leu Cys Phe Leu Gly Ala  
1 5 10 15

Asn Thr Val Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg  
20 25 30

Lys Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His  
35 40 45

Asp Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu  
50 55 60

Ile Tyr Tyr Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala  
65 70 75 80

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr  
85 90 95

Val Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser  
100 105 110

Ser Pro Gly Ala Leu Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu  
115 120 125

Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
130 135 140

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
165 170 175

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln  
180 185 190

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
195 200 205

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
210 215 220

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
225 230 235 240

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly  
260 265 270

Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr  
275 280 285

Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys  
290 295 300

Arg Lys Asp Ser Arg Gly Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu  
305 310 315 320

Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Thr Ser Ile  
325 330 335

Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp Leu Val Asn Gly  
340 345 350

Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val Gln Glu Gly Asp  
355 360 365

Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala Ser Asn Tyr Phe  
370 375 380

Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln Leu Ile Ile Asp  
385 390 395 400

Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg Ile Ala Val Thr  
405 410 415

Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile Thr Glu Thr Gln  
420 425 430

Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Thr Glu Asp Leu Thr  
435 440 445

Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys Pro Asp Ile Gln  
450 455 460

Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp  
465 470 475 480

Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser  
 485 490 495

Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp  
 500 505 510

Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn  
 515 520 525

Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro  
 530 535 540

Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu  
 545 550 555 560

Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu  
 565 570 575

Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn  
 580 585 590

Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
 595 600

<210> 507

<211> 270

<212> PRT

<213> 智人

<400> 507

Met Thr Ser Ile Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp  
 1 5 10 15

Leu Val Asn Gly Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val  
 20 25 30

Gln Glu Gly Asp Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala  
 35 40 45

Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln  
50 55 60

Leu Ile Ile Asp Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg  
65 70 75 80

Ile Ala Val Thr Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile  
85 90 95

Thr Glu Thr Gln Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Thr  
100 105 110

Glu Asp Leu Thr Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys  
115 120 125

Pro Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser  
130 135 140

Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln  
145 150 155 160

Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys  
165 170 175

Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val  
180 185 190

Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn  
195 200 205

Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys  
210 215 220

Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn  
225 230 235 240

Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val

245

250

255

Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
 260 265 270

&lt;210&gt; 508

&lt;211&gt; 310

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 508

Met Ser Asn Gln Val Leu Cys Cys Val Val Leu Cys Phe Leu Gly Ala  
 1 5 10 15

Asn Thr Val Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg  
 20 25 30

Lys Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His  
 35 40 45

Asp Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu  
 50 55 60

Ile Tyr Tyr Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala  
 65 70 75 80

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr  
 85 90 95

Val Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser  
 100 105 110

Ser Pro Gly Ala Leu Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu  
 115 120 125

Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
 130 135 140

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
165 170 175

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln  
180 185 190

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
195 200 205

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
210 215 220

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
225 230 235 240

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly  
260 265 270

Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr  
275 280 285

Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys  
290 295 300

Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
305 310

<210> 509

<211> 612

<212> PRT

<213> 智人

<400> 509

Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala  
1 5 10 15

Gly Glu Leu Val Pro Met Glu Thr Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg His  
20 25 30

Leu Val Met Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His  
35 40 45

Leu Gly His Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys Lys Pro  
50 55 60

Leu Glu Leu Met Phe Val Tyr Ser Leu Glu Glu Arg Val Glu Asn Asn  
65 70 75 80

Ser Val Pro Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser His Leu  
85 90 95

Phe Leu His Leu His Thr Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu  
100 105 110

Cys Ala Ser Ser Gln Asp Tyr Leu Val Ser Asn Glu Lys Leu Phe Phe  
115 120 125

Gly Ser Gly Thr Gln Leu Ser Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe  
130 135 140

Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His  
145 150 155 160

Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp  
165 170 175

His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly  
180 185 190

Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp

195

200

205

Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp  
 210 215 220

Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu  
 225 230 235 240

Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln  
 245 250 255

Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser  
 260 265 270

Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile  
 275 280 285

Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val  
 290 295 300

Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly Gly Ser Gly Ala  
 305 310 315 320

Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro  
 325 330 335

Gly Pro Met Ile Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln  
 340 345 350

Leu Ser Trp Val Trp Ser Gln Arg Lys Glu Val Glu Gln Asp Pro Gly  
 355 360 365

Pro Phe Asn Val Pro Glu Gly Ala Thr Val Ala Phe Asn Cys Thr Tyr  
 370 375 380

Ser Asn Ser Ala Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Cys Arg  
 385 390 395 400

Lys Glu Pro Lys Leu Leu Met Ser Val Tyr Ser Ser Gly Asn Glu Asp  
405 410 415

Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Leu  
420 425 430

Leu Ile Arg Asp Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Val  
435 440 445

Val Asn Leu Leu Ser Asn Gln Gly Gly Lys Leu Ile Phe Gly Gln Gly  
450 455 460

Thr Glu Leu Ser Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val  
465 470 475 480

Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe  
485 490 495

Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp  
500 505 510

Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe  
515 520 525

Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys  
530 535 540

Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro  
545 550 555 560

Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu  
565 570 575

Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg  
580 585 590

Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg

595

600

605

Leu Trp Ser Ser  
610

&lt;210&gt; 510

&lt;211&gt; 274

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 510

Met Ile Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser  
1 5 10 15

Trp Val Trp Ser Gln Arg Lys Glu Val Glu Gln Asp Pro Gly Pro Phe  
20 25 30

Asn Val Pro Glu Gly Ala Thr Val Ala Phe Asn Cys Thr Tyr Ser Asn  
35 40 45

Ser Ala Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Cys Arg Lys Glu  
50 55 60

Pro Lys Leu Leu Met Ser Val Tyr Ser Ser Gly Asn Glu Asp Gly Arg  
65 70 75 80

Phe Thr Ala Gln Leu Asn Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Leu Leu Ile  
85 90 95

Arg Asp Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Val Val Asn  
100 105 110

Leu Leu Ser Asn Gln Gly Gly Lys Leu Ile Phe Gly Gln Gly Thr Glu  
115 120 125

Leu Ser Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln  
130 135 140

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp  
 145 150 155 160

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr  
 165 170 175

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser  
 180 185 190

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn  
 195 200 205

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro  
 210 215 220

Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp  
 225 230 235 240

Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu  
 245 250 255

Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp  
 260 265 270

Ser Ser

<210> 511

<211> 316

<212> PRT

<213> 智人

<400> 511

Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala  
 1 5 10 15

Gly Glu Leu Val Pro Met Glu Thr Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg His  
 20 25 30

Leu Val Met Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His  
 35 40 45

Leu Gly His Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys Lys Pro  
 50 55 60

Leu Glu Leu Met Phe Val Tyr Ser Leu Glu Glu Arg Val Glu Asn Asn  
 65 70 75 80

Ser Val Pro Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser His Leu  
 85 90 95

Phe Leu His Leu His Thr Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu  
 100 105 110

Cys Ala Ser Ser Gln Asp Tyr Leu Val Ser Asn Glu Lys Leu Phe Phe  
 115 120 125

Gly Ser Gly Thr Gln Leu Ser Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe  
 130 135 140

Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His  
 145 150 155 160

Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp  
 165 170 175

His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly  
 180 185 190

Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp  
 195 200 205

Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp  
 210 215 220

Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu

225                      230                      235                      240

Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln  
                                  245                                   250                                   255

Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser  
                                  260                                   265                                   270

Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile  
                                  275                                   280                                   285

Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val  
                                  290                                   295                                   300

Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
 305                                   310                                   315

<210> 512

<211> 612

<212> PRT

<213> 智人

<400> 512

Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala  
 1                                   5                                   10                                   15

Gly Glu Leu Val Pro Met Glu Thr Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg His  
                                  20                                   25                                   30

Leu Val Met Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His  
                                  35                                   40                                   45

Leu Gly His Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys Lys Pro  
                                  50                                   55                                   60

Leu Glu Leu Met Phe Val Tyr Ser Leu Glu Glu Arg Val Glu Asn Asn  
 65                                   70                                   75                                   80

Ser Val Pro Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser His Leu  
85 90 95

Phe Leu His Leu His Thr Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu  
100 105 110

Cys Ala Ser Ser Gln Asp Tyr Leu Val Ser Asn Glu Lys Leu Phe Phe  
115 120 125

Gly Ser Gly Thr Gln Leu Ser Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe  
130 135 140

Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His  
145 150 155 160

Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp  
165 170 175

His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly  
180 185 190

Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp  
195 200 205

Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp  
210 215 220

Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu  
225 230 235 240

Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln  
245 250 255

Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser  
260 265 270

Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile  
275 280 285

Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val  
 290 295 300

Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly Gly Ser Gly Ala  
 305 310 315 320

Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro  
 325 330 335

Gly Pro Met Ile Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln  
 340 345 350

Leu Ser Trp Val Trp Ser Gln Arg Lys Glu Val Glu Gln Asp Pro Gly  
 355 360 365

Pro Phe Asn Val Pro Glu Gly Ala Thr Val Ala Phe Asn Cys Thr Tyr  
 370 375 380

Ser Asn Ser Ala Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Cys Arg  
 385 390 395 400

Lys Glu Pro Lys Leu Leu Met Ser Val Tyr Ser Ser Gly Asn Glu Asp  
 405 410 415

Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Leu  
 420 425 430

Leu Ile Arg Asp Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Val  
 435 440 445

Val Asn Leu Leu Ser Asn Gln Gly Gly Lys Leu Ile Phe Gly Gln Gly  
 450 455 460

Thr Glu Leu Ser Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val  
 465 470 475 480

Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe  
 485 490 495

Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp  
 500 505 510

Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe  
 515 520 525

Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys  
 530 535 540

Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro  
 545 550 555 560

Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu  
 565 570 575

Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg  
 580 585 590

Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg  
 595 600 605

Leu Trp Ser Ser  
 610

<210> 513

<211> 274

<212> PRT

<213> 智人

<400> 513

Met Ile Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser  
 1 5 10 15

Trp Val Trp Ser Gln Arg Lys Glu Val Glu Gln Asp Pro Gly Pro Phe  
 20 25 30

Asn Val Pro Glu Gly Ala Thr Val Ala Phe Asn Cys Thr Tyr Ser Asn  
35 40 45

Ser Ala Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Cys Arg Lys Glu  
50 55 60

Pro Lys Leu Leu Met Ser Val Tyr Ser Ser Gly Asn Glu Asp Gly Arg  
65 70 75 80

Phe Thr Ala Gln Leu Asn Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Leu Leu Ile  
85 90 95

Arg Asp Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Val Val Asn  
100 105 110

Leu Leu Ser Asn Gln Gly Gly Lys Leu Ile Phe Gly Gln Gly Thr Glu  
115 120 125

Leu Ser Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln  
130 135 140

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp  
145 150 155 160

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr  
165 170 175

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser  
180 185 190

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn  
195 200 205

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro  
210 215 220

Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp

225                      230                      235                      240

Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu  
245                                      250                                      255

Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp  
260                                      265                                      270

Ser Ser

<210> 514

<211> 316

<212> PRT

<213> 智人

<400> 514

Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala  
1                                      5                                      10                                      15

Gly Glu Leu Val Pro Met Glu Thr Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg His  
20                                      25                                      30

Leu Val Met Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His  
35                                      40                                      45

Leu Gly His Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys Lys Pro  
50                                      55                                      60

Leu Glu Leu Met Phe Val Tyr Ser Leu Glu Glu Arg Val Glu Asn Asn  
65                                      70                                      75                                      80

Ser Val Pro Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser His Leu  
85                                      90                                      95

Phe Leu His Leu His Thr Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu  
100                                      105                                      110

Cys Ala Ser Ser Gln Asp Tyr Leu Val Ser Asn Glu Lys Leu Phe Phe  
 115 120 125

Gly Ser Gly Thr Gln Leu Ser Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe  
 130 135 140

Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His  
 145 150 155 160

Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp  
 165 170 175

His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly  
 180 185 190

Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp  
 195 200 205

Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp  
 210 215 220

Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu  
 225 230 235 240

Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln  
 245 250 255

Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser  
 260 265 270

Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile  
 275 280 285

Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val  
 290 295 300

Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
 305 310 315

<210> 515  
 <211> 614  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 515

Met Leu Ser Pro Asp Leu Pro Asp Ser Ala Trp Asn Thr Arg Leu Leu  
 1 5 10 15

Cys His Val Met Leu Cys Leu Leu Gly Ala Val Ser Val Ala Ala Gly  
 20 25 30

Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg Glu Thr Ala  
 35 40 45

Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val Tyr Trp Tyr  
 50 55 60

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser Phe Tyr Glu  
 65 70 75 80

Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Gln  
 85 90 95

Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser Leu Glu Leu  
 100 105 110

Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Arg Gly Gly Leu  
 115 120 125

Glu Lys Leu Phe Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Ser Val Leu Glu Asp  
 130 135 140

Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu  
 145 150 155 160

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

165

170

175

Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys  
 180 185 190

Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln  
 195 200 205

Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val  
 210 215 220

Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val  
 225 230 235 240

Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala  
 245 250 255

Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp  
 260 265 270

Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr  
 275 280 285

Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu  
 290 295 300

Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe Gly  
 305 310 315 320

Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu  
 325 330 335

Glu Asn Pro Gly Pro Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr  
 340 345 350

Ala Ser Leu Trp Leu Gly Pro Gly Ile Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr  
 355 360 365

Gln Pro Gly Met Phe Val Gln Glu Lys Glu Ala Val Thr Leu Asp Cys  
 370 375 380

Thr Tyr Asp Thr Ser Asp Pro Ser Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln  
 385 390 395 400

Pro Ser Ser Gly Glu Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp  
 405 410 415

Gln Gln Asn Ala Thr Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala  
 420 425 430

Arg Lys Ser Ala Asn Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser  
 435 440 445

Ala Met Tyr Phe Cys Ala Ile Ser Gly Asn Thr Pro Leu Val Phe Gly  
 450 455 460

Lys Gly Thr Arg Leu Ser Val Ile Ala Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro  
 465 470 475 480

Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys  
 485 490 495

Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp  
 500 505 510

Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met  
 515 520 525

Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe  
 530 535 540

Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe  
 545 550 555 560

Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser

565

570

575

Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly  
 580 585 590

Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr  
 595 600 605

Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
 610

&lt;210&gt; 516

&lt;211&gt; 273

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 516

Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu  
 1 5 10 15

Gly Pro Gly Ile Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe  
 20 25 30

Val Gln Glu Lys Glu Ala Val Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser  
 35 40 45

Asp Pro Ser Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu  
 50 55 60

Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Gln Gln Asn Ala Thr  
 65 70 75 80

Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn  
 85 90 95

Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys  
 100 105 110

Ala Ile Ser Gly Asn Thr Pro Leu Val Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu  
 115 120 125

Ser Val Ile Ala Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu  
 130 135 140

Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe  
 145 150 155 160

Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile  
 165 170 175

Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn  
 180 185 190

Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala  
 195 200 205

Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu  
 210 215 220

Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr  
 225 230 235 240

Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu  
 245 250 255

Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser  
 260 265 270

Ser

<210> 517

<211> 319

<212> PRT

<213> 智人

<400> 517

Met Leu Ser Pro Asp Leu Pro Asp Ser Ala Trp Asn Thr Arg Leu Leu  
1 5 10 15

Cys His Val Met Leu Cys Leu Leu Gly Ala Val Ser Val Ala Ala Gly  
20 25 30

Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg Glu Thr Ala  
35 40 45

Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val Tyr Trp Tyr  
50 55 60

Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser Phe Tyr Glu  
65 70 75 80

Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Gln  
85 90 95

Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser Leu Glu Leu  
100 105 110

Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Arg Gly Gly Leu  
115 120 125

Glu Lys Leu Phe Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Ser Val Leu Glu Asp  
130 135 140

Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu  
145 150 155 160

Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr  
165 170 175

Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys  
180 185 190

Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln

195

200

205

Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val  
 210 215 220

Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val  
 225 230 235 240

Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala  
 245 250 255

Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp  
 260 265 270

Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr  
 275 280 285

Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu  
 290 295 300

Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe  
 305 310 315

&lt;210&gt; 518

&lt;211&gt; 609

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 518

Met Gly Thr Arg Leu Leu Cys Trp Ala Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Thr Glu Ala Gly Val Ala Gln Ser Pro Arg Tyr Lys Ile Ile  
 20 25 30

Glu Lys Arg Gln Ser Val Ala Phe Trp Cys Asn Pro Ile Ser Gly His  
 35 40 45

Ala Thr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Ile Leu Gly Gln Gly Pro Lys Leu  
50 55 60

Leu Ile Gln Phe Gln Asn Asn Gly Val Val Asp Asp Ser Gln Leu Pro  
65 70 75 80

Lys Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Leu Lys Gly Val Asp Ser Thr Leu  
85 90 95

Lys Ile Gln Pro Ala Lys Leu Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala  
100 105 110

Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu  
115 120 125

Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
130 135 140

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
165 170 175

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln  
180 185 190

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
195 200 205

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
210 215 220

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
225 230 235 240

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly  
 260 265 270

Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr  
 275 280 285

Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys  
 290 295 300

Arg Lys Asp Ser Arg Gly Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu  
 305 310 315 320

Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Met Leu  
 325 330 335

Leu Gly Ala Ser Val Leu Ile Leu Trp Leu Gln Pro Asp Trp Val Asn  
 340 345 350

Ser Gln Gln Lys Asn Asp Asp Gln Gln Val Lys Gln Asn Ser Pro Ser  
 355 360 365

Leu Ser Val Gln Glu Gly Arg Ile Ser Ile Leu Asn Cys Asp Tyr Thr  
 370 375 380

Asn Ser Met Phe Asp Tyr Phe Leu Trp Tyr Lys Lys Tyr Pro Ala Glu  
 385 390 395 400

Gly Pro Thr Phe Leu Ile Ser Ile Ser Ser Ile Lys Asp Lys Asn Glu  
 405 410 415

Asp Gly Arg Phe Thr Val Phe Leu Asn Lys Ser Ala Lys His Leu Ser  
 420 425 430

Leu His Ile Val Pro Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 435 440 445

Ala Ala Arg Gly Gln Gly Asn Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu  
450 455 460

Ser Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu  
465 470 475 480

Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe  
485 490 495

Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile  
500 505 510

Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn  
515 520 525

Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala  
530 535 540

Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu  
545 550 555 560

Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr  
565 570 575

Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu  
580 585 590

Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser  
595 600 605

Ser

<210> 519

<211> 277

<212> PRT

<213> 智人

<400> 519

Met Ala Met Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Ile Leu Trp Leu Gln Pro  
1 5 10 15

Asp Trp Val Asn Ser Gln Gln Lys Asn Asp Asp Gln Gln Val Lys Gln  
20 25 30

Asn Ser Pro Ser Leu Ser Val Gln Glu Gly Arg Ile Ser Ile Leu Asn  
35 40 45

Cys Asp Tyr Thr Asn Ser Met Phe Asp Tyr Phe Leu Trp Tyr Lys Lys  
50 55 60

Tyr Pro Ala Glu Gly Pro Thr Phe Leu Ile Ser Ile Ser Ser Ile Lys  
65 70 75 80

Asp Lys Asn Glu Asp Gly Arg Phe Thr Val Phe Leu Asn Lys Ser Ala  
85 90 95

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

Val Tyr Phe Cys Ala Ala Arg Gly Gln Gly Asn Leu Ile Phe Gly Lys  
115 120 125

Gly Thr Lys Leu Ser Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala  
130 135 140

Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu  
145 150 155 160

Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp  
180 185 190

Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala

195

200

205

Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe  
 210 215 220

Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe  
 225 230 235 240

Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe  
 245 250 255

Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu  
 260 265 270

Arg Leu Trp Ser Ser  
 275

&lt;210&gt; 520

&lt;211&gt; 310

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 520

Met Gly Thr Arg Leu Leu Cys Trp Ala Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Thr Glu Ala Gly Val Ala Gln Ser Pro Arg Tyr Lys Ile Ile  
 20 25 30

Glu Lys Arg Gln Ser Val Ala Phe Trp Cys Asn Pro Ile Ser Gly His  
 35 40 45

Ala Thr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Ile Leu Gly Gln Gly Pro Lys Leu  
 50 55 60

Leu Ile Gln Phe Gln Asn Asn Gly Val Val Asp Asp Ser Gln Leu Pro  
 65 70 75 80

Lys Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Leu Lys Gly Val Asp Ser Thr Leu  
85 90 95

Lys Ile Gln Pro Ala Lys Leu Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala  
100 105 110

Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu  
115 120 125

Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
130 135 140

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
165 170 175

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln  
180 185 190

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
195 200 205

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
210 215 220

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
225 230 235 240

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly  
260 265 270

Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr  
275 280 285

Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys  
 290 295 300

Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
 305 310

<210> 521  
 <211> 641  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 521

Met Ser Leu Gly Leu Leu Cys Cys Gly Ala Phe Ser Leu Leu Trp Ala  
 1 5 10 15

Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Arg Val Leu  
 20 25 30

Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Leu Cys Ala Gln Asp Met Asn His  
 35 40 45

Glu Tyr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu  
 50 55 60

Ile His Tyr Ser Val Gly Glu Gly Thr Thr Ala Lys Gly Glu Val Pro  
 65 70 75 80

Asp Gly Tyr Asn Val Ser Arg Leu Lys Lys Gln Asn Phe Leu Leu Gly  
 85 90 95

Leu Glu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser  
 100 105 110

Arg Gly Tyr His Arg Leu Asn Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr  
 115 120 125

Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val

130

135

140

Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala  
145 150 155 160

Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu  
165 170 175

Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp  
180 185 190

Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys  
195 200 205

Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg  
210 215 220

Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp  
225 230 235 240

Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala  
245 250 255

Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln  
260 265 270

Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys  
275 280 285

Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met  
290 295 300

Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser  
305 310 315 320

Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ile  
325 330 335

Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser Trp Val  
 340 345 350

Trp Ser Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly  
 355 360 365

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe  
 370 375 380

Glu Lys Gln Arg Lys Glu Val Glu Gln Asp Pro Gly Pro Phe Asn Val  
 385 390 395 400

Pro Glu Gly Ala Thr Val Ala Phe Asn Cys Thr Tyr Ser Asn Ser Ala  
 405 410 415

Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Cys Arg Lys Glu Pro Lys  
 420 425 430

Leu Leu Met Ser Val Tyr Ser Ser Gly Asn Glu Asp Gly Arg Phe Thr  
 435 440 445

Ala Gln Leu Asn Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Leu Leu Ile Arg Asp  
 450 455 460

Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Val Val Lys Pro Asp  
 465 470 475 480

Pro Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu  
 485 490 495

Ser Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu  
 500 505 510

Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe  
 515 520 525

Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile

530

535

540

Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn  
545 550 555 560

Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala  
565 570 575

Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu  
580 585 590

Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr  
595 600 605

Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu  
610 615 620

Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser  
625 630 635 640

Ser

&lt;210&gt; 522

&lt;211&gt; 307

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 522

Met Ile Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser  
1 5 10 15

Trp Val Trp Ser Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro  
35 40 45

Gln Phe Glu Lys Gln Arg Lys Glu Val Glu Gln Asp Pro Gly Pro Phe  
 50 55 60

Asn Val Pro Glu Gly Ala Thr Val Ala Phe Asn Cys Thr Tyr Ser Asn  
 65 70 75 80

Ser Ala Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Cys Arg Lys Glu  
 85 90 95

Pro Lys Leu Leu Met Ser Val Tyr Ser Ser Gly Asn Glu Asp Gly Arg  
 100 105 110

Phe Thr Ala Gln Leu Asn Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Leu Leu Ile  
 115 120 125

Arg Asp Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Val Val Lys  
 130 135 140

Pro Asp Pro Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr  
 145 150 155 160

Lys Leu Ser Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr  
 165 170 175

Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr  
 180 185 190

Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val  
 195 200 205

Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys  
 210 215 220

Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala  
 225 230 235 240

Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser  
 245 250 255

Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr  
 260 265 270

Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile  
 275 280 285

Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu  
 290 295 300

Trp Ser Ser  
 305

<210> 523

<211> 312

<212> PRT

<213> 智人

<400> 523

Met Ser Leu Gly Leu Leu Cys Cys Gly Ala Phe Ser Leu Leu Trp Ala  
 1 5 10 15

Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Arg Val Leu  
 20 25 30

Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Leu Cys Ala Gln Asp Met Asn His  
 35 40 45

Glu Tyr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu  
 50 55 60

Ile His Tyr Ser Val Gly Glu Gly Thr Thr Ala Lys Gly Glu Val Pro  
 65 70 75 80

Asp Gly Tyr Asn Val Ser Arg Leu Lys Lys Gln Asn Phe Leu Leu Gly  
 85 90 95

Leu Glu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser

100	105	110
Arg Gly Tyr His Arg Leu Asn Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr		
115	120	125
Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val		
130	135	140
Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala		
145	150	155
Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu		
	165	170
Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp		
	180	185
Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys		
	195	200
Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg		
	210	215
Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp		
	225	230
Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala		
	245	250
Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln		
	260	265
Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys		
	275	280
Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met		
	290	295
		300

Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
305 310

<210> 600  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> SV40

<400> 600

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
1 5

<210> 601  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> SV40

<400> 601

Pro Lys Lys Lys Arg Arg Val  
1 5

<210> 602  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 有爪蟾蜍

<400> 602

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

<210> 603  
<211> 1183  
<212> DNA  
<213> 智人

<400> 603

ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg 60

ggaggggtcg gcaattgaac cgggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt 120

gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc gaggggtgggg gagaaccgta tataagtgca 180

gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc 240  
 gtgtgtgggt cccgcggggc tggcctcttt acgggttatg gcccttgcgt gccttgaatt 300  
 acttccacgc ccctggctgc agtacgtgat tcttgatccc gagcttcggg ttggaagtgg 360  
 gtgggagagt tcgaggcctt gcgcttaagg agccccctcg cctcgtgctt gagttgaggc 420  
 ctggcttggg cgctggggcc gccgcgtgcg aatctgggtg caccttcgcg cctgtctcgc 480  
 tgctttcgat aagtctctag ccatttaaaa tttttgatga cctgctgcga cgcttttttt 540  
 ctggcaagat agtcttgtaa atgcgggcca agatgtgcac actggtattht cggttttttg 600  
 ggccgcgggc ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgcaca tgttcggcga ggcggggcct 660  
 gcgagcgcgg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa gctggccggc ctgctctggt 720  
 gcctggcctc gcgcccctgt gtatcgcccc gccctgggcg gcaaggctgg cccggtcggc 780  
 accagttgcg tgagcggaaa gatggccgct tcccggccct gctgcaggga gctcaaatg 840  
 gaggacgcgg cgctcgggag agcgggcggg tgagtcaccc acacaaagga aaaggcctt 900  
 tccgtectca gccgtcgtt catgtgactc cacggagtac cgggcgcccgt ccaggcacct 960  
 cgattagttc tcgagctttt ggagtacgtc gtcttttaggt tggggggagg ggttttatgc 1020  
 gatggagttt ccccacactg agtgggtgga gactgaagtt aggccagctt ggcacttgat 1080  
 gtaattctcc ttggaatttg ccttttttga gtttggatct tggttcattc tcaagcctca 1140  
 gacagtgggt caaagttttt ttcttccatt tcaggtgtcg tga 1183

<210> 604  
 <211> 238  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 604  
 cgtgaggctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gcccacagtc cccgagaagt 60  
 tggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaaactggg 120  
 aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggg tgggggagaa ccgtatataa 180  
 gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggt 238

<210> 605  
 <211> 457  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 605

aacagagaaa caggagaata tgggccaac aggatatctg tggttaagcag ttcttgcccc 60  
 ggctcagggc caagaacagt tggaacagca gaatatgggc caaacaggat atctgtggta 120  
 agcagttcct gccccggctc agggccaaga acagatggtc cccagatgcg gtccccccct 180  
 cagcagtttc tagagaacca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct gaaatgacct 240  
 tgtgccttat ttgaactaac caatcagttc gcttctcgtc tctgttcgcg cgcttctgct 300  
 ccccagctc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcgctt ggagacgcca 360  
 tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca ccgactctag aggatcgatc ccccgggctg 420  
 caggaattca agcagagaaga caagggcaga aagcacc 457

<210> 606  
 <211> 426  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 606

gatccgaaca gagagacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt aagcagttcc 60  
 tgccccggct caggccaag aacagttgga acagcagaat atgggcaaaa caggatatct 120  
 gtggtaagca gttcctgccc cggctcaggg ccaagaacag atgggtcccca gatgcggctc 180  
 cgccctcagc agtttctaga gaaccatcag atgtttccag ggtgccccaa ggacctgaaa 240  
 tgacctgtg ccttatttga actaaccaat cagttcgtt ctcgcttctg ttcgcgcgct 300  
 tctgctcccc gagctctata taagcagagc tcgttttagtg aaccgtcaga tcgcctggag 360  
 acgcatcca cgctgttttg acctccatag aagacaccga ctctagagga tccaccggtc 420  
 gccacc 426

<210> 607  
 <211> 500  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 607  
 gggtagggga ggcgcttttc ccaaggcagt ctggagcatg cgcttttagca gccccgctgg 60  
 gcacttggcg ctacacaagt ggctcttggc ctgcacaca ttccacatcc accggtaggc 120  
 gccaacggc tccgtttttt ggtggcccct tcgcgccacc ttctactcct cccctagtca 180  
 ggaagtccc ccccgccccg cagctcgcgt cgtgcaggac gtgacaaatg gaagtagcac 240  
 gtctcactag tctcgtgcag atggacagca ccgctgagca atggaagcgg gtaggccttt 300  
 ggggcagcgg ccaatagcag ctttgctcct tcgctttctg ggctcagagg ctgggaaggg 360  
 gtgggtccgg gggcgggctc aggggcgggc tcaggggcgg ggcgggcgcc cgaaggtcct 420  
 ccggaggccc ggcattctgc acgcttcaaa agcgcacgtc tgccgcgctg ttctccttt 480  
 cctcatctcc gggcctttcg 500

<210> 608  
 <211> 54  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 608  
 gagggccgcg gcagcctgct gacctgcggc gacgtggagg agaatcccgg cccc 54

<210> 609  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 衍生自豬捷申病毒-1之自裂解肽

<400> 609  
 Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val  
 1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro  
 20

<210> 610  
 <211> 478

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 增強之綠色螢光蛋白

&lt;400&gt; 610

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu  
 1                   5                   10                   15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly  
                   20                   25                   30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile  
                   35                   40                   45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr  
           50                   55                   60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys  
 65                   70                   75                   80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu  
                   85                   90                   95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu  
                   100                   105                   110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly  
           115                   120                   125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr  
           130                   135                   140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn  
 145                   150                   155                   160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser  
                   165                   170                   175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly  
 180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu  
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe  
 210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Met  
 225 230 235 240

Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val  
 245 250 255

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu  
 260 265 270

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys  
 275 280 285

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu  
 290 295 300

Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln  
 305 310 315 320

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg  
 325 330 335

Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val  
 340 345 350

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile  
 355 360 365

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn  
 370 375 380

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly  
 385 390 395 400

Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val  
 405 410 415

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro  
 420 425 430

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser  
 435 440 445

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val  
 450 455 460

Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys  
 465 470 475

<210> 611  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> SV40

<400> 611  
 aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaa 35

<210> 612  
 <211> 276  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 612  
 cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttggttg cccctcccc gtgccttct 60  
 tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aatgaggaa attgcatgc 120  
 attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggt ggggcaggac agcaaggggg 180  
 aggattggga agacaatagc aggcattgctg gggatgctgt gggctctatg gcttctgagg 240

cggaagaac cagctggggc tctaggggt atcccc 276

<210> 613

<211> 4612

<212> DNA

<213> 智人

<400> 613

ttggcactc cctctctgcg cgctcctcg ctcaactgagg ccgggcgacc aaaggctgcc 60

cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120

gccaaactca tcaactagggg ttctagatc taatgtgata gatttcccaa cttaatgcc 180

acataccata aacctccat tctgctaag cccagcctaa gttggggaga ccaactccaga 240

ttccaagatg tacagtttgc tttgctgggc ctttttccca tgccctgcctt tactctgcca 300

gagttatatt gctggggttt tgaagaagat cctattaat aaaagaataa gcagtattat 360

taagtagccc tgcatttcag gtttccttga gtggcaggcc aggcctggcc gtgaacgttc 420

actgaaatca tggcctcttg gccaaagattg atagcttgtg cctgtccctg agtcccagtc 480

catcacgagc agctggtttc taagatgcta tttcccgtat aaagcatgag accgtgactt 540

gccagcccca cagagccccc ccttgtcca tcaactggcat ctggactcca gcctgggttg 600

gggcaaagag ggaaatgaga tcatgtccta acctgatec tcttgtccca cggctccggt 660

gcccgtcagt gggcagagcg cacatgccc acagtcccc agaagtggg gggagggtc 720

ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg 780

tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc 840

gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt 900

tcccggggc ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccctgaat tacttccacg 960

cccctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag 1020

ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccctc gcctcgtgct tgagttgagg cctggcttgg 1080

gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga 1140

taagtctcta gccatttaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga 1200

tagtcttgta aatgcgggcc aagatgtgca cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg 1260  
cggcgacggg gcccggtcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg 1320  
gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct 1380  
cgcgccgccg tgtatgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttagc 1440  
gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgcctgcagg agctcaaaaat ggaggacgcg 1500  
gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct ttccgtcctc 1560  
agccgtcgtc tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc tcgattagtt 1620  
ctcgagcttt tggagtaagt cgtcttttag ttggggggag gggttttatg cgatggagtt 1680  
tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga tgtaattctc 1740  
cttggaaatt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc agacagtggg 1800  
tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtgacggccg gccccgccac catgagcaat 1860  
caagtccttt gttgtgttgt cctgtgtttc cttggcgcaa ataccgtcga cggcgggata 1920  
actcagtecc ccaataacct cttcagaaaa gaaggacaaa acgtaacgct ttccctgcgag 1980  
cagaatctta accacgacgc catgtactgg tacaggcaag accctggaca aggtcttagg 2040  
ctcatatact actctcagat tgtcaatgac ttccaaaaag gggacatagc tgagggctac 2100  
tctgtgtccc gagagaagaa ggagtcattt cccctgacag tgacttctgc acaaaaaaat 2160  
cccactgcat tttatttgtg tgccagttca ccgggtgcat tgtatgagca ataactttggc 2220  
cccggcacta gactgacagt tacggaggat ctgaaaaacg tcttcccgcc agaggtggca 2280  
gttttcgagc ccagtgaggc tgaatctct catacccaaa aagcaaccct tgtctgtctc 2340  
gccactggat tctatcccga ccacgtcgaa ttgagctggg gggatcaatgg gaaagaggta 2400  
catagtgggg tctgtacgga tccacaacce cttaaggaaac aacctgcct taacgattca 2460  
cgatactgcc tgtcatcacg actcagggtg tctgctacct tttggcagaa cccgagaat 2520  
cactttcggg gccaggttca gttttacgga cttagcgaaa atgatgaatg gacacaagac 2580  
cgagcaaage ccgttactca aatagtgagc gcggaagcct gggggcgagc agactgcggc 2640  
ttcacctccg aaagttacca gcaaggtgtt ttgtcagcca ccattttgta tgagattttg 2700

ttggggaagg cgacacttta cgcggtactg gtctctgcct tggttcttat ggctatggtc 2760  
aagaggaaag attccagggg tggctccggg gccacaaact tctccctgct caagcaggcc 2820  
ggagatgtgg aagagaacct tggccctatg acctctatca gagctgtctt tatatttctc 2880  
tggcttcaac ttgatctggg gaatggcgaa aacgtggaac agcacccttc aacgttgagc 2940  
gttcaggaag gagattcagc cgtcatcaag tgtacgtatt ccgattccgc gtcaaactac 3000  
ttcccgtggg acaaacagga acttggcaag cgccccagc tcattatcga catcagaagc 3060  
aacgtaggag agaagaagga ccaacgcata gctgtgactc tcaacaaaac agctaaacat 3120  
ttctccctgc acattacgga aaccaacca gaggattctg ccgtatactt ttgtgctgct 3180  
actgaggacc tcactttgat ctggggagcg ggtacgaagc tcataataaa acccgatata 3240  
caaaacccgg acccagcagt ttatcaattg agagatagta agtccagtga caaatcagtt 3300  
tgtttgttta cggatttcga tagccagacc aatgtcagtc agtcaaagga cagtgatgta 3360  
tacattacag ataaatgtgt acttgacatg cgctcaatgg actttaagtc taactctgct 3420  
gtagcttggg ctaacaaaag tgatthttgcg tgtgccaacg catttaacaa cagcatcata 3480  
cctgaagaca cgttctttcc gaggccagaa agttcctgtg acgtgaaact thtagaaaag 3540  
agtttcgaga ccgacactaa ccttaacttt caaaaccttt cagtgatcgg atttagaatc 3600  
ttgctgctca aggtggcagg gttcaatctg ctgatgactc tgcgactgtg gagttcataa 3660  
cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgthttg cccctcccc gtgccttctt 3720  
tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc thtcttaata aaatgaggaa attgcatcgc 3780  
attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggg ggggcaggac agcaaggggg 3840  
aggattggga agacaatagc aggcattctg gggatgcggt gggctctatg gcttctgagg 3900  
cggaaagaac cagctggggc tctagggggg atccccacca gctgagagac tctaaatcca 3960  
gtgacaagtc tgtctgccta ttcaccgatt ttgattctca aacaaatgtg tcacaaagta 4020  
aggattctga tgtgtatata acagacaaaa ctgtgctaga catgaggctt atggacttca 4080  
agagcaacag tgctgtggcc tggagcaaca aatctgactt tgcattgtgca aacgccttca 4140  
acaacagcat tattccagaa gacaccttct tccccagccc aggtaagggc agctttgggtg 4200

ccttcgcagg ctgtttcctt gcttcaggaa tggccagggt ctgcccagag ctctggtcaa 4260  
 tgatgtctaa aactcctctg attggtggtc tggccttat ccattgccac caaacccctc 4320  
 tttttactaa gaaacagtga gccttgttct ggcagtccag agaatgacac gggaaaaaag 4380  
 cagatgaaga gaaggtggca ggagagggca cgtggcccag cctcagtctc tccaacagat 4440  
 ctaggaacce ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgtc cgctcactga 4500  
 ggccgcccgg gcaaagcccg ggcgtcgggc gacctttggt cgcgccgctt cagtgagcga 4560  
 gcgagcgcgc agagagggag tggccaaacg cgtggtgtaa tcatggtcac ag 4612

<210> 614  
 <211> 3618  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 614  
 ttggcctcct cctctctgag cgcctcctcgt ctcactgagg ccgggagacc aaaggctgccc 60  
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcagc gagcgcgag agagggagtg 120  
 gccaaactca tcaactagggg ttccctagatc taatgtgata gatttcccaa cttaatgcca 180  
 acataccata aacctcccat tctgctaagt cccagcctaa gttggggaga ccaactccaga 240  
 ttccaagatg tacagtttgc tttgctgggc ctttttccca tgccctgcctt tactctgcca 300  
 gaggttatatt gctgggggttt tgaagaagat cctattaat aaaagaataa gcagtattat 360  
 taagtagccc tgcatttcag gtttccttga gtggcaggcc aggccctggcc gtgaacgttc 420  
 actgaaatca tggcctcttg gccaaagattg atagcttgtg cctgtccctg agtcccagtc 480  
 catcacgagc agctggtttc taagatgcta tttcccgtat aaagcatgag accgtgactt 540  
 gccagcccca cagagccccg cccttgctca tcaactggcat ctggactcca gcctggggtt 600  
 gggcaaagag ggaaatgaga tcatgtccta accctgatcc tcttgtccca ccgtgaggct 660  
 ccggtgcccg tcagtgggca gagcgcacat cgcaccagat ccccgagaag ttgggggggag 720  
 gggctcggca ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgcgg ggtaaactgg gaaagtgatg 780  
 tcgtgtactg gctccgcctt tttcccagag gtgggggaga accgtatata agtgcagtag 840  
 tcgcccgtgaa cgtttttttt cgcaacgggt ttgcccagc aacacaggtc gcacatgag 900

caatcaagtc ctttgttgtg ttgtcctgtg tttccttggc gcaaataccg tcgacggcgg 960  
 gataactcag tcccccaat acctcttcag aaaagaagga caaacgtaa cgctttcctg 1020  
 cgagcagaat ctttaaccacg acgccatgta ctggtacagg caagaccctg gacaaggtct 1080  
 taggctcata tactactctc agattgtcaa tgacttccaa aaaggggaca tagctgaggg 1140  
 ctactctgtg tcccagagaga agaaggagtc atttcccctg acagtgactt ctgcacaaaa 1200  
 aatcccact gcattttatt tgtgtgccag ttcaccgggt gcattgtatg agcaatactt 1260  
 tggccccggc actagactga cagttacgga ggatctgaaa aacgtcttcc cgccagaggt 1320  
 ggcagttttc gagcccagtg aggctgaaat ctctcatacc caaaaagcaa cccttgtctg 1380  
 tctcgccact ggattctatc ccgaccacgt cgaattgagc tgggtgggtca atgggaaaga 1440  
 ggtacatagt ggggtctgta cggatccaca accccttaag gaacaacctg cccttaacga 1500  
 ttcacgatac tgctgtcat cagactcag ggtatctgct accttttggc agaaccgag 1560  
 aatcacttt cggtgccagg ttcagtttta cggacttagc gaaaatgatg aatggacaca 1620  
 agaccgagca aagcccgtta ctcaaatagt gagcgcggaa gcctgggggc gagcagactg 1680  
 cggcttcacc tccgaaagtt accagcaagg tgttttgtca gccaccattt tgtatgagat 1740  
 tttgttgggg aaggcgacac tttacgcggt actggtctct gccttggttc ttatggctat 1800  
 ggtcaagagg aaagattcca ggggtggctc cggtgccaca aacttctccc tgctcaagca 1860  
 ggccggagat gtggaagaga acctggccc tatgacctct atcagagctg tctttatatt 1920  
 tctctggctt caacttgatc tggatgaatgg cgaaaacgtg gaacagcacc cttcaacgtt 1980  
 gagcgttcag gaaggagatt cagccgtcat caagtgtacg tattccgatt ccgcgtcaaa 2040  
 ctacttcccg tggtaaaaac aggaacttgg caagcgcgcc cagctcatta tcgacatcag 2100  
 aagcaacgta ggagagaaga aggaccaacg catagctgtg actctcaaca aaacagctaa 2160  
 acatttctcc ctgcacatta cggaaaccca accagaggat tctgccgtat acttttgtgc 2220  
 tgctactgag gacctcactt tgatctgggg agcgggtacg aagctcataa taaaaccgca 2280  
 tatccaaaac ccggaccag cagtttataca attgagagat agtaagtcca gtgacaaatc 2340  
 agtttgtttg tttacggatt tcgatagcca gaccaatgtc agtcagtcaa aggacagtga 2400

tgtatacatt acagataaat gtgtacttga catgcgctca atggacttta agtctaacte 2460  
 tgctgtagct tggcttaaca aaagtgattt tgcgtgtgcc aacgcattta acaacagcat 2520  
 catacctgaa gacacgttct tccgagtcc agaaagtcc tgtgacgtga aacttgtaga 2580  
 aaagagtttc gagaccgaca ctaaccttaa ctttcaaac ctttcagtga tcggatttag 2640  
 aatcttgctg ctcaaggtgg cagggttcaa tctgctgatg actctgcgac tgtggagttc 2700  
 ataacctega ctgtgccttc tagttgccag ccactctgtt tttgccctc ccccgctcct 2760  
 tccttgacce tgggaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca 2820  
 tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg ggggtggggca ggacagcaag 2880  
 ggggaggatt gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatggcttct 2940  
 gaggcggaaa gaaccagctg gggctctagg gggatcccc accagctgag agactctaaa 3000  
 tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc gatcttgatt ctcaaacaaa tgtgtcacia 3060  
 agtaaggatt ctgatgtgta taccacagac aaaactgtgc tagacatgag gtctatggac 3120  
 ttcaagagca acagtgtctg ggcctggagc acaaatctg actttgcatg tgcaaacgcc 3180  
 ttcaacaaca gcattattcc agaagacacc ttcttcccca gccaggtaa gggcagcttt 3240  
 ggtgccttcg caggctgttt ccttgcttca ggaatggcca ggttctgccc agagctctgg 3300  
 tcaatgatgt ctaaaactcc tctgattggt ggtctcggcc ttatecattg ccacaaaac 3360  
 cctcttttta ctaagaacaa gtgagccttg ttctggcagt ccagagaatg acacgggaaa 3420  
 aaagcagatg aagagaaggt ggcaggagag ggcacgtggc ccagcctcag tctctccaac 3480  
 agatctagga acccctagtg atggagttgg ccactccctc tctgcgcgct cgctcgtca 3540  
 ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga 3600  
 gcgagcgagc gcgcagag 3618

<210> 615

<211> 3825

<212> DNA

<213> 智人

<400> 615

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60  
gggcgacctt tggtegcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120  
actccatcac taggggttcc tagatctaata gtgatagatt tcccaactta atgccaacat 180  
accataaacc tcccattctg ctaatgceca gcctaagttg gggagaccac tccagattcc 240  
aagatgtaca gtttgctttg ctgggccttt tcccattgcc tgcctttact ctgccagagt 300  
tatattgctg gggttttgaa gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag 360  
tagccctgca tttcaggttt ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttccactg 420  
aatcatggc ctcttggeca agattgatag cttgtgcctg tccctgagtc ccagtccatc 480  
acgagcagct ggtttctaag atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca 540  
gccccacaga gccccgccct tgtccatcac tggcatctgg actccagcct gggttggggc 600  
aaagagggaa atgagatcat gtccaaacc tgatcctctt gtcccacaac agagaaacag 660  
gagaatatgg gccaaacagg atatctgtgg taagcagttc ctgccccggc tcagggceaa 720  
gaacagttgg aacagcagaa tatgggceaa acaggatata tgtggtaagc agttcctgcc 780  
ccggctcagg gccaaagaaca gatggtcccc agatgcggtc ccgccctcag cagtttctag 840  
agaacctca gatgtttcca gggtgcecca aggacctgaa atgacctgt gccttatttg 900  
aactaacca tcagttcgct tctcgcttct gttcgcgcgc ttctgctccc cgagctctat 960  
ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atcgctgga gacgccatcc acgctgtttt 1020  
gacctcata gaagacaccg actctagagg atcgatcccc cgggctgcag gaattcaagc 1080  
gagaagacaa gggcagaaag caccatgagc aatcaagtcc tttgttgtgt tgtcctgtgt 1140  
ttccttggcg caaataccgt cgacggcggg ataactcagt ccccaataa cctcttcaga 1200  
aaagaaggac aaaacgtaac gctttcctgc gagcagaatc ttaaccacga cgccatgtac 1260  
tggtacaggc aagaccctgg acaaggtctt aggctcatat actactctca gattgtcaat 1320  
gacttccaaa aaggggacat agctgagggc tactctgtgt cccgagagaa gaaggagtca 1380  
tttcccctga cagtgacttc tgcacaaaaa aatcccactg cattttattt gtgtgccagt 1440  
tcaccgggtg cattgtatga gcaatacttt ggccccggca ctgactgac agttacggag 1500

gatctgaaaa acgtcttccc gccagaggtg gcagttttcg agcccagtga ggctgaaatc 1560  
tctcataccc aaaaagcaac ccttgtctgt ctgccactg gattctatcc cgaccacgtc 1620  
gaattgagct ggtgggtcaa tgggaaagag gtacatagtg ggtctgtac ggatccacaa 1680  
ccccttaagg aacaacctgc ccttaacgat tcacgatact gcctgtcatc acgactcagg 1740  
gtatctgcta ccttttggca gaacccgaga aatcactttc ggtgccaggt tcagttttac 1800  
ggacttagcg aaaatgatga atggacacaa gaccgagcaa agcccgttac tcaaatagtg 1860  
agcgcggaag cctgggggcg agcagactgc ggcttcacct ccgaaagtta ccagcaaggt 1920  
gttttgtcag ccaccatttt gtatgagatt ttgttgggga aggcgacact ttacgcggta 1980  
ctggctctg ccttggttct tatggctatg gtcaagagga aagattccag ggggtggctcc 2040  
ggtgccacaa acttctccct gctcaagcag gccggagatg tggaaagaaa ccctggccct 2100  
atgacctcta tcagagctgt ctttatattt ctctggcttc aacttgatct ggtgaatggc 2160  
gaaaacgtgg aacagcacc cttcaacgttg agcgttcagg aaggagattc agccgtcatc 2220  
aagtgtacgt attccgattc cgcgtcaaac tacttcccgt ggtacaaaca ggaacttggc 2280  
aagcgcctcc agctcattat cgacatcaga agcaacgtag gagagaagaa ggaccaacgc 2340  
atagctgtga ctctcaacaa aacagctaaa catttctccc tgcacattac ggaaacccaa 2400  
ccagaggatt ctgccgtata cttttgtgct gctactgagg acctcacttt gatctgggga 2460  
gcgggtacga agctcataat aaaacccgat atccaaaacc cggaccacgc agtttatcaa 2520  
ttgagagata gtaagtccag tgacaaatca gtttgtttgt ttacggattt cgatagccag 2580  
accaatgtca gtcagtcaaa ggacagtgat gtatacatta cagataaatg tgtacttgac 2640  
atgcgctcaa tggactttaa gtctaactct gctgtagctt ggtctaaca aagtgatttt 2700  
gcgtgtgcca acgcatttaa caacagcacc atacctgaag acacgttctt tccgagtcca 2760  
gaaagtccct gtgacgtgaa actttagtaa aagagtttcg agaccgacac taacctaac 2820  
tttcaaaacc tttcagtgat cggatttaga atcttctctc tcaagggtggc agggttcaat 2880  
ctgctgatga ctctgcgact gtggagttca taacctcgac tgtgccttct agttgccagc 2940  
catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgacctt ggaagggtgcc actcccactg 3000

tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt cattctatcc 3060  
 tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg 3120  
 ctgggggatgc ggtgggctct atggcttctg aggcggaaag aaccagctgg ggctctaggg 3180  
 ggtatcccca ccagctgaga gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcaccg 3240  
 attttgatcc tcaaacaaat gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat atcacagaca 3300  
 aaactgtgct agacatgagg tctatggact tcaagagcaa cagtgtctgt gcctggagca 3360  
 acaaatctga ctttgcattg gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca gaagacacct 3420  
 tcttccccag cccaggtaag ggcagctttg gtgccttcgc aggcctgtttc cttgcttcag 3480  
 gaatggccag gttctgcccc gagctctggc caatgatgtc taaaactcct ctgattgggtg 3540  
 gtctcggcct tatccattgc caccaaaacc ctctttttac taagaaacag tgagccttgt 3600  
 tctggcagtc cagagaatga cacgggaaaa aagcagatga agagaagggtg gcaggagagg 3660  
 gcacgtggcc cagcctcagt ctctccaaca gatctaggaa cccttagtga tggagttggc 3720  
 cactccctct ctgcgcgctc gctcgcctac tgaggccggg cgaccaaaagg tcgccccagc 3780  
 cccgggcggc ctcaagtgagc gagcgcgcgc gcagctgcct gcagg 3825

<210> 616  
 <211> 3794  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 616  
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgcctc ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgctc 60  
 gggcgacctt tggtegcccc gcctcagtga gcgagcgcgc gcgcagagag ggagtggcca 120  
 actccatcac taggggttcc tagatctaat gtgatagatt tcccactta atgccaacat 180  
 accataaacc tccattctg ctaatgcccc gcctaagttg gggagaccac tccagattcc 240  
 aagatgtaca gtttgctttg ctgggccttt ttcccatgcc tgcctttact ctgccagagt 300  
 tatattgctg gggttttgaa gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag 360  
 tagccctgca tttcaggttt ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttccactg 420  
 aaatcatggc ctcttgcccc agattgatag cttgtgcctg tccctgagtc ccagtcctc 480

acgagcagct ggtttctaag atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca 540  
 gccccacaga gccccgccct tgtccateac tggcatctgg actccagcct gggttggggc 600  
 aaagagggaa atgagatcat gtccataacc tgatcctcct gtcccacgat ccgaacagag 660  
 agacagcaga atatgggcca aacaggatat ctgtggtaag cagttcctgc cccggctcag 720  
 ggccaagaac agttggaaca gcagaatatg ggccaaacag gatatctgtg gtaagcagtt 780  
 cctgccccgg ctcagggcca agaacagatg gtcccagat gcgggtcccgc cctcagcagt 840  
 ttctagagaa ccatcagatg tttccagggt gccccaaagga cctgaaatga cctgtgcct 900  
 tatttgaact aaccaatcag ttcgcttctc gcttctgttc gcgcgcttct gctccccgag 960  
 ctctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc 1020  
 tgttttgacc tccatagaag acaccgactc tagaggatcc accggtcgcc accatgagca 1080  
 atcaagtctt ttgttggtgt gtctgtgtgt tctttggcgc aaataccgtc gacggcggga 1140  
 taactcagtc ccccaatac ctcttcagaa aagaaggaca aaacgtaacg ctttctgcg 1200  
 agcagaatct taaccacgac gccatgtact ggtacaggca agaccctgga caaggtctta 1260  
 ggtcatata ctactctcag attgtcaatg acttccaaaa aggggacata gctgagggt 1320  
 actctgtgtc ccgagagaag aaggagtcct tccccctgac agtgacttct gcacaaaaaa 1380  
 atcccactgc attttatttg tgtgccagtt caccgggtgc attgtatgag caatactttg 1440  
 gccccggcac tagactgaca gttacggagg atctgaaaaa cgtcttcccg ccagaggtgg 1500  
 cagttttcga gccagtgag gctgaaatct ctcatacca aaaagcaacc cttgtctgtc 1560  
 tggccactgg attctatccc gaccacgtcg aattgagctg gtgggtcaat gggaaagagg 1620  
 tacatagtgg ggtctgtacg gatccacaac cccttaagga acaacctgcc cttaacgatt 1680  
 cacgatactg cctgtcatca cgactcaggg tatctgtctac cttttggcag aacccgagaa 1740  
 atcactttcg gtgccaggtt cagttttacg gacttagcga aaatgatgaa tggacacaag 1800  
 accgagcaaa gcccgttact caaatagtga gcgcggaagc ctggggggcga gcagactgcg 1860  
 gcttcacctc cgaaagttac cagcaaggtg ttttgteagc caccatittg tatgagattt 1920  
 tgttggggaa ggcgacactt tacgcggtac tggctctctgc cttggttctt atggctatgg 1980

tcaagaggaa agattccagg ggtggctccg gtgccacaaa cttctccctg ctcaagcagg	2040
ccggagatgt ggaagagaac cctggcccta tgacctctat cagagctgtc tttatatttc	2100
tctggcttca acttgatctg gtgaatggcg aaaacgtgga acagcacctt tcaacgttga	2160
gcgttcagga aggagattca gccgtcatca agtgtacgta ttccgattcc gcgtcaaact	2220
acttcccgtg gtacaaacag gaacttggca agcgccccca gctcattatc gacatcagaa	2280
gcaacgtagg agagaagaag gaccaacgca tagctgtgac tctcaacaaa acagctaaac	2340
atctctccct gcacattacg gaaacccaac cagaggattc tgccgtatac ttttgtgctg	2400
ctactgagga cctcactttg atctggggag cgggtacgaa gctcataata aaacccgata	2460
tccaaaacce ggaccagca gtttatcaat tgagagatag taagtccagt gacaaatcag	2520
tttgtttgtt tacggatttc gatagccaga ccaatgtcag tcagtcaaag gacagtgatg	2580
tatacattac agataaatgt gtacttgaca tgcgctcaat ggactttaag tetaactctg	2640
ctgtagcttg gtctaacaaa agtgattttg cgtgtgcca cgcatttaac aacagcatca	2700
tacctgaaga cacgttcttt ccgagtccag aaagtctctg tgacgtgaaa cttgtagaaa	2760
agagtttcga gaccgacact aaccttaact ttcaaaacct ttcagtgatc ggatttagaa	2820
tcttgctgct caaggtggca gggttcaatc tgctgatgac tctgcgactg tggagtcat	2880
aacctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgccccctcc ccgtgccttc	2940
cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcate	3000
gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg	3060
ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggcttctga	3120
ggcggaaaga accagctggg gctctagggg gtatccccac cagctgagag actctaaatc	3180
cagtgacaag tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaatg tgtcacaag	3240
taaggattct gatgtgtata tcacagacaa aactgtgcta gacatgaggt ctatggactt	3300
caagagcaac agtgctgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt	3360
caacaacagc attattccag aagacacctt ctccccagc ccaggtaagg gcagctttgg	3420
tgcttccgca ggctgtttcc ttgcttcagg aatggccagg ttctgcccag agctctggtc	3480

aatgatgtct aaaactcctc tgattggtgg tctcggcctt atccattgcc accaaaacce 3540  
 tctttttact aagaaacagt gagccttggt ctggcagtcc agagaatgac acgggaaaaa 3600  
 agcagatgaa gagaaggtgg caggagaggg cacgtggccc agcctcagtc tctccaacag 3660  
 atctaggaac ccctagtgat ggagttggcc actcctctc tgcgcgctcg ctcgctcact 3720  
 gaggccgggc gaccaaaggt cgcccagcgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg 3780  
 cagctgcctg cagg 3794

<210> 617  
 <211> 3893  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 617  
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcgctg ggcgaccttt 60  
 ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120  
 aggggttctt agatctaatt tgatagattt cccaacttaa tgccaacata ccataaacct 180  
 cccattctgc taatgcccag cctaagttgg ggagaccact ccagattcca agatgtacag 240  
 tttgctttgc tgggcctttt tcccatgcct gcctttactc tgccagagtt atattgctgg 300  
 ggttttgaag aagatcctat taaataaaa aataagcagt attattaagt agccctgcat 360  
 ttcaggtttc cttgagtggc aggccaggcc tggccgtgaa cgttccactga aatcatggcc 420  
 tcttgcccaa gattgatagc ttgtgcctgt ccttgagtc cagtccatca cgagcagctg 480  
 gtttctaaga tgctatttcc cgtataaagc atgagaccgt gacttgccag cccacagag 540  
 ccccgccctt gtccatcact ggcatctgga ctccagcctg ggttggggca aagagggaaa 600  
 tgagatcatg tcctaacct gatcctcttg tcccacgggt aggggagggc cttttcccaa 660  
 ggcagtctgg agcatgcgt ttagcagccc cgctgggcac ttggcgctac acaagtggcc 720  
 tctggcctcg cacacattcc acatccaccg gtaggcgcca accggctccg ttctttggtg 780  
 gcccttctgc gccaccttct actcctcccc tagtcaggaa gttccccccc gccccgcagc 840  
 tcgcgtcgtg caggacgtga caaatggaag tagcacgtct cactagtctc gtgcagatgg 900

acagcaccgc tgagcaatgg aagcgggtag gcctttgggg cagcggccaa tagcagcttt 960  
 gctccttcgc tttctgggct cagaggctgg gaaggggtgg gtccgggggc gggctcaggg 1020  
 gcgggctcag gggcggggcg ggcgcccga aagtcctccg aggcccgga ttctgcacgc 1080  
 ttcaaaagcg cacgtctgcc gcgctgttct cctcttctc atctccgggc ctttcgcgaa 1140  
 gcacatgag caatcaagtc ctttgttgtg ttgtctgtg tttccttggc gcaaataccg 1200  
 tcgacggcgg gataactcag tccccaaat acctcttcag aaaagaagga caaacgtaa 1260  
 cgctttcctg cgagcagaat ctaaccacg acgcatgta ctggtacagg caagaccctg 1320  
 gacaaggtct taggctcata tactactctc agattgtcaa tgacttccaa aaaggggaca 1380  
 tagctgaggg ctactctgtg tcccagagaga agaaggagtc atttcccctg acagtgactt 1440  
 ctgcacaaaa aaatcccact gcattttatt tgtgtgccag ttcaccgggt gcattgtatg 1500  
 agcaatactt tggccccggc actagactga cagttacgga ggatctgaaa aacgtcttcc 1560  
 cgccagaggt ggcagtttcc gagcccagtg aggctgaaat ctctcatacc caaaaagcaa 1620  
 cccttgtctg tctcgccact ggattctatc ccgaccacgt cgaattgagc tgggtgggtca 1680  
 atgggaaaga ggtacatagt ggggtctgta cggatccaca accccttaag gaacaacctg 1740  
 cccttaacga ttcacgatac tgctgtcat cacgactcag ggtatctgct accttttggc 1800  
 agaacccgag aaatcacttt cggtgccagg ttcagtttta cggacttagc gaaaatgatg 1860  
 aatggacaca agaccgagca aagcccgtta ctcaaatagt gagcgcggaa gcctgggggc 1920  
 gagcagactg cggttcacc tccgaaagt accagcaagg tgttttgtea gccaccattt 1980  
 tgtatgagat tttgttgggg aaggcgacac tttacgcggt actggtctct gccttggttc 2040  
 ttatggctat ggtcaagagg aaagattcca ggggtggctc cggtgccaca aacttctccc 2100  
 tgctcaagca ggccggagat gtggaagaga accctggccc tatgacctct atcagagctg 2160  
 tctttatatt tctctggctt caacttgatc tggatgaatg cgaaaacgtg gaacagcacc 2220  
 ctcaacgtt gagcgttcag gaaggagatt cagccgtcat caagtgtacg tattccgatt 2280  
 ccgctcaaa ctacttccc tggtacaaac aggaacttgg caagcgcgcc cagctcatta 2340  
 tcgacatcag aagcaacgta ggagagaaga aggaccaacg catagctgtg actctcaaca 2400

aaacagctaa acatttctcc ctgcacatta cggaaacca accagaggat tctgccgtat 2460  
 acttttgtgc tgctactgag gacctcactt tgatctgggg agcgggtacg aagctcataa 2520  
 taaaacccga tatccaaaac ccggaccag cagtttatca attgagagat agtaagtcca 2580  
 gtgacaaatc agtttgtttg tttacggatt tcgatagcca gaccaatgtc agtcagtcaa 2640  
 aggacagtga tgtatacatt acagataaat gtgtacttga catgcgctca atggacttta 2700  
 agtctaactc tgctgtagct tggcttaaca aaagtgattt tgcgtgtgcc aacgcattta 2760  
 acaacagcat catacctgaa gacacgttct ttccgagtc agaaagtcc tgtgacgtga 2820  
 aactttaga aaagagtttc gagaccgaca ctaacctta ctttcaaac ctttcagtga 2880  
 tcggatttag aatcttgctg ctcaagggtg cagggttcaa tctgctgatg actctgcgac 2940  
 tgtggagttc ataacctega ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgccctc 3000  
 ccccgtgcct tccttgacc ccggaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga 3060  
 ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg ggggtggggca 3120  
 ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc 3180  
 tatggcttct gaggcggaaa gaaccagctg gggctctagg gggatatccc accagctgag 3240  
 agactctaaa tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc gattttgatt ctcaaacaaa 3300  
 tgtgtcacia agtaaggatt ctgatgtgta tatecacagac aaaactgtgc tagacatgag 3360  
 gtctatggac ttcaagagca acagtgtctg ggcctggagc aacaaatctg actttgcatg 3420  
 tgcaaacgcc ttcaacaaca gcattattcc agaagacacc ttcttcccca gccaggtaa 3480  
 gggcagcttt ggtgccttcg caggctgttt ctttgcctca ggaatggcca ggttctgccc 3540  
 agagctctgg tcaatgatgt ctaaaactcc tctgattggt ggtctcggcc ttatccattg 3600  
 ccacaaaac cctcttttta ctaagaaaca gtgagccttg ttctggcagt ccagagaatg 3660  
 acacgggaaa aaagcagatg aagagaaggt ggcaggagag ggcacgtggc ccagcctcag 3720  
 tctctccaac agatctagga acccctagtg atggagttag ccactcctc tctgcgcgct 3780  
 cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccagc gcccggtt tgcccgggcg 3840  
 gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagctgc ctgcaggaag cttggtgtaa tca 3893

<210> 618  
 <211> 3857  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 618  
 ttggcactc cctctctgcg cgctcgtcgc ctcaactgagg ccgggcgacc aaaggtegcc 60  
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgcgc gagcgcgcag agagggagtg 120  
 gccaaactca tcaactagggg ttcttagatc taatgtgata gatttcccaa cttaatgcc 180  
 acataccata aacctccat tctgctaagc cccagcctaa gttggggaga ccaactccaga 240  
 ttccaagatg tacagtttgc tttgctgggc ctttttccca tgccctgcctt tactctgcca 300  
 gagttatatt gctggggttt tgaagaagat cctattaaat aaaagaataa gcagtattat 360  
 taagtagccc tgcatttcag gtttccttga gtggcaggcc aggccctggcc gtgaacgttc 420  
 actgaaatca tggcctcttg gccaaagattg atagcttgtg cctgtccctg agtcccagtc 480  
 catcacgagc agctggtttc taagatgcta tttcccgtat aaagcatgag accgtgactt 540  
 gccagcccca cagagccccc cccttgteca tcaactggcat ctggactcca gcctgggttg 600  
 gggcaaagag ggaaatgaga tcatgtecta accctgatec tcttgtccca caacagagaa 660  
 acaggagaat atgggcaaaa caggatatct gtggttaagca gttcctgccc cggctcaggg 720  
 ccaagaacag ttggaacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt aagcagttcc 780  
 tgccccggct cagggccaag aacagatggt ccccagatgc ggtcccgcgc tcagcagttt 840  
 ctagagaacc atcagatggt tccagggtgc cccaaggacc tgaaatgacc ctgtgcctta 900  
 tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc tccccagct 960  
 ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg tcagatcgcc tggagacgcc atccacgctg 1020  
 ttttgacctc catagaagac accgacteta gaggatcgat cccccgggct gcaggaattc 1080  
 aagcgagaag acaagggcag aaagcaccat gagcaatcaa gtcccttgtt gtgttgtcct 1140  
 gtgtttcctt ggcgcaata ccgtcgacgg cgggataact cagtccccca aatacctctt 1200  
 cagaaaagaa ggacaaaacg taacgcttcc ctgcgagcag aatcttaacc acgacgcat 1260  
 gtactggtac aggcaagacc ctggacaagg tcttaggctc atatactact ctcagattgt 1320

caatgacttc caaaaagggg acatagctga gggctactct gtgtcccgag agaagaagga 1380  
 gtcatttccc ctgacagtga cttctgcaca aaaaaatccc actgcatttt atttgtgtgc 1440  
 cagttcaccg ggtgcattgt atgagcaata ctttggcccc ggcactagac tgacagttac 1500  
 ggaggatctg aaaaacgtct tcccgccaga ggtggcagtt ttcgagccca gtgaggctga 1560  
 aatctctcat acccaaaaag caacccttgt ctgtctcgcc actggattct atccccacca 1620  
 cgtcgaattg agctgggtggg tcaatgggaa agaggtacat agtggggtct gtacggatcc 1680  
 acaaccctt aaggaacaac ctgcccttaa cgattcacga tactgcctgt catcacgact 1740  
 cagggtatct gctacctttt ggcagaacct gagaaatcac tttcggtgcc aggttcagtt 1800  
 ttacggactt agcgaaaatg atgaatggac acaagaccga gcaaagcccc ttactcaaat 1860  
 agtgagcgcg gaagcctggg ggcgagcaga ctgcggcttc acctccgaaa gttaccagca 1920  
 aggtgttttg tcagccacca ttttgtatga gatthttgtt gggaaaggcga cactttacgc 1980  
 ggtactggtc tctgccttgg ttcttatggc tatggtaag aggaaagatt ccaggggtgg 2040  
 ctccggtgcc acaaacttct cctgtctcaa gcaggccgga gatgtggaag agaaccctgg 2100  
 ccctatgacc tctatcagag ctgtctttat atttctctgg cttcaacttg atctggtgaa 2160  
 tggcgaaaac gtggaacagc acccttcaac gttgagcgtt caggaaggag attcagccgt 2220  
 catcaagtgt acgtattccg attccgcgtc aaactacttc ccgtggtaca aacaggaact 2280  
 tggcaagcgc ccccagctca ttatcgacat cagaagcaac gtaggagaga agaaggacca 2340  
 acgcatagct gtgactctca aaaaacagc taaacatttc tccctgcaca ttacggaaac 2400  
 ccaaccagag gattctgccg tatacttttg tgctgctact gaggacctca ctttgatctg 2460  
 gggagcgggt acgaagctca taataaaacc cgatatcaa aaccggacc cagcagttta 2520  
 tcaattgaga gatagtaagt ccagtgacaa atcagtttgt ttgtttacgg atttcgatag 2580  
 ccagaccaat gtcagtcagt caaaggacag tgatgtatac attacagata aatgtgtact 2640  
 tgacatgcgc tcaatggact ttaagtctaa ctctgctgta gcttggctca aaaaagtga 2700  
 ttttgcgtgt gccaacgcat ttaacaacag catcatacct gaagacacgt tctttccgag 2760  
 tccagaaagt tccgtgacg tgaacttgt agaaaagagt ttcgagaccg acactaacct 2820

taactttcaa aacctttcag tgatcggatt tagaatcttg ctgctcaagg tggcagggtt 2880  
 caatctgctg atgactctgc gactgtggag ttcataacct cgactgtgcc ttctagttgc 2940  
 cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ccttccttga ccctggaagg tgccactccc 3000  
 actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct 3060  
 attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg 3120  
 catgctgggg atgcgggtggg ctctatggct tctgaggcgg aaagaaccag ctggggctct 3180  
 aggggggtatc cccaccagct gagagactct aaatccagtg acaagtctgt ctgcctattc 3240  
 accgattttg attctcaaac aaatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca 3300  
 gacaaaactg tgctagacat gaggtctatg gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg 3360  
 agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac 3420  
 accttcttcc ccagcccagg taagggcagc tttgggtgct tgcagggctg tttccttgct 3480  
 tcaggaatgg ccaggttctg cccagagctc tggatcaatga tgtctaaaac tctctgatt 3540  
 ggtggtctcg gccttatcca ttgccaccaa aacctcttt ttactaagaa acagtgagcc 3600  
 ttgttctggc agtccagaga atgacacggg aaaaaagcag atgaagagaa ggtggcagga 3660  
 gagggcacgt ggcccagcct cagtctctcc aacagatcta ggaacccta gtgatggagt 3720  
 tggccactcc ctctctgcgc gctcgtctgc tcaactgaggc cgcccgggca aagcccgggc 3780  
 gtcgggcgac ctttggctgc ccggcctcag tgagcgcgc agcgcgcaga gagggagtgg 3840  
 ccaaacgcgt ggtgtaa 3857

<210> 619  
 <211> 3891  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 619  
 ttggcactc cctctctgcg cgctcgtctg ctcaactgagg ccgggcgacc aaaggctgcc 60  
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgcgc gagcgcgcag agagggagtg 120  
 gccaaactcca tcaactagggg ttcttagatc taatgtgata gatttcccaa cttaatgcca 180

acataccata aacctcccat tctgctaag cccagcctaa gttggggaga ccactccaga	240
ttccaagatg tacagtttgc tttgctgggc ctttttccca tgcctgcctt tactctgcca	300
gagttatatt gctggggttt tgaagaagat cctattaaat aaaagaataa gcagtattat	360
taagtagccc tgcatttcag gtttccttga gtggcaggcc aggcctggcc gtgaacgttc	420
actgaaatca tggcctcttg gccaaagattg atagcttgtg cctgtccctg agtcccagtc	480
catcacgagc agctggtttc taagatgcta tttcccgtat aaagcatgag accgtgactt	540
gccagcccca cagagccccc cctttgtcca tcaactggcat ctggactcca gcctgggttg	600
gggcaaagag ggaaatgaga tcatgtccta accctgatcc tcttgtccca cgggtagggg	660
aggcgctttt cccaaggcag tctggagcat gcgcttttagc agccccgctg ggcacttggc	720
gtacacaag tggcctctgg cctcgcacac attccacatc caccggtagg cgccaaccgg	780
ctccgttctt tgggtggcccc ttcgcgccac cttctactcc tcccctagtc aggaagtcc	840
ccccgcccc gcagctcgcg tctgtcagga cgtgacaaat ggaagtagca cgtctcacta	900
gtctcgtgca gatggacagc accgctgagc aatggaagcg ggtaggcctt tggggcagcg	960
gccaatagca gctttgctcc ttcgctttct gggctcagag gctgggaagg ggtgggtccg	1020
ggggcgggct caggggcggg ctacagggcg gggcgggcgc ccgaaggtcc tccggaggcc	1080
cggcattctg caagcttcaa aagcgcacgt ctgccgcgt gttctcctct tctcactctc	1140
cgggcctttc gcgaagcacc atgagcaatc aagtcctttg ttgtgttgtc ctgtgtttcc	1200
ttggcgcaaa taccgtcgac ggcgggataa ctcagtcccc caaatacctc ttcagaaaag	1260
aaggacaaaa cgtaacgctt tcttgcgagc agaatcttaa ccacgacgcc atgtactggt	1320
acaggcaaga ccctggacaa ggtcttaggc tcatatacta ctctcagatt gteaactgact	1380
tccaaaaagg ggacatagct gagggctact ctgtgtcccc agagaagaag gagtcatttc	1440
ccctgacagt gacttctgca caaaaaatc ccaactgcatt ttattttgtgt gccagttcac	1500
cgggtgcatt gtatgagcaa tactttggcc ccggcactag actgacagtt acggaggatc	1560
tgaaaaacgt ctcccgcga gaggtggcag ttttcgagcc cagtgaggct gaaatctctc	1620
atacccaaaa agcaaccctt gtctgtctcg ccaactggatt ctatcccgcac cacgtcgaat	1680

tgagctggtg ggtcaatggg aaagaggtac atagtggggt ctgtacggat ccacaacccc	1740
ttaaggaaca acctgccctt aacgattcac gatactgcct gtcatacaga ctcagggtat	1800
ctgctacctt ttggcagaac ccgagaaatc actttcgggt ccaggttcag ttttacggac	1860
ttagcgaaaa tgatgaatgg acacaagacc gagcaaagcc cgttactcaa atagtgagcg	1920
cggaaagcctg ggggcgagca gactgcggct tcacctccga aagttaccag caaggtgttt	1980
tgtcagccac cattttgtat gagattttgt tggggaaggc gacactttac gcggtactgg	2040
tctctgcctt ggttcttatg gctatggtea agaggaaaga ttccagggggt ggctccgggtg	2100
ccacaaactt ctccctgctc aagcaggccg gagatgtgga agagaaccct ggccctatga	2160
cctctatcag agctgtcttt atatttctct ggcttcaact tgatctgggtg aatggcgaaa	2220
acgtggaaca gcacccttca acgttgagcg ttcaggaagg agattcagcc gtcataaagt	2280
gtacgtattc cgattccgcg tcaactact tcccgtggta caaacaggaa cttggcaagc	2340
gccccagct cattatcgac atcagaagca acgtaggaga gaagaaggac caacgcatag	2400
ctgtgactct caacaaaaca gctaaacatt tctccctgca cattacggaa acccaaccag	2460
aggattctgc cgtatacttt tgtgctgcta ctgaggacct cactttgatc tggggagcgg	2520
gtacgaagct cataataaaa cccgatatcc aaaaccggga cccagcagtt tatcaattga	2580
gagatagtaa gtccagtgac aatcagttt gtttgtttac ggatttcgat agccagacca	2640
atgtcagtca gtcaaaggac agtgatgtat acattacaga taaatgtgta cttgacatgc	2700
gctcaatgga cttaagtct aactctgctg tagcttggtc taacaaaagt gattttgcgt	2760
gtgccaacgc atttaacaac agcatcatac ctgaagacac gttctttccg agtccagaaa	2820
gttctctgta cgtgaaactt gtagaaaaga gtttcgagac cgacactaac cttaactttc	2880
aaaacctttc agtgatcgga tttagaatct tgctgctcaa ggtggcaggg ttcaatctgc	2940
tgatgactct gcgactgtgg agttcataac ctgcactgtg ctttctagtt gccagccatc	3000
tgttgtttgc cctcccccg tgccttctt gaccctggaa ggtgccactc ccaactgtct	3060
ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg	3120
gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcatgctgg	3180

ggatgcggtg ggctctatgg cttctgaggc ggaaagaacc agctggggct ctagggggta 3240  
 tccccaccag ctgagagact ctaaateccag tgacaagtct gtctgcctat tcaccgattt 3300  
 tgattctcaa acaaatgtgt cacaaagtaa ggattctgat gtgtatatca cagacaaaac 3360  
 tgtgctagac atgaggtcta tggacttcaa gagcaacagt gctgtggcct ggagcaacaa 3420  
 atctgacttt gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcatt attccagaag acaccttctt 3480  
 ccccagccca ggtaagggca gctttgggtgc cttegcaggc tgtttccttg cttcaggaat 3540  
 ggccaggttc tgcccagagc tctggtea at gatgtetaaa actcctctga ttggtggtct 3600  
 cggccttate cattgccacc aaaacctctt ttttactaag aaacagtgag ccttgttctg 3660  
 gcagtccaga gaatgacacg ggaaaaaagc agatgaagag aagggtggcag gagagggcac 3720  
 gtggcccagc ctcaagtctt ccaacagatc taggaacccc tagtgatgga gttggccact 3780  
 cctctctgc gcgctcctc gctcaactgag gccgcccggg caaagcccgg gcgctcgggcg 3840  
 acctttggtc gcccgccctc agtgagcagc cgagcgcgca gagagggagt g 3891

<210> 620  
 <211> 3820  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 620  
 ttggccactc cctctctgcg cgtcctctc ctcactgagg ccgggcgacc aaaggctgcc 60  
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcagc gagcgcgag agagggagtg 120  
 gccaaactca tcaactagggg ttctagatc taatgtgata gatttccca cttaatgcca 180  
 acataccata aacctccat tctgcta atg cccagcctaa gttggggaga ccaactcaga 240  
 ttccaagatg tacagtttgc tttgctgggc ctttttccca tgctgcctt tactctgcca 300  
 gagttatatt gctggggttt tgaagaagat cctattaaat aaaagaataa gcagtattat 360  
 taagtagccc tgcatctcag gtttccttga gtggcaggcc aggccctggcc gtgaacgttc 420  
 actgaaatca tggcctcttg gccaaagattg atagcttgtg cctgtccctg agtcccagtc 480  
 catcagagc agctggtttc taagatgcta tttcccgtat aaagcatgag accgtgactt 540  
 gccagcccca cagagccccg ccttgtcca tcaactggcat ctggactcca gcctgggttg 600

gggcaaagag ggaaatgaga tcatgtccta accctgatcc tcttgtccca cgatccgaac 660  
 agagagacag cagaatatgg gccaaacagg atatctgtgg taagcagttc ctgccccggc 720  
 tcagggccaa gaacagttgg aacagcagaa tatgggccaa acaggatata tgtggtaagc 780  
 agttcctgcc ccggctcagg gccagaaca gatgggtccc agatgcggtc ccgccctcag 840  
 cagtttctag agaaccatca gatgtttcca ggggtgcccc aggacctgaa atgacctgt 900  
 gccttatttg aactaaccaa tcagttcgct tctcgcttct gttcgcgcgc ttctgctccc 960  
 cgagctctat ataagcagag ctggtttagt gaaccgtcag atcgccctgga gacgccatcc 1020  
 acgctgtttt gacctccata gaagacaccg actctagagg atccaccggt cgccaccatg 1080  
 agcaatcaag tcctttgttg tgttgtcctg tgtttccttg gcgcaaatac cgtcgacggc 1140  
 gggataactc agtcccccaa atacctcttc agaaaagaag gacaaaacgt aacgctttcc 1200  
 tgcgagcaga atcttaacca cgacgccatg tactggtaaa ggcaagacc tggacaaggt 1260  
 cttaggctca tatactactc tcagattgtc aatgacttcc aaaaagggga catagctgag 1320  
 ggctactctg tgtcccgaga gaagaaggag tcatttcccc tgacagtgac ttctgcacaa 1380  
 aaaaatccca ctgcatttta tttgtgtgcc agttcaccgg gtgcattgta tgagcaatac 1440  
 tttggccccg gcactagact gacagttacg gaggatctga aaaacgtctt cccgccagag 1500  
 gtggcagttt tcgagcccag tgaggctgaa atctctcata cccaaaaagc aaccttgtc 1560  
 tgtctcgcca ctggatteta tcccgaccac gtcgaattga gctgggtgggt caatgggaaa 1620  
 gaggtacata gtggggtctg tacggatcca caaccctta aggaacaacc tgccctaac 1680  
 gattcaagat actgcctgtc atcacgactc agggtatctg ctaccttttg gcagaaccg 1740  
 agaaatcact ttcggtgcca ggttcagttt tacggactta gcgaaaatga tgaatggaca 1800  
 caagaccgag caaagcccgt tactcaaata gtgagcgcgg aagcctgggg gcgagcagac 1860  
 tgcggettca cctccgaaag ttaccagcaa ggtgttttgt cagccacat tttgtatgag 1920  
 attttgttgg ggaaggcgac actttacgcg gtactggtct ctgccttggg tcttatggct 1980  
 atggtcaaga ggaaagatte caggggtggc tccggtgcca caaacttctc cctgctcaag 2040  
 caggccggag atgtggaaga gaacctggc cctatgacct ctatcagagc tgtctttata 2100

tttctctggc ttcaacttga tctggtgaat ggcgaaaacg tggaacagca cccttcaacg	2160
ttgagcgttc aggaaggaga ttcagccgtc atcaagtgtc cgtattccga ttccgcgtca	2220
aactacttcc cgtggtacaa acaggaactt ggcaagcgcc cccagctcat tatcgacatc	2280
agaagcaacg taggagagaa gaaggaccaa cgcatagctg tgactctcaa caaaacagct	2340
aaacatttct ccctgcacat tacggaaacc caaccagagg attctgccgt ataactttgt	2400
gctgctactg aggacctcac tttgatctgg ggagcgggta cgaagctcat aataaaaccc	2460
gatatccaaa acccggacce agcagtttat caattgagag atagtaagtc cagtgacaaa	2520
tcagtttgtt tgtttacgga tttcgatagc cagaccaatg tcagtcagtc aaaggacagt	2580
gatgtataca ttacagataa atgtgtactt gacatgcgct caatggactt taagtctaac	2640
tctgctgtag cttggtctaa caaaagtgat tttgcgtgtg ccaacgcatt taacaacagc	2700
atcataacctg aagacacgtt ctttccgagt ccagaaagt cctgtgacgt gaaacttgta	2760
gaaaagagtt tcgagaccga cactaacctt aactttcaaa acctttcagt gatcggattt	2820
agaatcttgc tgctcaaggt ggcagggttc aatctgctga tgactctgcg actgtggagt	2880
tcataacctc gactgtgect tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tccccctgc	2940
cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg	3000
catcgcattg tctgagtagg tgtcatteta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca	3060
agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tctatggctt	3120
ctgaggcgga aagaaccagc tggggctcta gggggtatcc ccaccagctg agagactcta	3180
aatccagtga caagtctgtc tgccatttca cegattttga ttctcaaaca aatgtgtcac	3240
aaagtaagga ttctgatgtg tatatcacag acaaaactgt gctagacatg aggtctatgg	3300
acttcaagag caacagtgtc gtggcctgga gcaacaaatc tgactttgca tgtgcaaacg	3360
ccittcaaaa cagcattatt ccagaagaca ctttcttccc cagcccaggt aagggcagct	3420
ttgggtgcctt cgcaggctgt ttctttgctt caggaatggc caggttctgc ccagagctct	3480
ggteaagtat gtctaaaact cctctgattg gtggtctcgg ccttatccat tgccacaaa	3540
accctctttt tactaagaaa cagtgagcct tgttctggca gtccagagaa tgacacggga	3600

aaaaagcaga tgaagagaag gtggcaggag agggcacgtg gcccagcctc agtctctcca 3660  
 acagatctag gaaccctag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg ctcgctcgtt 3720  
 cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tcgggcgacc tttggtcgcc cggcctcagt 3780  
 gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caaacgcgtg 3820

<210> 621  
 <211> 3638  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 621  
 ttggcactc cctctctgcg cgctcgtctg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60  
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgcgc gagcgcgcag agagggagtg 120  
 gccaaactcca tcactagggg ttccctagatc tcaatgagag agcaatctcc tggtaatgtg 180  
 atagatttcc caacttaatg ccaacatacc ataaacctcc cattctgcta atgcccagcc 240  
 taagttgggg agaccactcc agattccaag atgtacagtt tgcctttgctg ggcccttttc 300  
 ccatgcctgc ctttactctg ccagagttat attgctgggg ttttgaagaa gatcctatta 360  
 aataaaagaa taagcagtat tattaagtag ccctgcattt caggtttcct tgagtggcag 420  
 gccaggcctg gccgtgaacg ttcactgaaa tcatggcctc ttggccaaga ttgatagctt 480  
 gtgcctgtcc ctgagtecca gtccatcacg agcagctggg ttctaagatg ctatttcccg 540  
 tataaagcat gagaccgtga cttgccagcc ccacagagcc ccgcccttgt ccatcactgg 600  
 catctggact ccagcctggg ttggggcaaa gagggaaatg agatcatgtc cgagtaattc 660  
 atacaaaagg actcgcacct gccttgggga atcccaggga ccgtcgttaa actcccacta 720  
 acgtagaacc cagagatcgc tgcgttcccg cccctcacc cgcccgtctt cgtcactact 780  
 gaggtggaga agagcatgcg tgaggctccg gtgcccgtca gtgggcagag cgcacatcgc 840  
 ccacagtccc cgagaagtgg gggggagggg tcggcaattg aaccggtgcc tagagaaggt 900  
 ggcgcgggggt aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt cccgagggtg 960  
 ggggagaacc gtatataagt gcagtagtgc ccgtgaacgt tctttttcgc aacgggtttg 1020

ccgccagaac acaggtaagt gccgtgtgtg gttcccgcgg gcctggcctc tttacgggtt 1080  
 atggcccttg cgtgccttga attacttcca cgcccctggc tgcagtacgt gattcttgat 1140  
 cccgagcttc gggttggaag tgggtgggag agttcgaggc cttgcgctta aggagcccct 1200  
 tcgcctcgtg cttgagttga ggcctggcctt gggcgctggg gccgccgcgt gcgaatctgg 1260  
 tggcaccttc gcgcctgtct cgtctgtttc gataagtctc tagccattta aaatttttga 1320  
 tgacctgctg cgacgctttt tttctggcaa gatagtcttg taaatgcggg ccaacatctg 1380  
 cacactggta tttcggtttt tggggccgcg ggcggcgacg gggcccgtgc gtcccagcgc 1440  
 acatgttcgg cgaggcgggg cctgcgagcg cggccaccga gaatcggacg ggggtagtct 1500  
 caagctggcc ggcctgctct ggtgcctggc ctcgcgccgc cgtgtatcgc cccgccctgg 1560  
 gcggcaaggc tggcccggtc ggcaccagtt gcgtgagcgg aaagatggcc gcttcccggc 1620  
 cctgctgcag ggagctcaaa atggaggacg cggcgctcgg gagagcgggc gggtagtca 1680  
 cccacacaaa ggaaaagggc ctttccgtcc tcagccgtcg ctteatgtga ctccacggag 1740  
 taccgggcgc cgtccaggca cctcgattag ttctcgagct tttggagtac gtcgtcttta 1800  
 ggttgggggg aggggtttta tgcgatggag tttccccaca ctgagtgggt ggagactgaa 1860  
 gttaggccag cttggcactt gatgtaattc tccttggaat ttgccctttt tgagtttgga 1920  
 tcttggttca ttctcaagcc tcagacagtg gttcaaagtt tttttcttc atttcaggtg 1980  
 tcgtgacacc ggtcgcacc atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc 2040  
 ccatcctggt cgagctggac ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg 2100  
 gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc 2160  
 tgcccgtgcc ctggcccacc ctctgacca ccctgacctc cggcgtgcag tgcttcagcc 2220  
 gctaccccga ccacatgaag cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggetacg 2280  
 tccaggagcg caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga 2340  
 agttcgaggg cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac tccaaggagg 2400  
 acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca 2460  
 tggccgacaa gcagaagaac ggcacatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg 2520

acggcagcgt gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg 2580  
 tgctgctgcc cgacaaccac tacctgagca cccagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg 2640  
 agaagcgcga tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca 2700  
 tggacgagct gtacaagtaa tagcggccgc gactctagat cataatcagc cataccacat 2760  
 ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct cccctgaac ctgaaacata 2820  
 aatgaatgc aattgttggt gttaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaataaa 2880  
 gcaatagcat cacaatttc acaataaag ctttttttc actgcattct agttgtggtt 2940  
 tgtccaaact catcaatgta tcttaaggcg ttgacaagtc tgtctgecta ttcaccgatt 3000  
 ttgattctca aacaaatgtg tcacaaagta aggattctga tgtgtatata acagacaaaa 3060  
 ctgtgctaga catgaggctt atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaaca 3120  
 aatctgactt tgcattgtca aacgccttca acaacagcat tattccagaa gacaccttct 3180  
 tccccagccc aggtaagggc agctttgggtg ccttcgcagg ctgtttcctt gcttcaggaa 3240  
 tggccagggt ctgcccagag ctctgggtcaa tgatgtctaa aactcctctg attgggtggtc 3300  
 tcggccttat ccattgccac caaaaccctc tttttactaa gaaacagtga gccttgttct 3360  
 ggcagtccag agaatgacac gggaaaaaag cagatgaaga gaaggtggca ggagagggca 3420  
 cgtggcccag cctcagtctc tccaactgag ttcttgccctg cctgcctttg cagatctagg 3480  
 aaccctagt gatggagtgt gccactcctt ctctgcgcgc tcgctcgtc actgaggccg 3540  
 cccgggcaaa gcccgggcgt cgggcgacct ttggctgccc ggcctcagtg agcgagcgag 3600  
 cgcgcagaga gggagtggcc aaacgcgtgg tgtaatca 3638

<210> 622  
 <211> 2382  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 622  
 ttggcactc cctctctgcg cgctcgtcgc ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60  
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120  
 gccaaactca tcaactagggg ttcttagatc ttgccaacat accataaacc tcccattctg 180

ctaagccca gcctaagttg gggagaccac tccagattcc aagatgtaca gtttgctttg	240
ctgggccttt ttcccatgcc tgcctttact ctgccagagt tatattgctg gggttttgaa	300
gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag tagccctgca tttcaggttt	360
ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttactg aaatcatggc ctcttggcca	420
agattgatag cttgtgcctg tccctgagtc ccagtccatc acgagcagct ggtttctaag	480
atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca gcccacaga gcccgcct	540
tgtccatcac tggcatctgg actccagcct gggttggggc aaagaggga atgagatcat	600
gtcctaacce tgatcctctt gtcccacaga tatccagaac cctgaccctg ccgagggccg	660
cggcagcctg ctgacctgcg gcgacgtgga ggagaatccc ggcccctgg tgagcaaggg	720
cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat cctggtcgag ctggacggcg acgtaaacgg	780
ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgaccct	840
gaagttcacc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg cccaccctcg tgaccacct	900
gacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt	960
caagtcggcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg	1020
caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgaggcgcac accctggtga accgcatcga	1080
gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa	1140
ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaagtgaa	1200
cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcccgacc actaccagca	1260
gaacaccccc atcggcgacg gcccctgtct gctgcccgcac aaccactacc tgagcaccca	1320
gtccgccctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac atggtcctgc tggagtctgt	1380
gaccgcccgc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac aagtaacctc gactgtgcct	1440
tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tccccgtgc ctctcttgac cctggaaggt	1500
gccactccca ctgtccttcc ctaataaaat gaggaaattg catcgcattg tctgagtagg	1560
tgctattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac	1620
aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tctatggctt ctgaggcgga aagaaccagc	1680

tggggctcta gggggtatcc ccactagtcg tgtaccagct gagagactct aaatccagtg 1740  
 acaagtctgt ctgcctatcc accgattttg attctcaaac aaatgtgtca caaagtaagg 1800  
 attctgatgt gtatatcaca gacaaaactg tgctagacat gaggtctatg gacttcaaga 1860  
 gcaacagtgc tgtggcctgg agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca 1920  
 acagcattat tccagaagac accttcttcc ccagcccagg taagggcagc tttgggtcct 1980  
 tgcaggctg tttccttgc t caggaatgg ccaggttctg cccagagctc tggatcaatga 2040  
 tgtctaaaac tcctctgatt ggtggtctcg gccttatcca ttgccaccaa aaccctcttt 2100  
 ttactaagaa acagtgagcc ttgttctggc agtccagaga atgacacggg aaaaaagcag 2160  
 atgaagagaa ggtggcagga gagggcacgt ggcccagcct cagtctctag atctaggaac 2220  
 ccctagtgat ggagttggcc actccctctc tgcgcgctcg ctgcctcact gaggccgccc 2280  
 gggcaaagcc cgggcgctcg ggcacctttg gtcgcccggc ctacgtgagc gagcgagcgc 2340  
 gcagagaggg agtggccaag aattctctgg ccgtcgtttt ac 2382

<210> 623  
 <211> 4618  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 623  
 ttggcactc cctctctgcg cgctcgtcgc ctactgagg ccgggcgacc aaaggctgcc 60  
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcagc gagcgcgcag agagggagtg 120  
 gccaaactca tcaactagggg ttcttagatc ttgccaacat accataaacc tcccattctg 180  
 ctaatgcca gcctaagttg gggagaccac tccagattcc aagatgtaca gtttgctttg 240  
 ctgggccttt ttcccatgcc tgcctttact ctgccagagt tatattgctg gggttttgaa 300  
 gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag tagccctgca tttcaggttt 360  
 ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttcaactg aaatcatggc ctcttgcca 420  
 agattgatag cttgtgcctg tcctgagtc ccagtcctc acgagcagct ggtttctaag 480  
 atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca gccccacaga gccccgcct 540

tgtccatcac tggcatctgg actccagcct gggttggggc aaagagggaa atgagatcat 600  
 gtcctaacce tgatcctctt gtcccacaga tatccagaac cctgaccctg cggctccggt 660  
 gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagtggg gggaggggtc 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 gagccccctc gcctcgtgct tgagttgagg cctggcttgg 1080  
 gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga 1140  
 taagtctcta gccatttaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga 1200  
 tagtcttgta aatgcgggcc aagatgtgca cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg 1260  
 cggcgacggg gcccgtgcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg 1320  
 gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct 1380  
 cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc 1440  
 gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat ggaggacgcg 1500  
 gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct ttcgctctc 1560  
 agccgtegct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc tegattagtt 1620  
 ctcgagcttt tggagtacgt cgtcttttagg ttggggggag gggttttatg cgatggagtt 1680  
 tcccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga tgtaattctc 1740  
 cttggaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc agacagtgg 1800  
 tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgct gtgatgcggc cgccaccatg ggatcttgg 1860  
 cactgtgttg cgtgtccctg tgcacctggg tggccaagca cacagatgcc ggcgtgatcc 1920  
 agtctcctag acacgaagtg accgagatgg gccaaagaagt gaccctgcgc tgcaagccta 1980  
 tcagcggcca cgattacctg ttctggtaca gacagaccat gatgagaggc ctggaactgc 2040

tgatctactt caacaacaac gtgcccacg acgacagcgg catgcccag gatagattca 2100  
gcccgaagat gcccacgccc agcttcagca cctgaagat ccagcctagc gagcccagag 2160  
atagcgcctg gtacttctgc gccagcagaa agacaggcgg ctacagcaat cagccccagc 2220  
actttggaga tggcaccgcg ctgagcatcc tgggaagatct gaagaacgtg tccccacctg 2280  
aggtggcctg gttcgagcct tctgaggccg agatcagcca cacacagaaa gccacactcg 2340  
tgtgtctggc caccggcttc tatccccgac acgtggaact gtcttgggtg gtcaacggca 2400  
aagaggtgca cagcggcgtc agcaccgac ctcagcctct gaaagagcag cccgctctga 2460  
acgacagcag atactgcctg agcagcagac tgagagtgtc cggcaccttc tggcagaacc 2520  
ccagaaacca cttcagatgc caggtgcagt tctacggcct gagcagagaac gatgagtgga 2580  
cccaggatag agccaagcct gtgacacaga tctgtctctg cgaagcctgg ggcagagccg 2640  
attgtggctt taccagcgag agctaccagc agggcgtgct gtctgccaca atcctgtacg 2700  
agatcctgct gggcaaagcc actctgtacg ccgtgctggt gtctgccctg gtgctgatgg 2760  
ccatggtcaa gcggaaggat agcaggggcg gctccggtgc caaaaacttc tccctgctca 2820  
agcaggccgg agatgtggaa gagaaccctg gccctatgga aaccctgctg aagggtgctga 2880  
gcggcacact gctgtggcag ctgacatggg tccgatctca gcagcctgtg cagtctctc 2940  
aggccgtgat tctgagagaa ggcgaggacg ccgtgatcaa ctgcagcagc tctaaggccc 3000  
tgtacagcgt gcaactggtac agacagaagc acggcgaggc ccctgtgttc ctgatgatcc 3060  
tgctgaaagg cggcgagcag aagggccacg agaagatcag cggcagcttc aacgagaaga 3120  
agcagcagtc cagcctgtac ctgacagcca gccagctgag ctacagcggc acctactttt 3180  
gtggcaccgc ctggatcaac gactacaagc tgtctttcgg agccggcacc acagtgacag 3240  
tgcgggcca tatteagaac cccgatcctg ccgtgtacca gctgagagac agcaagagca 3300  
gcgacaagag cgtgtgcctg ttaccgact tcgacagcca gaccaacgtg tcccagagca 3360  
aggacagcga cgtgtacatc accgataaga ctgtgctgga catgcggagc atggacttca 3420  
agagcaacag cggcgtggcc tgggtccaaca agagcgatct cgcctgcgcc aacgccttca 3480  
acaacagcat tatccccgag gacacattct tcccagctc tgagagcagc tgcgacgtga 3540

agctggtgga aaagagcttc gagacagaca ccaacctgaa ctccagaac ctgagcgtga 3600  
 tcggcttcag aatcctgctg ctcaaggtgg ccggcttcaa cctgctgatg accctgagac 3660  
 tgtggtccag ctaacctega ctgtgccttc tagttgccag ccactctgtt tttgccctc 3720  
 ccccgctgct tccttgacce tggaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga 3780  
 ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg gggtagggca 3840  
 ggacagcaag ggggaggatt gggaagaca tagcaggcat gctggggatg cggtagggctc 3900  
 tatggcttct gaggcggaaa gaaccagctg gggctctagg gggatatccc actagtcgtg 3960  
 taccagctga gagactctaa atccagtac aagtctgtct gcctattcac cgattttgat 4020  
 tctcaaaca atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg 4080  
 ctagacatga ggtctatgga ctcaagagc aacagtgtct tggcctggag caacaaatct 4140  
 gactttgcat gtgcaaacgc ctcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc 4200  
 agcccaggta agggcagctt tggtgccttc gcaggctgtt tccttgcttc aggaatggcc 4260  
 aggttctgcc cagagctctg gtcaatgatg tctaaaacte ctctgattgg tggctctggc 4320  
 cttatccatt gccacaaaa cctctttttt actaagaaac agtgagcctt gttctggcag 4380  
 tccagagaat gacacgggaa aaaagcagat gaagagaagg tggcaggaga gggcacgtgg 4440  
 cccagcctca gtctctagat ctaggaacct ctagtgatgg agttggccac tccctctctg 4500  
 cgcgctcgtc cgctcactga ggccgcccgg gcaaagcccg ggcgtcgggc gacctttggt 4560  
 cgcccggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaagaa ttctctgg 4618

<210> 624  
 <211> 4587  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 624  
 ttggcactc cctctctgcg cgctcgtcgc ctcaactgagg ccgggcgacc aaaggtcggc 60  
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcagc gagcgcgag agagggagtg 120  
 gccaaactca tcaactagggg ttctagatc ttgccaat accataaacc tccattctg 180  
 ctaatgcca gcctaagttg gggagaccac tccagattcc aagatgtaca gtttgctttg 240

ctgggccttt tteccatgcc tgcctttact ctgccagagt tatattgctg gggttttgaa 300  
gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag tagccctgca tttcaggttt 360  
ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttcaactg aaatcatggc ctcttggcca 420  
agattgatag ctgtgcctg tccctgagtc ccagtccatc acgagcagct ggtttctaag 480  
atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca gccccacaga gccccgcct 540  
tgtccatcac tggcatctgg actccagcct gggttggggc aaagagggaa atgagatcat 600  
gtcctaacce tgatcctctt gtcccacaga tatccagaac cctgaccctg cggctccggt 660  
gccccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagttggg gggaggggtc 720  
ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg 780  
tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc 840  
gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt 900  
tccccggggc ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacg 960  
cccctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag 1020  
ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccctc gcctcgtgct tgagttgagg cctggcttgg 1080  
gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga 1140  
taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga 1200  
tagtcttgta aatgcgggcc aagatgtgca cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg 1260  
cggcgacggg gcccgctcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg 1320  
gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct 1380  
cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc 1440  
gtgagcggaa agatggccgc tccccgccc tgctgcaggg agctcaaat ggaggacgcg 1500  
gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct ttcgctctc 1560  
agccgtcgtc tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc tcgattagtt 1620  
ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg cgatggagtt 1680  
tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga tgtaattctc 1740

cttggaatth gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc agacagtgg 1800  
 tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtgacggccg gccccgccac catgagcaat 1860  
 caagtccttt gttgtgtttg cctgtgtttc cttggcgcaa ataccgtcga cggcgggata 1920  
 actcagtcce ccaataacct cttcagaaaa gaaggacaaa acgtaacgct ttcttgcgag 1980  
 cagaatctta accacgacgc catgtactgg tacaggcaag accctggaca aggtcttagg 2040  
 ctcatatact actctcagat tgtcaatgac ttccaaaaag gggacatagc tgagggtctac 2100  
 tctgtgtccc gagagaagaa ggagtcattt ccctgacag tgacttctgc acaaaaaaat 2160  
 cccactgcat tttattttgtg tgccagttca ccgggtgcat tgtatgagca atactttggc 2220  
 cccggcacta gactgacagt tacggaggat ctgaaaaacg tcttcccgcc agaggtggca 2280  
 gttttcgagc ccagtgagge tgaatctct catacccaaa aagcaacct tgtctgtctc 2340  
 gccactggat tctatcccga ccacgtcga ttgagctggg gggtaaatgg gaaagaggta 2400  
 catagtgggg tctgtacgga tccacaacce cttaaggaa acactgccct taacgattca 2460  
 cgatactgcc tgtcatcacg actcagggtta tctgtctacct tttggcagaa cccgagaaat 2520  
 cactttcggg gccaggttca gttttacgga cttagcgaaa atgatgaatg gacacaagac 2580  
 cgagcaaagc ccgttactca aatagtgagc gcggaagcct gggggcgagc agactgcggc 2640  
 ttcacctccg aaagttacca gcaaggtgtt ttgtcagcca ccattttgta tgagattttg 2700  
 ttggggaagg cgacacttta cgcggtactg gtctctgcct tggttcttat ggctatggtc 2760  
 aagaggaaag attccagggg tggctccggg gccacaaact tctccctgct caagcaggcc 2820  
 ggagatgtgg aagagaacce tgccctatg acctctatca gagctgtctt tatatttctc 2880  
 tggcttcaac ttgatctggg gaatggcgaa aacgtggaac agcacccttc aacgttgagc 2940  
 gttcaggaag gagattcagc cgtcatcaag tgtacgtatt ccgattccgc gtc aaactac 3000  
 ttcccgtggg acaaacagga acttggcaag cgccccagc tcattatcga catcagaagc 3060  
 aacgtaggag agaagaagga ccaacgcata gctgtgactc tcaacaaaac agctaaacat 3120  
 ttctccctgc acattacgga aaccaacca gaggattctg ccgtatactt ttgtgtctgt 3180  
 actgaggacc tcactttgat ctggggagcg ggtacgaagc tcataataaa acccgatata 3240

caaaacccgg acccagcagt ttatcaattg agagatagta agtccagtga caaatcagtt 3300  
 tgtttgttta cggatttoga tagccagacc aatgtcagtc agtcaaagga cagtgatgta 3360  
 tacattacag ataaatgtgt acttgacatg cgctcaatgg actttaagtc taactctgct 3420  
 gtagcttggg ctaacaaaag tgattttgcg tgtgccaacg catttaacaa cagcatcata 3480  
 cctgaagaca cgttctttcc gagtccagaa agttcctgtg acgtgaaact tgtagaaaag 3540  
 agtttcgaga ccgacactaa ccttaacttt caaaaccttt cagtgatcgg atttagaatc 3600  
 ttgctgctca aggtggcagg gttcaatctg ctgatgactc tgcgactgtg gagttcataa 3660  
 cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg cccctcccc gtgccttctt 3720  
 tgacctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aatgaggaa attgcatcgc 3780  
 attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggg ggggcaggac agcaaggggg 3840  
 aggattggga agacaatagc aggcattctg gggatgcggt gggctctatg gcttctgagg 3900  
 cggaaagaac cagctggggc tctagggggg atccccctg taccagctga gagactctaa 3960  
 atccagtgac aagtctgtct gcctattcac cgattttgat tctcaaacia atgtgtcaca 4020  
 aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg ctagacatga ggtctatgga 4080  
 cttcaagagc aacagtgtct tggcctggag caacaaatct gactttgcat gtgcaaacgc 4140  
 cttcaacaac agcattatc cagaagacac cttcttcccc agcccaggta agggcagctt 4200  
 tgggtgccttc gcaggctggt tctttgcttc aggaatggcc aggttctgcc cagagctctg 4260  
 gtcaatgatg tctaaaactc ctctgattgg tggctctggc cttatccatt gccacaaaa 4320  
 cctctttttt actaagaaac agtgagcctt gttctggcag tccagagaat gacacgggaa 4380  
 aaaagcagat gaagagaagg tggcaggaga gggcacgtgg cccagcctca gtctctagat 4440  
 ctaggaacce ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgtc cgctcactga 4500  
 ggccgcccgg gcaaagcccg ggcgtcgggc gacctttggt cgcgccgect cagtgagcga 4560  
 gcgagcgcgc agagaggag tggccaa 4587

&lt;210&gt; 625

&lt;211&gt; 4630

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 625

ttggccactc cctctctgcg cgctcgcctc ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc	60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg	120
gccaaactca tcaactagggg ttccctagatc ttgccaacat accataaacc tcccattctg	180
ctaatgcccga gcctaagttg gggagaccac tccagattcc aagatgtaca gtttgctttg	240
ctgggccttt ttcccatgcc tgcctttact ctgccagagt tatattgctg gggttttgaa	300
gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag tagccctgca tttcaggttt	360
ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttccactg aaatcatggc ctcttgcca	420
agattgatag cttgtgcctg tccctgagtc ccagtcctac acgagcagct ggtttctaag	480
atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca gccccacaga gccccgcct	540
tgtccatcac tggcatctgg actccagcct gggttggggc aaagagggaa atgagatcat	600
gtcctaacce tgatcctctt gtcccacaga tatecagaac cctgaccctg cggctccggt	660
gccccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagtggg gggaggggtc	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 cctggcttgg	1080
gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga	1140
taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga	1200
tagtcttgta aatgcgggcc aagatgtgca cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg	1260
cggcgacggg gcccgtgctt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg	1320
gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg tgccctggcct	1380

cgcgccgccc tgtatgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc 1440  
gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat ggaggacgcg 1500  
gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct ttccgtcctc 1560  
agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccc tccaggcacc tegattagtt 1620  
ctcgagcttt tggagtaagt cgtcttttagg ttggggggag gggttttatg cgatggagtt 1680  
tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga tgtaattctc 1740  
cttggaaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc agacagtggg 1800  
tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtgatgcggc cgcaccatg ggatcttggg 1860  
cactgtgttg cgtgtccctg tgcacctgg tggccaagca cacagatgcc ggcgtgatcc 1920  
agtctcctag acacgaagtg accgagatgg gccagaagt gaccctgcgc tgcaagccta 1980  
tcagcggcca cgattacctg ttctggtaca gacagacat gatgagaggc ctggaactgc 2040  
tgatctactt caacaacaac gtgcccacgc acgacagcgg catgcccag gatagattca 2100  
gcgccaagat gcccaacgcc agcttcagca cctgaagat ccagcctagc gagcccagag 2160  
atagcgcctg gtacttctgc gccagcagaa agacaggcgg ctacagcaat cagccccagc 2220  
actttggaga tggcaccgga ctgagcatcc tggaaagatc gaagaacgtg tteccacctg 2280  
aggtggccgt gttcgagcct tctgaggccg agatcagcca cacacagaaa gccacactgc 2340  
tgtgtctggc caccggcttc tateccgac acgtggaact gtcttggtgg gteaacggca 2400  
aagaggtgca cagcggcgtc tgtaccgac ctcagcctct gaaagagcag cccgctctga 2460  
acgacagcag atactgcctg agcagcagac tgagagtgtc cgcacacctc tggcagaacc 2520  
ccagaaacca cttcagatgc caggtgcagt tctacggcct gagcgagaac gatgagtgga 2580  
cccaggatag agccaagcct gtgacacaga tcgtgtctgc cgaagcctgg ggcagagccg 2640  
attgtggctt taccagcag agctaccagc agggcgtgct gtctgccaca atcctgtacg 2700  
agatcctgct gggcaaagcc actctgtacg ccgtgctggt gtctgcctg gtgctgatgg 2760  
ccatggtcaa gcggaaggat agcaggggcg gctccggtgc cacaaacttc tccctgctca 2820  
agcaggccgg agatgtggaa gagaaccctg gccctatgga aaccctgctg aaggtgctga 2880

gcggcacact gctgtggcag ctgacatggg tccgatctca gcagcctgtg cagtctctc 2940  
 aggccgtgat tctgagagaa ggcgaggacg ccgtgatcaa ctgcagcagc tctaaggccc 3000  
 tgtacagcgt gcactggtag agacagaagc acggcgaggc ccctgtgttc ctgatgatcc 3060  
 tgctgaaagg cggcgagcag aagggccacg agaagatcag ccccagcttc aacgagaaga 3120  
 agcagcagtc cagcctgtac ctgacagcca gccagctgag ctacagcggc acctactttt 3180  
 gtggcaccgc ctggatcaac gactacaagc tgtctttcgg agccggcacc acagtgcag 3240  
 tgcgggccaat tattcagaac cccgatcctg ccgtgtacca gctgagagac agcaagagca 3300  
 gcgacaagag cgtgtgcctg ttcaccgact tgcacagcca gaccaacgtg tcccagagca 3360  
 aggacagcga cgtgtacatc accgataagt gcgtgctgga catgcggagc atggacttca 3420  
 agagcaacag ccccgtggcc tggccaaca agagcgattt cgcctgcgcc aacgccttca 3480  
 acaacagcat tatccccgag gacacattct tcccagctcc tgagagcagc tgcgacgtga 3540  
 agctggtgga aaagagcttc gagacagaca ccaacctgaa ctccagaac ctgagcgtga 3600  
 tcggcttcag aatcctgctg ctcaagggtg ccggcttcaa cctgctgatg accctgagac 3660  
 tgtggtccag ctaacctcga ctgtgccttc tagttgccag ccactctgtg tttgccctc 3720  
 ccccgtgcct tccctgacct tggaagggtc cactcccact gtcctttctt aataaaatga 3780  
 ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg ggggtggggca 3840  
 ggacagcaag ggggaggatt gggaagaca tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc 3900  
 tatggcttct gaggcggaaa gaaccagctg gggctctagg gggatatccc actagtcgtg 3960  
 taccagctga gagactctaa atccagtgac aagtctgtct gcctattcac cgattttgat 4020  
 tctcaaaca atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatacaga caaaactgtg 4080  
 ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgtg tggcctggag caacaaatct 4140  
 gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc 4200  
 agcccaggta agggcagctt tgggtgccttc gcaggtgtgt tcccttgcctc aggaatggcc 4260  
 aggttctgcc cagagctctg gtcaatgatg tctaaaactc ctctgattgg tggctctggc 4320  
 cttatccatt gccacaaaa cctctttttt actaagaaac agtgagcctt gttctggcag 4380

tccagagaat gacacgggaa aaaagcagat gaagagaagg tggcaggaga gggcacgtgg 4440  
 cccagcctca gtctctagat ctaggaacce ctagtgatgg agttggccac tccctctctg 4500  
 cgcgctcgct cgctcactga ggccgcccgg gcaaagcccc ggcgtcgggc gacctttggt 4560  
 cgccccggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaagaa ttctctggcc 4620  
 gtcgttttac 4630  
  
 <210> 626  
 <211> 4654  
 <212> DNA  
 <213> 智人  
  
 <400> 626  
 ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60  
 cgacgcccgg gctttgcccg ggccgacctca gtgagcgcgc gagcgcgcag agagggagtg 120  
 gccaaactcca tcaactagggg ttcttagatc ttgccaacat accataaacc tcccattctg 180  
 ctaatgcca gcctaagttg gggagaccac tccagattcc aagatgtaca gtttgctttg 240  
 ctgggccttt ttcccatgcc tgcctttact ctgccagagt tatattgctg gggttttgaa 300  
 gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag tagccctgca tttcaggttt 360  
 ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttccactg aaatcatggc ctcttgcca 420  
 agattgatag cttgtgcctg tccctgagtc ccagtccatc acgagcagct ggtttctaag 480  
 atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca gcccacaga gcccgcctt 540  
 tgtccatcac tggcatctgg actccagcct gggttggggc aaagagggaa atgagatcat 600  
 gtccaaacce tgatcctctt gtcccacaga tatccagaac cctgaccctg cggctccggt 660  
 gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagtggg gggaggggtc 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 gagccccctc gcctcgtgct tgagttgagg cctggcttgg 1080  
 gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga 1140  
 taagtctcta gccatttaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga 1200  
 tagtcttgta aatgcggggc aagatgtgca cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg 1260  
 cggcgacggg gcccggtcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg 1320  
 gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct 1380  
 cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc 1440  
 gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat ggaggacgcg 1500  
 gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct ttccgtctc 1560  
 agccgtcgtc tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc tcgattagtt 1620  
 ctcgagcttt tggagtacgt cgtcttttagg ttggggggag gggttttatg cgatggagtt 1680  
 tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga tgtaattctc 1740  
 cttggaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc agacagtgg 1800  
 tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtgatgcggc cgcaccatg ctgagccccg 1860  
 atctgcctga cagcgcctgg aacaccagac tgctgtgcca cgtgatgctg tgcctgctgg 1920  
 gagccgtgtc tgtggctgct ggcgtgatcc agagccccag acacctgac aaagagaaga 1980  
 gagagacagc caccctgaag tgctaccca tccccagca cgacaccgtg tactggtatc 2040  
 agcaggggcc aggccaggac ccccagttcc tgatcagctt ctacgagaag atgcagagcg 2100  
 acaagggcag catccccgac agattcagcg cccagcagtt cagcgaactac cacagcagc 2160  
 tgaacatgag cagcctggaa ctgggcgaca gcgccctgta cttctgtgcc agctctctga 2220  
 gaggcggcct ggaaaagctg ttcttcggca gcggcaccca gctgagcgtg ctggaagacc 2280  
 tgaacaaggt gtcccccca gaggtggccg tgttcagacc ttctgaggcc gaaatctccc 2340  
 acaccagaa agccaccctc gtgtgcctgg ccaccggctt tttccccgac cacgtggaac 2400  
 tgtcttggtg ggtcaacggc aaagaggtgc actccggcgt gtgcaccgat ccccagcctc 2460  
 tgaagaaca gcccgccctg aacgacagcc ggtactgcct gagcagcaga ctgagagtgt 2520

ccgccacctt ctggcagaac ccccggaacc acttcagatg ccaggtgcag ttctacggcc 2580  
 tgagcgagaa cgacgagtgg acccaggaca gagccaagcc cgtgacacag atcgtgtctg 2640  
 ccgaagcctg gggcagagcc gattgcggct ttacctccgt gtccatcag cagggcgtgc 2700  
 tgagcgccac aatcctgtac gagatcctgc tgggcaaggc caccctgtac gccgtgctgg 2760  
 tgtctgccct ggtgctgatg gccatggtca agcggaaagga ctteggttcc ggagccacga 2820  
 acttctctct gttaaagcaa gcaggagacg tggaaagaaa ccccggtecc atgagcctga 2880  
 gcagcctgct gaaagtcgtg accgccagcc tgtggctggg acctggaatc gcccagaaga 2940  
 tcaccagac ccagcccggc atgttcgtgc agaaaaaaga agccgtgacc ctggactgca 3000  
 cctacgacac cagcgacct agctacggcc tgttctggta caagcagccc agcagcggcg 3060  
 agatgatctt cctgatctac cagggcagct acgaccagca gaacgccacc gagggccggt 3120  
 acagcctgaa ctccagaag gcccggaagt ccgccaacct cgtgatcagc gccagccagc 3180  
 tgggcgacag cgccatgtac ttttgcgcca tcagcggcaa cccccctg gtgtttggca 3240  
 agggcacccg gctgagcgtg atcgccaaca tccagaacct cgaccccgca gtgtaccagc 3300  
 tgcgggacag caagagcagc gacaagagcg tgtgcctgtt caccgacttc gacagccaga 3360  
 ccaacgtgtc ccagagcaag gacagcgacg tgtacatcac cgataagtgc gtgctggaca 3420  
 tgcggagcat ggacttcaag agcaacagcg ccgtggcctg gtccaacaag agcgacttcg 3480  
 cctgcgcaa cgcttcaac aacagcatta tccccgagga cacattcttc ccaagccccg 3540  
 agagcagctg cgacgtgaag ctggtggaag agagcttcga gacagacacc aacctgaact 3600  
 tccagaacct cagcgtgatc ggcttccgga tctgtctgt gaaggtggcc ggcttcaacc 3660  
 tgctgatgac cctgcggctg tgggtccagct aatcgatcct cgactgtgcc ttctagtctg 3720  
 cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ctttcttga ccctggaagg tgccactccc 3780  
 actgtctttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcat gtctgagtag gtgtcattct 3840  
 attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg 3900  
 catgctgggg atgcggtggg ctctatggct tctgaggcgg aaagaaccag ctggggctct 3960  
 agggggtatc cccactagtc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg 4020

tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg 4080  
 tgtatatcac agacaaaact gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg 4140  
 ctgtggcctg gagcaacaaa tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta 4200  
 ttccagaaga caccttcttc cccagcccag gtaagggcag ctttgggtgcc ttcgcaggct 4260  
 gtttccttgc ttcaggaatg gccaggttct gcccagagct ctggtcaatg atgtctaaaa 4320  
 ctccctgat tggtgggtctc ggctttatcc attgccacca aaacctctt tttactaaga 4380  
 aacagtgagc cttgttctgg cagtccagag aatgacacgg gaaaaaagca gatgaagaga 4440  
 aggtggcagg agagggcacg tggcccagcc tcagtcteta gatctaggaa cccctagtga 4500  
 tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc 4560  
 ccgggcgtcg ggcgaccttt ggtcggcccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg 4620  
 gagtggccaa gaattctctg gccgtcgttt taca 4654

<210> 627  
 <211> 4638  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 627  
 ttggcactc cctctctgcg cgtcgtctc ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60  
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcgccctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg 120  
 gccaaactca tcaactagggg ttcttagatc ttgccaacat accataaacc tcccattctg 180  
 ctaatgcca gcctaagttg gggagaccac tccagattcc aagatgtaca gtttgctttg 240  
 ctgggccttt ttccatgcc tgcctttact ctgccagagt tatattgctg gggttttgaa 300  
 gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag tagccctgca tttcaggttt 360  
 ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttcaactg aaatcatggc ctcttggcca 420  
 agattgatag cttgtgcctg tcctgagtc ccagtcctc acgagcagct ggtttctaag 480  
 atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca gcccacaga gcccgcct 540  
 tgtccatcac tggcatctgg actccagcct gggttggggc aaagagggaa atgagatcat 600

gtccataacc tgatcctctt gtcccacaga tatccagaac cctgaccctg cggctccggt 660  
 gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagtggg gggaggggtc 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 gagccccctc gcctcgtgct tgagttgagg cctggcttgg 1080  
 gcgctggggc cggcgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga 1140  
 taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga 1200  
 tagtcttgta aatgcgggcc aagatgtgca cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg 1260  
 cggcgacggg gcccgctcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg 1320  
 gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct 1380  
 cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc 1440  
 gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat ggaggacgcg 1500  
 gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct ttccgtctc 1560  
 agccgtcgtc tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc tcgattagtt 1620  
 ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg cgatggagtt 1680  
 tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga tgtaattctc 1740  
 cttggaatth gccctttttg agtttgatc ttggttcatt ctcaagcctc agacagtgtt 1800  
 tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgic gtgatgcggc cgcaccatg ggcaccagac 1860  
 tgctgtgttg ggccgctctg tgtctgctgg gagccgaact gactgaagct ggcgtggccc 1920  
 agagcccccg gtacaagatc atcgagaagc ggcagagcgt ggcttctgg tgcaacccta 1980  
 tcageggaca cgcaccctg tactggtatc agcagatcct gggccagggc cccaagctgc 2040  
 tgattcagtt ccagaacaac ggcgtggtgg acgacagcca gctgcccagg gatagattca 2100

gcgccgagcg gctgaagggc gtggacagca cactgaagat ccagcccgcc aagctggaag 2160  
 atagcgccgt gtacctgtgc gccagcagcc tgtatagagg cgagcagtac ttcggccctg 2220  
 gcacccggct gaccgtgacc gaggatctga agaacgtgtt cccccagag gtggccgtgt 2280  
 tcgagcctag cgaggccgag atcagccaca cccagaaagc caccctcgtg tgccctggcca 2340  
 ccggctttta ccccgaccac gtggaactgt cttgggtgggt caacggcaaa gaggtgcaca 2400  
 gcggcgtctg caccgacccc cagcccctga aagagcagcc cgccctgaac gacagccggt 2460  
 actgtctgag cagcagactg agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc cggaaccact 2520  
 tcagatgcca ggtgcagttc tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggaccggg 2580  
 ccaagcccgt gaccagatc gtgtctgctg aggcctgggg cagagccgat tgcggcttca 2640  
 ccagcgagag ctaccagcag ggcgtgctga gcgccacat cctgtacgag atcctgctgg 2700  
 gcaaggccac cctgtacgcc gtgctggtgt ccgccctggt gctgatggcc atggtcaage 2760  
 ggaaggacag ccggggcggt tccggagcca cgaacttctc tctgttaaag caagcaggag 2820  
 acgtggaaga aaaccccgt cccatggcta tgctgctggg cgccctctgt ctgatcctgt 2880  
 ggctgcagcc cgactgggtc aacagccagc agaagaacga cgaccagcaa gtgaagcaga 2940  
 acagccccag cctgagcgtg caggaaggcc ggatcagcat cctgaactgc gactacacca 3000  
 actctatggt cgactacttc ctgtggtaca agaagtacc cgcgcagggc cccaccttc 3060  
 tgatctccat cagcagcacc aaggacaaga acgaggacgg ccggttcacc gtgtttctga 3120  
 acaagagcgc caagcacctg agcctgcaca tcgtgcctag ccagcctggc gatagcgccg 3180  
 tgtacttctg tgccgccaga ggccagggca acctgatctt tggcaagggc accaagctga 3240  
 gcgtgaagcc caacatccag aaccccagcc ccgcagtgtg ccagctgcgg gacagcaaga 3300  
 gcagcgacaa gagegtgtgc ctgttcaccg acttegacag ccagaccaac gtgtcccaga 3360  
 gcaaggacag cgacgtgtac atcaccgata agtgcgtgct ggacatgcgg agcatggact 3420  
 tcaagagcaa cagcgccgtg gcctggteca acaagagcga cttegccctgc gccaacgcct 3480  
 tcaacaacag cattatcccc gaggacacat tcttcccag ccccgagagc agctgcgacg 3540  
 tgaagctggt ggaaaagagc ttcgagacag acaccaacct gaacttcag aacctcagcg 3600

tgatcggcctt ccggatcctg ctgctgaagg tggccggcctt caacctgctg atgacctgc 3660  
 ggctgtggtc cagctaateg atcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgtttgtt 3720  
 tgccccccc ccgtgccttc cttgacctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa 3780  
 taaaatgagg aaattgcate gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg 3840  
 gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg 3900  
 gtgggctcta tggcttctga ggcggaaaga accagctggg gctctagggg gtatccccac 3960  
 tagtcgtgta ccagctgaga gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattaccg 4020  
 attttgattc tcaacaaat gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat atcacagaca 4080  
 aaactgtgct agacatgagg tctatggact tcaagagcaa cagtgtctgt gcctggagca 4140  
 acaaatctga ctttgcattg gcaaacgctt tcaacaacag cattattcca gaagacacct 4200  
 tcttccccag cccaggtaag ggcagctttg gtgccttcgc aggctgtttc cttgcttcag 4260  
 gaatggccag gttctgceca gagctctggt caatgatgtc taaaactcct ctgattggtg 4320  
 gtctcggcct tatecattgc caccaaaacc ctctttttac taagaaacag tgagccttgt 4380  
 tctggcagtc cagagaatga cacgggaaaa aagcagatga agagaagggt gcaggagagg 4440  
 gcacgtggcc cagcctcagt ctctagatct aggaaccctt agtgatggag ttggcactc 4500  
 cctctctgcg cgctcgtctg ctcaactgagg ccgcccgggc aaagcccggg cgtcgggcga 4560  
 cctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg gccagaatt 4620  
 ctctggccgt cgttttac 4638

<210> 628  
 <211> 4737  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 628  
 ttggcactc cctctctgcg cgctcgtctg ctcaactgagg ccgggcgacc aaaggtcgc 60  
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120  
 gccaaactca tcaactagggg ttctagatc ttgccaat accataaacc tcccattctg 180  
 ctaatgcca gcctaagttg gggagaccac tccagattcc aagatgtaca gtttgctttg 240

ctgggccttt tteccatgcc tgcctttact ctgccagagt tatattgctg gggttttgaa 300  
gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag tagccctgca tttcaggttt 360  
ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttcaactg aaatcatggc ctcttggcca 420  
agattgatag ctgtgcctg tccctgagtc ccagtccatc acgagcagct ggtttctaag 480  
atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca gccccacaga gccccgcct 540  
tgtccatcac tggcatctgg actccagcct gggttggggc aaagagggaa atgagatcat 600  
gtcctaacce tgatcctctt gtcccacaga tatccagaac cctgaccctg cggctccggt 660  
gccccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagttggg gggaggggtc 720  
ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg 780  
tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc 840  
gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt 900  
tccccggggc ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacg 960  
cccctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag 1020  
ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccctc gcctcgtgct tgagttgagg cctggcttgg 1080  
gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga 1140  
taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga 1200  
tagtcttgta aatgcgggcc aagatgtgca cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg 1260  
cggcgacggg gcccgtgcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg 1320  
gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct 1380  
cgcgccgccg tgtatgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc 1440  
gtgagcggaa agatggccgc tccccgccc tgctgcaggg agctcaaat ggaggacgcg 1500  
gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct ttcgctctc 1560  
agccgtcgtc tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc tcgattagtt 1620  
ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg cgatggagtt 1680  
tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga tgtaattctc 1740

cttggaatft gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc agacagtggf 1800  
 tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtgatgcggc cggccaccatg tctctgggcc 1860  
 tgctgtgctg tggcgccctc tctctgctgt gggccggacc tgtgaatgcc ggcgtgacct 1920  
 agacccccaa gttccgggtg ctgaaaaccg gccagagcat gaccctgctg tgtgcccagg 1980  
 acatgaacca cgagtacatg tatttggtaca gacaggacct cggcatgggc ctgctggctga 2040  
 tccactatfc tgtgggcgag ggcaccaccg ccaagggcga agtgcctgat ggctacaacg 2100  
 tgtcccggct gaagaagcag aacttctctc tgggcctgga aagcggcctc cctagccaga 2160  
 ccagcgtgta cttctgtgcc agccggggct accaccggct gaacaacgag cagttcttcg 2220  
 gccctggcac ccggctgacc gtgctggaag acctgaagaa cgtgttcccc ccagaggtgg 2280  
 ccgtgttcga gcctagcag gccgagatca gccacacca gaaagccacc ctcgtgtgcc 2340  
 tggccaccgg cttttacccc gaccacgtgg aactgtcttg gtgggtcaac ggcaaagagg 2400  
 tgcacagcgg cgtctgcacc gacccccagc ccctgaaaga gcagcccccc ctgaacgaca 2460  
 gccggtactg tctgagcagc agactgagag tgtccgccac cttctggcag aacccccgga 2520  
 accacttcag atgccaggtg cagttctacg gcctgagcga gaacgacgag tggaccagg 2580  
 accgggcca a gccctgacc cagatcgtgt ctgctgaggc ctggggcaga gccgattgcg 2640  
 gcttcaccag cgagagctac cagcagggcg tgctgagcgc caccatcctg tacgagatcc 2700  
 tgctgggcaa ggccaccctg tacgccgtgc tgggtgtccg cctgggtgctg atggccatgg 2760  
 tcaagcggaa ggacagccgg ggcggttccg gagccacgaa cttctctctg ttaaagcaag 2820  
 caggagacgt ggaagaaaac cccggtccca tgatcagcct gcgggtgctg ctcgtgatcc 2880  
 tgtggctgca gctgagctgg gtgtgggtccg gaggtgggtc atgggtccat ccgcaattcg 2940  
 aaaaggagg tgggtcaggt ggaggaagcg gcggatccgc gtggtcacat cctcagttcg 3000  
 aaaagcagcg gaaagaggtg gaacaggacc ctggccccct caacgtgcca gagggcgcca 3060  
 ccgtggcctt caactgcacc tacagcaaca gcgccagcca gagcttcttc tggtagagac 3120  
 aggactgccg gaaagaacct aagctgctga tgagcgtgta cagcagcggc aacgaggacg 3180  
 gcagattcac cgcccagctg aacagagcct cccagtagat ctccctgctg atccgggaca 3240

gcaagctgag cgacagcgcc acctacctgt gcgtcgtgaa gcctgacct ggcgcccggaa 3300  
gtaccagct gacctttggc aagggcacca agctgtccgt gatecccaac atccagaacc 3360  
ccgaccccgc agtgtaccag ctgcgggaca gcaagagcag cgacaagagc gtgtgacctgt 3420  
tcaccgactt cgacagccag accaacgtgt cccagagcaa ggacagcgac gtgtacatca 3480  
ccgataagtg cgtgctggac atgcggagca tggacttcaa gagcaacagc gccgtggcct 3540  
ggtccaacaa gagegacttc gectgogcca acgccttcaa caacagcatt atccccgagg 3600  
acacattctt cccaagcccc gagagcagct gcgacgtgaa gctggtggaa aagagcttcg 3660  
agacagacac caacctgaac ttccagaacc tcagcgtgat cggcttccgg atcctgctgc 3720  
tgaaggtggc cggcttcaac ctgctgatga ccttgcggct gtggtccagc taatcgatcc 3780  
tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctccccctg gccttccttg 3840  
accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tectaataaa atgaggaaat tgcategcat 3900  
tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtgggggtgg ggcaggacag caaggggggag 3960  
gattgggaag acaatagcag gcatgctggg gatgcggtgg gctctatggc ttctgaggcg 4020  
gaaagaacca gctggggctc taggggggat ccccactagt cgtgtaccag ctgagagact 4080  
ctaaatccag tgacaagtct gtctgcctat tcaccgattt tgattctcaa acaaatgtgt 4140  
cacaagtaa ggattctgat gtgtatataca cagacaaaac tgtgctagac atgaggtcta 4200  
tggacttcaa gagcaacagt gctgtggcct ggagcaacaa atctgacttt gcatgtgcaa 4260  
acgccttcaa caacagcatt attccagaag acaccttctt ccccagcca ggtaagggca 4320  
gctttgggtgc cttegcaggc tgtttccttg cttcaggaat ggccaggttc tgcccagagc 4380  
tctggtcaat gatgtctaaa actcctctga ttggtggtct cggccttate cattgccacc 4440  
aaaaccctct ttttactaag aaacagtgag ccttgttctg gcagtccaga gaatgacacg 4500  
ggaaaaaagc agatgaagag aaggtggcag gagagggcac gtggcccagc ctcagtctct 4560  
agatctagga acccctagtg atggagttgg ccactccctc tctgcgcgct cgctcgtca 4620  
ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt tggtegcccg gcctcagtga 4680  
gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca agaattctct ggccgtcgtt ttacaac 4737

<210> 629  
 <211> 4646  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 629  
 ttggcactc cctctctgcg cgtctgctcg ctcaactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60  
 cgacgccccg gctttgcccc ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120  
 gccaaactcca tcaactagggg ttccctagatc ttgccaacat accataaacc tcccattctg 180  
 ctaatgceca gcctaagttg gggagaccac tccagattcc aagatgtaca gtttgctttg 240  
 ctgggccttt ttcccatgcc tgcctttact ctgccagagt tatattgctg gggttttgaa 300  
 gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag tagccctgca tttcaggttt 360  
 ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttcaactg aaatcatggc ctcttggcca 420  
 agattgatag cttgtgcctg tccctgagtc ccagtcctac acgagcagct ggtttctaag 480  
 atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca gcccacaga gccccgcct 540  
 tgtccatcac tggcatctgg actccagcct gggttggggc aaagagggaa atgagatcat 600  
 gtcccaacc tgatcctctt gtcccacaga tatccagaac cctgaccctg cggctccggt 660  
 gcccgtcagt gggcagagcg cacatgccc acagtccccg agaagtggg gggaggggtc 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 tgcccttgaat tacttccacg 960  
 cccctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag 1020  
 ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccctc gcctcgtgct tgagttgagg cctggcttgg 1080  
 gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga 1140  
 taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga 1200  
 tagtcttgta aatgcgggcc aagatgtgca cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg 1260

cggcgacggg gcccggtcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg 1320  
 gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct 1380  
 cgcgccgccg tgtatgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc 1440  
 gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat ggaggacgcg 1500  
 gcgctcggga gagcggggcg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct ttccgtcctc 1560  
 agccgtcgtc tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc tcgattagtt 1620  
 ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg cgatggagtt 1680  
 tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga tgtaattctc 1740  
 cttggaattt gccctttttg agtttgatc ttggttcatt ctcaagcctc agacagtgg 1800  
 tcaaagtttt ttcttccat ttcaggtgic gtgatgcggc cgccaccatg ggatgtagac 1860  
 ttctgtgttg cggcgtgctg tgtctgcttg gagctggcga actggtgcct atggaaaccg 1920  
 gcgtgacca gacacctaga cacctggtca tgggcatgac aaacaagaaa agcctgaagt 1980  
 gcgagcagca cctgggccac aatgccatgt actggtacaa gcagagcgc c aagaaacccc 2040  
 tggaaactgat gttcgtgtac agcctggaag agagggtcga gaacaacagc gtgcccagca 2100  
 gattcagccc tgagtgcctt aatagcagcc acctgtttct gcattctgac accctgcagc 2160  
 ctgaggactc tgccctgtat ctgtgtgcca gcagccagga ctacctggtg tccaacgaga 2220  
 agctgttctt cggcagcggc acacagctga gcgtgctgga agatctgaag aacgtgttcc 2280  
 cacctgaggt ggccgtgttc gagccttctg aggccgagat cagccacaca cagaaagcca 2340  
 cactcgtgtg tctggccacc ggcttctatc ccgatcacgt ggaactgtct tgggtgggtca 2400  
 acggcaaaga ggtgcacagc ggcgtcagca ccgatcctca gcctctgaaa gagcagccccg 2460  
 ctctgaacga cagcagatac tgccctgagca gcagactgag agtgtccgcc accttctggc 2520  
 agaaccccag aaaccacttc agatgccagg tgcagttcta cggcctgagc gagaacgatg 2580  
 agtggacca ggatagagcc aagcctgtga cacagatcgt gtctgccgaa gcctggggca 2640  
 gagccgattg tggctttacc agcagagct accagcaggg cgtgctgtct gccacaatcc 2700  
 tgtacgagat cctgctggga aaagccactc tgtacgctgt gctggtgtcc gctctggtgc 2760

tgatggccat ggtcaagcgg aaggatagca ggggcggctc cggtgccaca aacttctccc 2820  
tgctcaagca ggccggagat gtggaagaga accctggccc tatgatcagc ctgagagtgc 2880  
tgctggatcat cctgtggctg cagctgtctt gggctctggtc ccagcggaaa gaggtggaac 2940  
aggacccccg acccttcaat gtgcctgaag gcgccaccgt ggcttcaac tgcacctaca 3000  
gcaatagcgc cagccagagc ttcttctggt acagacagga ctgccgaaa gaaccaage 3060  
tgctgatgag cgtgtacagc agcggcaacg aggacggcag attcacagcc cagctgaaca 3120  
gagccagcca gtacatcagc ctgctgatcc gggatagcaa gctgagcgt agcggcacct 3180  
acctgtgcgt ggtaacctg ctgtctaatc aaggcggcaa gctgatcttc ggccagggca 3240  
cagagctgag cgtgaagccc aacattcaga accccgatcc tgccgtgtac cagctgagag 3300  
acagcaagag cagcgacaag agcgtgtgcc tgttcaccga cttegacagc cagaccaacg 3360  
tgtcccagag caaggacagc gacgtgtaca tcaccgataa gaccgtgctg gacatgcgga 3420  
gcatggactt caagagcaac agcggcgtgg cctgggtccaa caagagcgt ttcgcctgcg 3480  
ccaacgcctt caacaacagc attatccccg aggacacatt ctteccaagt cctgagagca 3540  
gctgcgacgt gaagctgggtg gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg aacttccaga 3600  
acctgtccgt gatcggcttc cggatcctgc tgctgaaagt ggccggcttc aacctctga 3660  
tgacctgag actgtggtcc agctaacctc gactgtgcct tetagttgcc agccatctgt 3720  
tgtttgcccc tccccctgc cttecttgac cctggaaggt gccactcca ctgtccttc 3780  
ctaataaaat gaggaaattg catcgcattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg 3840  
tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga 3900  
tgcggtgggc tctatggctt ctgaggcggga aagaaccagc tggggctcta ggggtatcc 3960  
ccactagtcg tgtaccagct gagagactct aatccagtg acaagtctgt ctgcctatc 4020  
accgattttg attctcaaac aatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca 4080  
gacaaaactg tgctagacat gaggtctatg gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg 4140  
agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac 4200  
accttcttcc ccagcccagg taagggcagc tttggtgcct tcgcaggctg tttccttgct 4260

tcaggaatgg ccaggttctg cccagagctc tggatcaatga tgtctaaaac tcctctgatt 4320  
 ggtggtctcg gccttatcca ttgccaccaa aacctcttt ttactaagaa acagtgagcc 4380  
 ttgttctggc agtccagaga atgacacggg aaaaaagcag atgaagagaa ggtggcagga 4440  
 gagggcacgt ggcccagcct cagtctctag atctaggaac ccctagtgat ggagttggcc 4500  
 actccctctc tgcgcgctcg ctgcctcact gaggccgccc gggcaaagcc cgggcgctcg 4560  
 gcgacctttg gtcgcccggc ctcaagtgagc gagcagcgc gcagagaggg agtggccaag 4620  
 aattctctgg ccgtcgtttt acaacg 4646

<210> 630  
 <211> 3448  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 630  
 ttggcactc cctctctgcg cgtcgcctcg ctcaactgagg ccgggcgacc aaaggctgcc 60  
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcagc gagcgcgag agagggagtg 120  
 gccactcca tcaactagggg ttccctagatc ttgccaacat accataaacc tcccattctg 180  
 ctaatgcca gcctaagttg gggagaccac tccagattcc aagatgtaca gtttgccttg 240  
 ctgggccttt ttcccatgcc tgcctttact ctgccagagt tatattgctg gggttttgaa 300  
 gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag tagccctgca ttccaggttt 360  
 ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttcaactg aaatcatggc ctcttggcca 420  
 agattgatag cttgtgcctg tccctgagtc ccagtccatc acgagcagct ggtttctaag 480  
 atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca gccccacaga gccccgcct 540  
 tgtccatcac tggcatctgg actccagcct gggttggggc aaagagggaa atgagatcat 600  
 gtcccaacc tgatcctctt gtcccacaga tatccagaac cctgaccctg ccgagggccg 660  
 cggcagcctg ctgacctgcg gcgacgtgga ggagaatccc ggccecatga gcaatcaagt 720  
 cctttgttgt gttgtcctgt gtttccttgg cgcaaatacc gtcgacggcg ggataactca 780  
 gtccccaaa tactcttca gaaaagaagg acaaaacgta acgctttcct gcgagcagaa 840  
 tottaaccac gaagccatgt actggtacag gcaagacct ggacaaggtc ttaggctcat 900

atactactct cagattgtca atgacttcca aaaaggggac atagctgagg gctactctgt 960  
 gtcccgagag aagaaggagt catttcccct gacagtgact tctgcacaaa aaaatcccac 1020  
 tgcattttat ttgtgtgcca gttcaccggg tgcattgtat gagcaatact ttggccccgg 1080  
 cactagactg acagttacgg aggatctgaa aaacgtcttc ccgccagagg tggcagtttt 1140  
 cgagcccagt gaggtgaaa tctctcatac ccaaaaagca acccttgtct gtctcgccac 1200  
 tggattctat cccgaccacg tcgaattgag ctggtgggtc aatgggaaag aggtacatag 1260  
 tggggtctgt acggatccac aacccttaa ggaacaacct gcccttaacg attcacgata 1320  
 ctgcctgtca tcacgactca gggatatctgc taccttttgg cagaaccgga gaaatcactt 1380  
 tcggtgccag gttcagtttt acggacttag cgaaaatgat gaatggacac aagaccgagc 1440  
 aaagcccgtt actcaaatag tgagcgcgga agcctggggg cgagcagact gcggcttcac 1500  
 ctccgaaagt taccagcaag gtgttttgtc agccaccatt ttgtatgaga ttttgttggg 1560  
 gaaggcgaca ctttacgcgg tactggctctc tgccttgggt cttatggcta tggccaagag 1620  
 gaaagattcc aggggtggct ccggtgccac aaacttctcc ctgctcaagc aggccggaga 1680  
 tgtggaagag aaccctggcc ctatgacctc tatecagact gtctttatat ttctctggct 1740  
 tcaacttgat ctggtgaatg gcgaaaacgt ggaacagcac cttcaacgt tgagcgttca 1800  
 ggaaggagat tcagccgtca tcaagtgtac gtattccgat tccgcgtcaa actacttccc 1860  
 gtggtacaaa caggaacttg gcaagcgcgc ccagctcatt atcgacatca gaagcaacgt 1920  
 aggagagaag aaggaccaac gcatagctgt gactctcaac aaaacagcta aacatttctc 1980  
 cctgcacatt acggaaacct aaccagagga ttctgccgta tacttttgtg ctgctactga 2040  
 ggacctcact ttgatctggg gagcgggtac gaagctcata ataaaacctg atatccaaa 2100  
 cccggacceca gcagtttate aattgagaga tagtaagtcc agtgacaaat cagtttgttt 2160  
 gtttacggat ttcgatagcc agaccaatgt cagtcagtca aaggacagtg atgtatacat 2220  
 tacagataaa tgtgtacttg acatgcgctc aatggacttt aagtctaact ctgctgtagc 2280  
 ttggtctaac aaaagtgatt ttgcgtgtgc caacgcattt aacaacagca tcataactga 2340  
 agacacgttc tttccgagtc cagaaagttc ctgtgacgtg aaactttagt aaaagagttt 2400

cgagaccgac actaacctta actttcaaaa cttttcagtg atcggattta gaatcttgct 2460  
 gctcaagggtg gcagggttca atctgctgat gactctgcga ctgtggagtt cataacctcg 2520  
 actgtgcctt ctagttgcca gccatctggt gtttgccct cccccgtgcc ttccctgacc 2580  
 ctggaagggtg ccactcccac tgtcctttcc taataaaatg aggaaattgc atcgcattgt 2640  
 ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat 2700  
 tgggaagaca atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatggettc tgaggcggaa 2760  
 agaaccagct ggggctctag ggggtatccc cactagtcgt gtaccagctg agagactcta 2820  
 aatccagtga caagtctgtc tgcctattca ccgattttga ttctcaaaca aatgtgtcac 2880  
 aaagtaagga ttctgatgtg tatacacag acaaaaactgt gctagacatg aggtctatgg 2940  
 acttcaagag caacagtgtc gtggcctgga gcaacaaatc tgactttgca tgtgcaaacg 3000  
 cttcaacaa cagcattatt ccagaagaca ctttctccc cagcccaggt aagggcagct 3060  
 ttggtgcctt cgcaggctgt ttccctgctt caggaatggc caggttctgc ccagagctct 3120  
 ggtcaatgat gtctaaaact cctctgattg gtggtctcgg cttatccat tgccaccaa 3180  
 accctctttt tactaagaaa cagtgagcct tgttctggca gtccagagaa tgacacggga 3240  
 aaaaagcaga tgaagagaag gtggcaggag agggcacgtg gccagcctc agtctctaga 3300  
 tctaggaacc cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg 3360  
 aggccgcccg ggcaaagccc gggcgctcggg cgacctttgg tcgcccggcc tcagtgagcg 3420  
 agcgagcgcg cagagaggga gtggccaa 3448

<210> 631  
 <211> 3478  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 631  
 ttggcactc cctctctgcg cgctcctcgc ctactgagg ccgggcgacc aaaggctgcc 60  
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcagc gagcgcgcag agagggagtg 120  
 gccactcca tctactagggg ttctagatc ttgccaat accataaacc tccattctg 180

ctaatgcca gcctaagttg gggagaccac tccagattcc aagatgtaca gtttgctttg	240
ctgggccttt ttcccatgcc tgcctttact ctgccagagt tatattgctg gggttttgaa	300
gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag tagccctgca tttcaggttt	360
ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttccactg aaatcatggc ctcttgcca	420
agattgatag cttgtgcctg tccctgagtc ccagtccatc acgagcagct ggtttctaag	480
atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca gccccacaga gccccgcct	540
tgtccatcac tggcatctgg actccagcct gggttggggc aaagaggga atgagatcat	600
gtcctaacce tgatcctett gtcccacaga taccagaac cctgaccctg ccgagggccg	660
cggcagcctg ctgacctgcg gcgacgtgga ggagaatccc ggccccatgg gatgtagact	720
tctgtgttgc gccgtgctgt gtctgcttgg agctggcgaa ctggtgccta tggaaaccgg	780
cgtgaccag acacctagac acctggtcat gggcatgaca aacaagaaaa gcctgaagtg	840
cgagcagcac ctgggccaca atgccatgta ctggtacaag cagagcgcca agaaaccct	900
ggaactgatg ttcgtgtaca gcctggaaga gagggtcgag aacaacagcg tgcccagcag	960
attcagccct gaggcccta atagcagcca cctgtttctg catctgcaca cctgcagcc	1020
tgaggactct gccctgtatc tgtgtgccag cagccaggac tacctggtgt ccaacgagaa	1080
gctgttcttc ggcagcggca cacagctgag cgtgctggaa gatctgaaga acgtgttccc	1140
acctgaggtg gccgtgttcg agccttctga ggccgagatc agccacacac agaaagccac	1200
actcgtgtgt ctggccaccg gcttctatcc cgatcacgtg gaactgtctt ggtgggtcaa	1260
cggcaaagag gtgcacagcg gcgtcagcac cgatcctcag cctctgaaag agcagcccgc	1320
tctgaacgac agcagatact gcctgagcag cagactgaga gtgtccgcca ccttctggca	1380
gaaccccaga aaccacttca gatgccaggt gcagttctac ggccctgagcg agaacgatga	1440
gtggaccag gatagagcca agcctgtgac acagatcgtg tctgccgaag cctggggcag	1500
agccgattgt ggctttacca gcgagagcta ccagcagggc gtgctgtctg ccacaatcct	1560
gtacgagatc ctgctgggaa aagccactct gtaecgtgtg ctggtgtccg ctctggtgct	1620
gatggccatg gtcaagcggg aggatagcag gggcggctcc ggtgccacaa acttctcct	1680

gctcaagcag gccggagatg tggaagagaa ccctggccct atgatcagcc tgagagtgt 1740  
 gctggtcate ctgtggctgc agctgtcttg ggtctggctc cagcggaaag aggtggaaca 1800  
 ggaccccgga cctttcaatg tgccatgaagg cgccaccgtg gccttcaact gcacctacag 1860  
 caatagcgcc agccagagct tcttctggta cagacaggac tgccggaaag aaccaagct 1920  
 gctgatgagc gtgtacagca gcggcaacga ggacggcaga ttcacagccc agctgaacag 1980  
 agccagccag tacatcagcc tgctgatccg ggatagcaag ctgagcgata gcgccaccta 2040  
 cctgtgcgtg gtcaacctgc tgtctaatca aggcggcaag ctgatcttcg gccagggcac 2100  
 agagctgagc gtgaagccca acattcagaa ccccgatcct gccgtgtacc agctgagaga 2160  
 cagcaagagc agcgacaaga gcgtgtgcct gttcaccgac ttcgacagcc agaccaacgt 2220  
 gtcccagagc aaggacagcg acgtgtacat caccgataag accgtgctgg acatgcggag 2280  
 catggacttc aagagcaaca gcgccgtggc ctgggtccaac aagagcgatt tcgcctgcgc 2340  
 caacgccttc aacaacagca ttatccccga ggacacattc ttcccagtc ctgagagcag 2400  
 ctgcgacgtg aagctgggtg aaaagagctt cgagacagac accaacctga acttccagaa 2460  
 cctgtccgtg atcggcttcc ggatcctgct gctgaaagtg gccggcttca acctcctgat 2520  
 gaccctgaga ctgtgggtcca gtaacctcg actgtgcctt ctagttagcca gccatctgtt 2580  
 gtttgccect ccccgctgcc ttctttgacc ctggaaggtg ccactcccac tgtcctttcc 2640  
 taataaaatg aggaaattgc atcgattgt ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt 2700  
 ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat 2760  
 gcggtgggct ctatggcttc tgaggcggaa agaaccagct ggggctctag ggggtatccc 2820  
 cactagtcgt gtaccagctg agagacteta aatccagtga caagtctgtc tgccattca 2880  
 ccgattttga ttctcaaca aatgtgtcac aaagtaagga ttctgatgtg tataacacag 2940  
 acaaaactgt gctagacatg aggtctatgg acttcaagag caacagtgtc gtggcctgga 3000  
 gcaacaatc tgactttgca tgtgcaaacg cttcaacaa cagcattatt ccagaagaca 3060  
 ccttcttccc cagcccaggt aagggcagct ttgggtgcctt cgcaggetgt ttctttgctt 3120  
 caggaatggc caggttctgc ccagagctct ggtcaatgat gtctaaaact cctctgattg 3180

gtggctcgg ccttatccat tgccacaaa accctctttt tactaagaaa cagtgagcct 3240  
 tgttctggca gtccagagaa tgacacggga aaaaagcaga tgaagagaag gtggcaggag 3300  
 agggcacgtg gccagcctc agtctctaga tctaggaacc cctagtgatg gagttggcca 3360  
 ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg 3420  
 cgacctttgg tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagagaggga gtggccaa 3478

<210> 632  
 <211> 3466  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 632  
 ttggcactc cctctctgcg cgctcgtcgc ctcaactgagg ccgggcgacc aaaggtcgc 60  
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcagc gagcgcgag agagggagtg 120  
 gccaaactca tcaactaggg ttctagatc ttgccaacat accataaacc tccattctg 180  
 ctaatgcca gcctaagttg gggagaccac tccagattcc aagatgtaca gtttgctttg 240  
 ctgggccttt ttccatgcc tcctttact ctgccagagt tatattgctg gggttttgaa 300  
 gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag tagccctgca tttcaggttt 360  
 ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttcaactg aaatcatggc ctcttggcca 420  
 agattgatag cttgtgcctg tcctgagtc ccagtccatc acgagcagct ggtttctaag 480  
 atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca gcccacaga gcccgcct 540  
 tgtccatcac tggcatctgg actccagcct gggttggggc aaagagggaa atgagatcat 600  
 gtccaaacc tgatcctctt gtcccacaga tatccagaac cctgacctg ccgagggccg 660  
 cggcagcctg ctgacctgcg gcgacgtgga ggagaatccc ggccccatgg gatcttggac 720  
 actgtgttgc gtgtccctgt gcatcctggt ggccaagcac acagatgccg gcgtgatcca 780  
 gtctcctaga cacgaagtga ccgagatggg ccaagaagtg accctgcgct gcaagcctat 840  
 cagcggccac gattacctgt tctggtacag acagaccatg atgagaggcc tggaactgct 900  
 gatctacttc aacaacaacg tgcccatega cgacagcggc atgcccagg atagattcag 960  
 cgccaagatg cccaacgcca gcttcagcac cctgaagatc cagcctagcg agcccagaga 1020

tagcgccgtg taattctgcg ccagcagaaa gacaggcggc tacagcaatc agccccagca	1080
ctttggagat ggcacccggc tgagcctcct ggaagatctg aagaacgtgt tcccacctga	1140
ggtggccgtg ttcgagcctt ctgaggccga gatcagccac acacagaaaag ccacactcgt	1200
gtgtctggcc accggcttct atcccgatca cgtggaactg tcttgggtggg tcaacggcaa	1260
agaggtgcac agcggcgtea gcaccgatcc tcagcctctg aaagagcagc ccgctctgaa	1320
cgacagcaga tactgcctga gcagcagact gagagtgtcc gccaccttct ggcagaacct	1380
cagaaaccac ttcagatgcc aggtgcagtt ctacggcctg agcgagaacg atgagtggac	1440
ccaggataga gccaaagcctg tgacacagat cgtgtctgcc gaagcctggg gcagagccga	1500
ttgtggcttt accagcgaga gctaccagca gggcgtgctg tctgccacaa tctgtacga	1560
gatcctgctg ggcaaagcca ctctgtacgc cgtgctgggtg tctgccctgg tgctgatggc	1620
catggtcaag cggaaggata gcaggggagg ctccgggtgcc acaaacttct ccctgctcaa	1680
gcaggccgga gatgtggaag agaaccctgg ccctatggaa accctgctga aggtgctgag	1740
cggcacactg ctgtggcagc tgacatgggt ccgatctcag cagcctgtgc agtctctca	1800
ggccgtgatt ctgagagaag gcgaggacgc cgtgatcaac tgcagcagct ctaaggccct	1860
gtacagcgtg cactggtaca gacagaagca cggcgaggcc cctgtgttcc tgatgatcct	1920
gctgaaaggc ggcgagcaga agggccacga gaagatcagc gccagcttca acgagaagaa	1980
gcagcagtc cagcctgtacc tgacagccag ccagctgagc tacagcggca cctacttttg	2040
tggcaccgcc tggatcaacg actacaagct gtctttcggg gccggcacca cagtgacagt	2100
gcgggccaat attcagaacc ccgatcctgc cgtgtaccag ctgagagaca gcaagagcag	2160
cgacaagagc gtgtgcctgt tcaccgactt cgacagccag accaacgtgt cccagagcaa	2220
ggacagcgac gtgtacatca ccgataagac tgtgctggac atgcggagca tggacttcaa	2280
gagcaacagc gccgtggcct ggtccaacaa gagegatttc gcctgcgcca acgccttcaa	2340
caacagcatt atccccgagg acacattctt cccaagtctt gagagcagct gcgacgtgaa	2400
gctgggtgaa aagagcttcg agacagacac caacctgaac ttccagaacc tgagcgtgat	2460
cggttcaga atcctgctgc tcaaggtggc cggttcacac ctgctgatga ccctgagact	2520

gtggtccagc taacctcgac tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc 2580  
cccgtgcctt ccttgacctt ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag 2640  
gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tggggggtgg ggtggggcag 2700  
gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct 2760  
atggcttctg aggcggaaag aaccagctgg ggctctaggg ggtatcccca ctagtcgtgt 2820  
accagctgag agactctaaa tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc gattttgatt 2880  
ctcaaacaaa tgtgtcacia agtaaggatt ctgatgtgta taccacagac aaaactgtgc 2940  
tagacatgag gtctatggac ttcaagagca acagtgtctg ggccctggagc aacaaatctg 3000  
actttgcatg tgcaaacgcc ttcaacaaca gcattattcc agaagacacc ttcttcccca 3060  
gcccaggtaa gggcagcttt ggtgccttcg caggctgttt ccttgcttca ggaatggcca 3120  
ggttctgccc agagctctgg tcaatgatgt ctaaaactcc tctgatttgt ggtctcggcc 3180  
ttatccattg ccacaaaac cctcttttta ctaagaaaca gtgagccttg ttctggcagt 3240  
ccagagaatg acacgggaaa aaagcagatg aagagaaggt ggcaggagag ggcacgtggc 3300  
ccagcctcag tctctagatc taggaacccc tagtgatgga gttggccact ccctctctgc 3360  
gcgctcgtc gctcactgag gccgcccggg caaagcccgg gcgtcgggcg acctttggtc 3420  
gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gagagggagt ggccaa 3466

## 【發明申請專利範圍】

### 【第1項】

一種改變TRBC1及/或TRBC2基因內之DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；或

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

### 【第2項】

一種改變DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 包含關於SEQ ID NO：1-89及179-184之表1及/或3中任一者中所列舉之基因組座標之15個連續核苷酸±10個核苷酸的序列；

ii. 來自(i)之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自(i)之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、

93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

### 【第3項】

一種降低TRBC1及/或TRBC2基因之表現之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

a. 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；或

b. 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

### 【第4項】

一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞及/或同種異體細胞投與組合物，其中該組合物包含：

a. 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

- ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；或
- b. 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況
- c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【第5項】**

一種改變TRAC基因內之DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

- a. 包含選自以下之序列的引導RNA：
  - i. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；
  - ii. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii. 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID NO：90-113、185及213-218中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列；或
- b. 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【第6項】**

一種改變DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 包含關於SEQ ID NO：90-218之表2及/或3中任一者中所列舉之基因組座標之15個連續核苷酸±10個核苷酸的序列；

ii. 來自(i)之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自(i)之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【第7項】**

一種降低TRAC基因之表現之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

a. 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一

致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID NO：90-113、185及213-218中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列；或

b. 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

### 【第8項】

一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞及/或同種異體細胞投與組合物，其中該組合物包含：

a. 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID NO：90-113、185及213-218中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列；或

b. 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況

c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【第9項】**

一種改變TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之DNA序列之方法，其包含向細胞遞送第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；及

其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

vi. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；

vii. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

viii. 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

ix. 包含SEQ ID NO：90-113、185及213-218中任一者之引導序列；及

x. 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列。

**【第10項】**

一種降低TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現之方法，其包含向細胞遞送第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

- i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；
  - ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；及
- 其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

- i. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；
- ii. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
- iii. 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
- iv. 包含SEQ ID NO：90-113、185及213-218中任一者之引導序列；及
- v. 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列。

### 【第11項】

一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞或同種異體細胞投

與組合物，其中該組合物包含：第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

- i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；
  - ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；及
- 其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

- vi. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；
- vii. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
- viii. 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
- ix. 包含SEQ ID NO：90-113、185及213-218中任一者之引導序列；及
- x. 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列。

### 【第12項】

一種經由在TRAC基因座之基因座內插入而表現異源免疫受體之方法，其包含向細胞遞送第一引導RNA、第二引導RNA，及經RNA引導之

DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID NO：1、2、3、5、6中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID NO：2、3、5、6中任一者之引導序列；及

其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

vi. 選自SEQ ID NO：90、95、97、98、185、214、218之引導序列；

vii. 選自SEQ ID NO：90、95、97、98、185、214及218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

viii. 與選自SEQ ID NO：90、95、97、98、185、214及218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

ix. 包含SEQ ID NO：90、95、97、185及214中任一者之引導序列；

x. 包含SEQ ID NO：90、95及185中任一者之引導序列；及

xi. 包含SEQ ID NO：90或214之引導序列。

### 【第13項】

如請求項9至12中任一項之方法，其中該第一引導RNA包含SEQ ID

NO. 2之序列且該第二引導RNA包含SEQ ID NO. 90之序列。

**【第14項】**

如請求項9至12中任一項之方法，其中該第一引導RNA包含SEQ ID NO. 180之序列且該第二引導RNA包含SEQ ID NO. 186之序列。

**【第15項】**

如請求項9至12中任一項之方法，其中該第一引導RNA包含SEQ ID NO：1、2、3、5、6中任一者之序列，且該第二引導RNA包含SEQ ID NO. 90之序列。

**【第16項】**

如請求項9至12中任一項之方法，其中該第一引導RNA包含SEQ ID NO：1、2、3、5、6中任一者之序列且該第二引導RNA包含SEQ ID NO. 214之序列。

**【第17項】**

如請求項9至16中任一項之方法，其中該第一引導RNA、該第二引導RNA及該經RNA引導之DNA結合劑，或該編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸基本上同一時間投與。

**【第18項】**

如請求項9至17中任一項之方法，其中同時改變該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之DNA序列。

**【第19項】**

如請求項1至18中任一項之方法，其中引入經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【第20項】**

如請求項1至19中任一項之方法，其進一步包含：

- a. 誘導細胞及/或個體中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之雙股斷裂(DSB)；或
- b. 誘導細胞及/或個體中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之單股斷裂(SSB)；或
- c. 降低細胞及/或個體中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現。

**【第21項】**

如請求項1至20中任一項之方法，其進一步包含引入編碼所關注多肽之核酸序列，視情況其中：

- a. 一或多種所關注多肽包含受體；
- b. 一或多種所關注多肽包含免疫受體；
- c. 一或多種所關注多肽包含T細胞受體，另外視情況，其中該T細胞受體識別癌症抗原；
- d. 一或多種所關注多肽包含WT1特異性T細胞受體，其中該T細胞受體識別WT1或其片段；
- e. 一或多種所關注多肽包含嵌合抗原受體，另外視情況，其中該嵌合抗原受體識別癌症抗原；或
- f. 一或多種所關注多肽包含WT1特異性嵌合抗原受體，其中該嵌合抗原受體識別WT1或其片段。

**【第22項】**

如請求項1至20中任一項之方法，其進一步包含：

- a. 引入TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈；

- b. 引入一或多種編碼TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈之核酸序列；
- c. 引入WT1特異性TCR  $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈；
- d. 引入一或多種編碼WT1特異性TCR  $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈之核酸序列；
- e. 引入選自以下之第一TCR序列：(i) SEQ ID NO. 501或504；(ii)與SEQ ID NO. 501或504至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之胺基酸序列；及(iii) SEQ ID NO. 501或504之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或250個胺基酸之連續子序列，

及

引入選自以下之第二TCR序列：(i) SEQ ID NO. 502或505；(ii)與SEQ ID NO. 502或505至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之胺基酸序列；及(iii) SEQ ID NO. 502或505之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或300個胺基酸之連續子序列，

- f. 引入選自以下之第一TCR序列：(i) SEQ ID NO. 501或513；(ii)與SEQ ID NO. 510或513至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之胺基酸序列；及(iii) SEQ ID NO. 510或513之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或250個胺基酸之連續子序列，

及

引入選自以下之第二TCR序列：(i) SEQ ID NO. 511或514；(ii)與SEQ ID NO. 511或514至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之胺基酸序列；及(iii) SEQ ID NO. 511或514之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或300個胺基酸之連續子序列，

- g. 引入包含編碼(e)或(f)之第一TCR序列之序列的核酸序列；
- h. 引入包含編碼(e)或(f)之第二TCR序列之序列的核酸序列；
- i. 引入包含(g)及(h)之核酸序列之核酸序列；
- j. 引入選自SEQ ID NO：500、503、506、509、512、515、518或521或與其至少99%、95%、90%一致之胺基酸序列之多肽，視情況藉由引入編碼其之核酸序列；
- k. 引入選自以下(i)至(vii)或與其至少99%、95%、90%一致之胺基酸序列之TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈多肽：
  - i) SEQ ID NO.：501及SEQ ID NO.:502；
  - ii) SEQ ID NO.：504及SEQ ID NO.:505；
  - iii) SEQ ID NO.：507及SEQ ID NO.:508；
  - iv) SEQ ID NO.：510及SEQ ID NO.:511；
  - v) SEQ ID NO.：513及SEQ ID NO.:514；
  - vi) SEQ ID NO.：516及SEQ ID NO.:517；
  - vii) SEQ ID NO.：519及SEQ ID NO.:520；
- 1. 引入編碼(k)之TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈多肽之核酸序列。

**【第23項】**

如請求項22之方法，其中該第一核酸序列側接與第一目標基因座同源之序列。

**【第24項】**

如請求項22之方法，其中該第二核酸序列側接與第二目標基因座同源之序列。

**【第25項】**

如請求項23至24中任一項之方法，其中該第一目標基因座為該TRAC、TRBC1或TRBC2基因，例如該TRAC基因。

**【第26項】**

如請求項24至25中任一項之方法，其中該第二目標基因座為該TRAC、TRBC1或TRBC2基因，例如該等TRBC1或TRBC2基因。

**【第27項】**

如請求項23至26中任一項之方法，其中側接序列之長度為至少17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35或40個核苷酸。

**【第28項】**

如請求項22至27中任一項之方法，其中該引入之核酸序列或該第一核酸序列及該第二核酸序列不包含啟動子。

**【第29項】**

如請求項22至27中任一項之方法，其中該引入之核酸序列或該第一核酸序列及該第二核酸序列可操作地連接至啟動子，視情況其中該啟動子為EF-1 $\alpha$ 啟動子(例如SEQ ID NO：603)。

**【第30項】**

如請求項22至29中任一項之方法，其中該引入之核酸序列或該第一核酸序列及該第二核酸序列係經由載體、經由轉染、經由脂質奈米粒子或經由顯微注射引入。

**【第31項】**

如請求項30之方法，其中該載體為病毒載體，另外視情況，其中該病毒載體為腺相關病毒載體。

**【第32項】**

一種TCR (諸如WT1特異性TCR)之基因座內插入方法，其包含向細胞遞送(i)用於插入該TCR之第一引導RNA，其包含選自以下之引導序列：SEQ ID NO：90、95、97、98、185、214及218，(ii)經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸；及(iii)編碼TCR (諸如WT1特異性TCR)之供體核酸分子。

**【第33項】**

如請求項32之方法，其進一步包含遞送包含選自SEQ ID NO：1-89之序列的第二引導RNA。

**【第34項】**

如請求項33之方法，其中該第二引導RNA包含選自SEQ ID NO：179-184之序列。

**【第35項】**

如請求項32至34中任一項之方法，其中該TCR為WT1特異性TCR，其包含：

(a) 選自SEQ ID NO：500、503、506、509、512、515、518或521或與其至少99%、95%、90%一致之胺基酸序列之多肽；或

(b) 選自以下(i)至(viii)或與其至少99%、95%、90%一致之胺基酸序列之TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈多肽：

i) SEQ ID NO：501及SEQ ID NO:502；

ii) SEQ ID NO：504及SEQ ID NO:505；

iii) SEQ ID NO：507及SEQ ID NO:508；

iv) SEQ ID NO：510及SEQ ID NO:511；

v) SEQ ID NO：513及SEQ ID NO:514；

- vi) SEQ ID NO : 516及SEQ ID NO:517 ;
- vii) SEQ ID NO : 519及SEQ ID NO:520 ;
- viii) SEQ ID NO : 522及SEQ ID NO:523 。

**【第36項】**

一種組合物，其包含：

a. 引導RNA，其包含

i. 選自SEQ ID NO : 1-89之引導序列；或

ii. 選自SEQ ID NO : 1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；或

iii. 與選自SEQ ID NO : 1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；或

iv. 包含SEQ ID NO : 1-24中任一者之引導序列；或

v. 包含SEQ ID NO : 1-6中任一者之引導序列；及視情況

b. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【第37項】**

如請求項36之組合物，其係用於改變細胞中該等TRBC1及/或TRBC2基因內之DNA序列。

**【第38項】**

如請求項36或37之組合物，其係用於降低細胞中該等TRBC1及/或TRBC2基因之表現。

**【第39項】**

如請求項36至38中任一項之組合物，其中該引導RNA包含選自SEQ

ID NO 196-200中任一者之序列。

**【第40項】**

一種組合物，其包含：

a. 引導RNA，其包含

i. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；或

ii. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、

18、19或20個連續核苷酸；或

iii. 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；或

iv. 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；或

v. 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列；及視情況

b. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【第41項】**

如請求項40之組合物，其係用於改變細胞中該TRAC基因內之DNA序列。

**【第42項】**

如請求項40或41之組合物，其係用於降低細胞中該TRAC基因之表現。

**【第43項】**

如請求項40至42中任一項之組合物，其中該引導RNA包含選自SEQ ID NO 185-192及201-212中任一者之序列。

**【第44項】**

一種細胞，其係藉由如請求項1至43中任一項之方法改變。

**【第45項】**

如請求項44之細胞，其中該細胞經離體(ex vivo)改變。

**【第46項】**

如請求項44或45之細胞，其中該細胞為T細胞。

**【第47項】**

如請求項44至46中任一項之細胞，其中該細胞為CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及/或CD8<sup>+</sup> T細胞。

**【第48項】**

如請求項44至47中任一項之細胞，其中該細胞為哺乳動物細胞、靈長類動物細胞或人類細胞。

**【第49項】**

如請求項44至48中任一項之細胞，其缺乏內源性T細胞受體，該細胞用於製備表現非內源性T細胞受體之T細胞。

**【第50項】**

如請求項44至48中任一項之細胞，其缺乏內源性T細胞受體，該細胞用於製備表現CAR之T細胞。

**【第51項】**

如請求項44至50中任一項之細胞，其中經改變之細胞為CD3<sup>-</sup>細胞。

**【第52項】**

如請求項44至51中任一項之細胞，其中該細胞在改變之前為CD3<sup>+</sup>細胞，且經改變之細胞為CD3<sup>-</sup>細胞。

**【第53項】**

如請求項44至52中任一項之細胞，其另外包含一或多種編碼所關注多肽之核酸序列，視情況其中：

- a. 一或多種所關注多肽包含受體；
- b. 一或多種所關注多肽包含免疫受體；
- c. 一或多種所關注多肽包含T細胞受體，另外視情況，其中該T細胞受體對WT1具有特異性；或
- d. 一或多種所關注多肽包含嵌合抗原受體，另外視情況，其中該嵌合抗原受體對WT1具有特異性。

**【第54項】**

如請求項44至53中任一項之細胞，其另外包含一或多種編碼外源性T細胞受體之 $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈之核酸序列。

**【第55項】**

如請求項54之細胞，其中該一或多種編碼該外源性T細胞受體之 $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈之核酸序列係於該基因組之TRAC基因座中。

**【第56項】**

如請求項44至55中任一項之細胞，其另外包含一或多種編碼外源性T細胞受體之 $\gamma$ 及 $\delta$ 鏈之核酸序列。

**【第57項】**

如請求項56之細胞，其中該一或多種編碼該外源性T細胞受體之 $\gamma$ 及 $\delta$ 鏈之核酸序列係於該基因組之TRAC基因座中。

**【第58項】**

如請求項54至57中任一項之細胞，其中該TCR  $\alpha$ 鏈之序列係選自：

(i) SEQ ID NO : 501或504 ; (ii)與SEQ ID NO : 501或504至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之序列 ; 及SEQ ID NO : 501或504之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或250個胺基酸之連續子序列 ; 及

其中該TCR  $\beta$ 鏈之序列係選自 : (i) SEQ ID NO : 502或505 ; (ii)與SEQ ID NO : 502或505至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之序列 ; 及SEQ ID NO : 502或505之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或300個胺基酸之連續子序列。

**【第59項】**

如請求項54至58中任一項之細胞，其中該TCR  $\alpha$ 鏈係由根據SEQ ID NO : 500、501、503及504中任一者之核酸序列編碼，且該 $\beta$  TCR鏈係根據SEQ ID NO : 500、502、503及505中任一者編碼。

**【第60項】**

如請求項54至59中任一項之細胞，其中該TCR  $\alpha$ 鏈之序列係選自 : (i) SEQ ID NO : 513 ; (ii)與SEQ ID NO : 513至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之序列 ; 及SEQ ID NO : 513之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或250個胺基酸之連續子序列 ; 及

其中該TCR  $\beta$ 鏈之核酸序列係選自 : (i) SEQ ID NO:514 ; (ii)與SEQ ID NO : 514至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之序列 ; 及SEQ ID NO : 514之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或300個胺基酸之連續子序列。

**【第61項】**

如請求項54至60中任一項之細胞，其中該 $\alpha$  TCR鏈為SEQ ID NO：513且該 $\beta$  TCR鏈為SEQ ID NO：514。

**【第62項】**

如請求項44至61中任一項之細胞，其中該一或多種基因係由內源性啟動子表現。

**【第63項】**

如請求項44至62中任一項之細胞，其中該一或多種基因係由異源啟動子表現，視情況其中該異源啟動子為EF-1 $\alpha$ 啟動子。

**【第64項】**

一種細胞群體，其包含如請求項44至63中任一項之細胞，其中經改變之群體之大於約50%、大於約55%、大於約60%、大於約65%、大於約70%、大於約75%、大於約80%、大於約85%、大於約90%、大於約95%、大於約98%或大於約99%為CD3<sup>-</sup>細胞。

**【第65項】**

如請求項64之群體，其中該群體之大於約90%為CD3<sup>-</sup>。

**【第66項】**

如請求項64之群體，其中該群體之大於約95%為CD3<sup>-</sup>。

**【第67項】**

如請求項64之群體，其中該群體之大於約99%為CD3<sup>-</sup>。

**【第68項】**

一種細胞群體，其包含如請求項44至63中任一項之細胞，其中該群體之大於約50%、大於約55%、大於約60%、大於約65%、大於約70%、大於約75%、大於約80%、大於約85%、大於約90%、大於約95%、大於

約98%或大於約99%缺乏內源性T細胞受體。

**【第69項】**

如請求項68之群體，其中該群體之大於約90%缺乏內源性T細胞受體。

**【第70項】**

如請求項68之群體，其中該群體之大於約95%缺乏內源性T細胞受體。

**【第71項】**

如請求項68之群體，其中該群體之大於約99%缺乏內源性T細胞受體。

**【第72項】**

一種細胞群體，其包含如請求項44至63中任一項之細胞，其中在該群體中TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現相對於未經改變之相同細胞群體已降低至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約98%或至少約99%。

**【第73項】**

如請求項72之群體，其中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現降低係至少約90%。

**【第74項】**

如請求項72之群體，其中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現降低係至少約95%。

**【第75項】**

如請求項72之群體，其中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現降低係至少約99%。

**【第76項】**

如請求項64至75中任一項之群體，其中該降低係該TRBC1基因之表現降低。

**【第77項】**

如請求項64至76中任一項之群體，其中該降低係該TRBC2基因之表現降低。

**【第78項】**

如請求項64至77中任一項之群體，其中該降低係該TRAC基因之表現降低。

**【第79項】**

一種細胞群體，其包含如請求項44至78中任一項之細胞，其中該群體之10%與100%之間，例如該群體之30%與99%之間，在該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中具有插入或缺失(indel)。

**【第80項】**

如請求項79之群體，其中該群體之30%與35%之間、35%與40%之間、40%與45%之間、45%與50%之間、50%與55%之間、55%與60%之間、60%與65%之間、65%與70%之間、70%與75%之間、75%與80%之間、80%與85%之間、85%與90%之間、90%與95%之間，或95%與99%之間，在該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中具有插入或缺失。

**【第81項】**

如請求項76或79之群體，其中該插入或缺失或插入係於該TRBC1基

因中。

**【第82項】**

如請求項77或79之群體，其中該插入或缺失或插入係於該TRBC2基因中。

**【第83項】**

如請求項78或79之群體，其中該插入或缺失或插入係於該TRAC基因中。

**【第84項】**

如請求項1至4或9至43中任一項之方法或組合物，其中該組合物造成該等TRBC1及/或TRBC2基因編輯。

**【第85項】**

如請求項4至43中任一項之方法或組合物，其中該組合物造成該TRAC基因編輯。

**【第86項】**

如請求項9至43中任一項之方法或組合物，其中該組合物造成一個TRBC基因及該TRAC基因編輯。

**【第87項】**

如請求項79至86中任一項之方法或組合物，其中該編輯計算為經編輯之群體之百分比(編輯百分比或插入或缺失百分比)。

**【第88項】**

如請求項84至87中任一項之方法或組合物，其中該編輯百分比係在該群體之30%與35%之間、35%與40%之間、40%與45%之間、45%與50%之間、50%與55%之間、55%與60%之間、60%與65%之間、65%與

70%之間、70%與75%之間、75%與80%之間、80%與85%之間、85%與90%之間、90%與95%之間，或95%與99%之間。

**【第89項】**

如請求項4至43中任一項之方法或組合物，其中該組合物包含sgRNA，該sgRNA包含：

- a. SEQ ID NO：179-184及196-200中之任一者；或
- b. 選自SEQ ID NO：1-89中任一者之引導序列；或
- c. 選自SEQ ID NO：1-24之引導序列；或
- d. 選自SEQ ID NO：1-6之引導序列。

**【第90項】**

如請求項4至43中任一項之方法或組合物，其中該組合物包含sgRNA，該sgRNA包含：

- a. SEQ ID NO：186-192及201-212中之任一者；或
- b. 選自SEQ ID NO：90-178及213-218中任一者之引導序列；或
- c. 選自SEQ ID NO：90-113及213-218之引導序列；或
- d. 選自SEQ ID NO：90-95之引導序列。

**【第91項】**

如請求項1至43中任一項之方法或組合物，其中該目標序列係於該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子1、2、3或4中。

**【第92項】**

如請求項91之方法或組合物，其中該目標序列係於該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子1中。

**【第93項】**

如請求項91之方法或組合物，其中該目標序列係於該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子2中。

**【第94項】**

如請求項91之方法或組合物，其中該目標序列係於該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子3中。

**【第95項】**

如請求項91之方法或組合物，其中該目標序列係於該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子4中。

**【第96項】**

如請求項91至95中任一項之方法或組合物，其中該目標序列係於人類TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中。

**【第97項】**

如請求項1至43中任一項之方法或組合物，其中該引導序列與TRBC1、TRBC2及/或TRAC之正股中之目標序列互補。

**【第98項】**

如請求項1至43中任一項之方法或組合物，其中該引導序列與該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之負股中之目標序列互補。

**【第99項】**

如請求項1至43及84至98中任一項之方法或組合物，其中該第一引導序列與該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之正股中之第一目標序列互補，且其中該組合物進一步包含第二引導序列，其與該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之負股中之第二目標序列互補。

**【第100項】**

如請求項1至43及84至98中任一項之方法或組合物，其中該引導RNA包含選自SEQ ID NO 1-178中任一者之引導序列，且進一步包含SEQ ID NO：400之核苷酸序列，其中SEQ ID NO：400之核苷酸位於該引導序列之3'端之後。

**【第101項】**

如請求項1至43或84至98中任一項之方法或組合物，其中該引導RNA包含選自SEQ ID NO 1-178中任一者之引導序列，且進一步包含SEQ ID NO：401之核苷酸序列，其中SEQ ID NO：401之核苷酸位於該引導序列之3'端之後。

**【第102項】**

如請求項1至43及84至98中任一項之方法或組合物，其中該引導RNA係根據SEQ ID NO：300之模式修飾，其中該等N集體為SEQ ID NO 1-89之引導序列中之任一者。

**【第103項】**

如請求項102之方法或組合物，其中SEQ ID NO：300中各N為任何天然或非天然核苷酸，其中該等N形成引導序列，且該引導序列使Cas9靶向該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因。

**【第104項】**

如請求項100至103中任一項之方法或組合物，其中該sgRNA包含與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、98%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列。

**【第105項】**

如請求項1至43及84至104中任一項之方法或組合物，其中該引導

RNA包含於病毒載體中。

**【第106項】**

如請求項105之方法或組合物，其中該病毒載體為腺相關病毒(AAV)載體。

**【第107項】**

如請求項105或106之方法或組合物，其中該病毒載體包含SEQ ID NO：613-632中任一者之核酸序列或與其至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之核酸序列。

**【第108項】**

如請求項1至43及84至107中任一項之方法或組合物，其中該引導RNA包含至少一種修飾。

**【第109項】**

如請求項108之方法或組合物，其中該至少一種修飾包括2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾之核苷酸。

**【第110項】**

如請求項108或109之方法或組合物，其在核苷酸之間包含硫代磷酸酯(phosphorothioate)(PS)鍵。

**【第111項】**

如請求項108至110中任一項之方法或組合物，其包含2'-氟(2'-F)修飾之核苷酸。

**【第112項】**

如請求項108至111中任一項之方法或組合物，其包含該引導RNA之5'端之前五個核苷酸中之一或多者處之修飾。

**【第113項】**

如請求項108至112中任一項之方法或組合物，其包含該引導RNA之3'端之後五個核苷酸中之一或多者處之修飾。

**【第114項】**

如請求項108至113中任一項之方法或組合物，其包含該引導RNA之5'端處之前四個核苷酸之間的PS鍵。

**【第115項】**

如請求項108至114中任一項之方法或組合物，其包含該引導RNA之3'端處之後四個核苷酸之間的PS鍵。

**【第116項】**

如請求項108至115中任一項之方法或組合物，其包含該引導RNA之5'端之前三個核苷酸處之2'-O-Me修飾之核苷酸。

**【第117項】**

如請求項108至116中任一項之方法或組合物，其包含該引導RNA之3'端之後三個核苷酸處之2'-O-Me修飾之核苷酸。

**【第118項】**

如請求項108至117中任一項之方法或組合物，其中該引導RNA包含SEQ ID NO：300之經修飾之核苷酸。

**【第119項】**

如請求項108至118中任一項之方法或組合物，其中該組合物進一步包含醫藥學上可接受之賦形劑。

**【第120項】**

如請求項1至43及84至119中任一項之方法或組合物，其中該組合物

進一步包含經RNA引導之DNA結合劑。

**【第121項】**

如請求項1至43及84至120中任一項之方法或組合物，其中該引導RNA及經RNA引導之DNA結合劑組合物包含於核糖核蛋白(RNP)中。

**【第122項】**

如請求項1至43及84至120中任一項之方法或組合物，其中該組合物進一步包含編碼經RNA引導之DNA結合劑的mRNA。

**【第123項】**

如請求項121或122之方法或組合物，其中該經RNA引導之DNA結合劑為Cas9。

**【第124項】**

如請求項123之方法或組合物，其中該經RNA引導之DNA結合劑為Cas9蛋白質。

**【第125項】**

如請求項1至43及84至124中任一項之方法或組合物，其中該組合物為醫藥調配物且進一步包含醫藥學上可接受之載劑。

**【第126項】**

一種如請求項36至125中任一項之組合物、調配物、群體或細胞之用途，其係用於製備藥劑。

**【第127項】**

一種如請求項36至125中任一項之組合物、調配物、群體或細胞之用途，其係用於製備用於治療癌症之藥劑。

**【第128項】**

一種如請求項36至125中任一項之組合物、調配物、群體或細胞之用途，其係用於製備用於個體之免疫療法之藥劑。

**【第129項】**

一種如請求項36至125中任一項之組合物、調配物、群體或細胞之用途，其係用於製備用於治療過度表現威爾姆斯氏(Wilms')腫瘤抗原(WT1)之腫瘤之藥劑。

**【第130項】**

如請求項36至125中任一項之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療疾病或病症。

**【第131項】**

如請求項36至125中任一項之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於免疫療法中。

**【第132項】**

如請求項36至125中任一項之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療癌症。

**【第133項】**

如請求項36至125中任一項之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療過度表現威爾姆斯氏腫瘤抗原(WT1)之腫瘤。

**【第134項】**

一種治療人類或動物之方法，其包含投與如請求項36至125中任一項之組合物、調配物、群體或細胞。

**【第135項】**

一種治療人類或動物之癌症之方法，其包含投與如請求項36至125中

任一項之組合物、調配物、群體或細胞。

**【第136項】**

一種人類或動物之免疫治療方法，其包含投與如請求項36至125中任一項之組合物、調配物、群體或細胞。

**【第137項】**

一種治療人類或動物之過度表現威爾姆斯氏腫瘤抗原(WT1)之腫瘤之方法，其包含投與如請求項36至125中任一項之組合物、調配物、群體或細胞。

**【第138項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：1。

**【第139項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：2。

**【第140項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：3。

**【第141項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-

89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：4。

**【第142項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：5。

**【第143項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：6。

**【第144項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：7。

**【第145項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：8。

**【第146項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：9。

**【第147項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中

任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：10。

**【第148項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：11。

**【第149項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：12。

**【第150項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：13。

**【第151項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：14。

**【第152項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：15。

**【第153項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：16。

**【第154項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：17。

**【第155項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：18。

**【第156項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：19。

**【第157項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：20。

**【第158項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：21。

**【第159項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：22。

**【第160項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：23。

**【第161項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：24。

**【第162項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：25。

**【第163項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：26。

**【第164項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-

89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：27。

**【第165項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：28。

**【第166項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：29。

**【第167項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：30。

**【第168項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：31。

**【第169項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：32。

**【第170項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中

任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：33。

**【第171項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：34。

**【第172項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：35。

**【第173項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：36。

**【第174項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：37。

**【第175項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：38。

**【第176項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：39。

**【第177項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：40。

**【第178項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：41。

**【第179項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：42。

**【第180項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：43。

**【第181項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：44。

**【第182項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：45。

**【第183項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：46。

**【第184項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：47。

**【第185項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：48。

**【第186項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：49。

**【第187項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-

89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：50。

**【第188項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：51。

**【第189項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：52。

**【第190項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：53。

**【第191項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：54。

**【第192項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：55。

**【第193項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中

任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：56。

**【第194項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：57。

**【第195項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：58。

**【第196項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：59。

**【第197項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：60。

**【第198項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：61。

**【第199項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：62。

**【第200項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：63。

**【第201項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：64。

**【第202項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：65。

**【第203項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：66。

**【第204項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：67。

**【第205項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：68。

**【第206項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：69。

**【第207項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：70。

**【第208項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：71。

**【第209項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：72。

**【第210項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-

89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：73。

**【第211項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：74。

**【第212項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：75。

**【第213項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：76。

**【第214項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：77。

**【第215項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：78。

**【第216項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中

任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：79。

**【第217項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：80。

**【第218項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：81。

**【第219項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：82。

**【第220項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：83。

**【第221項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：84。

**【第222項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：85。

**【第223項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：86。

**【第224項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：87。

**【第225項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物、群體或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：88。

**【第226項】**

如請求項1至4、9至39、44至77、79至82、84、86至89或91至137中任一項之方法、用途、組合物或細胞，其中選自SEQ ID NO：1-89之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：89。

**【第227項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：185。

**【第228項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：90。

**【第229項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：91。

**【第230項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：92。

**【第231項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：93。

**【第232項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：94。

**【第233項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-

178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：95。

**【第234項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：96。

**【第235項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：97。

**【第236項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：98。

**【第237項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：99。

**【第238項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：100。

**【第239項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中

任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：101。

**【第240項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：102。

**【第241項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：103。

**【第242項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：104。

**【第243項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：105。

**【第244項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：106。

**【第245項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：107。

**【第246項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：108。

**【第247項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：109。

**【第248項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：110。

**【第249項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：111。

**【第250項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：112。

**【第251項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：113。

**【第252項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：114。

**【第253項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：115。

**【第254項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：116。

**【第255項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：117。

**【第256項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-

178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：118。

**【第257項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：119。

**【第258項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：120。

**【第259項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：121。

**【第260項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：122。

**【第261項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：123。

**【第262項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中

任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：124。

**【第263項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：125。

**【第264項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：126。

**【第265項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：127。

**【第266項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：128。

**【第267項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：129。

**【第268項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：130。

**【第269項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：131。

**【第270項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：132。

**【第271項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：133。

**【第272項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：134。

**【第273項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：135。

**【第274項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：136。

**【第275項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：137。

**【第276項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：138。

**【第277項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：139。

**【第278項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：140。

**【第279項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-

178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：141。

**【第280項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：142。

**【第281項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：143。

**【第282項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：144。

**【第283項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：145。

**【第284項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：146。

**【第285項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中

任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：147。

**【第286項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：148。

**【第287項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：149。

**【第288項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：150。

**【第289項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：151。

**【第290項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：152。

**【第291項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：153。

**【第292項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：154。

**【第293項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：155。

**【第294項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：156。

**【第295項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：157。

**【第296項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：158。

**【第297項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：159。

**【第298項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：160。

**【第299項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：161。

**【第300項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：162。

**【第301項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：163。

**【第302項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-

178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：164。

**【第303項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：165。

**【第304項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：166。

**【第305項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：167。

**【第306項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：168。

**【第307項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：169。

**【第308項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中

任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：170。

**【第309項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：171。

**【第310項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：172。

**【第311項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：173。

**【第312項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：174。

**【第313項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：175。

**【第314項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：176。

**【第315項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：177。

**【第316項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：178。

**【第317項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：213。

**【第318項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：214。

**【第319項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：215。

**【第320項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：216。

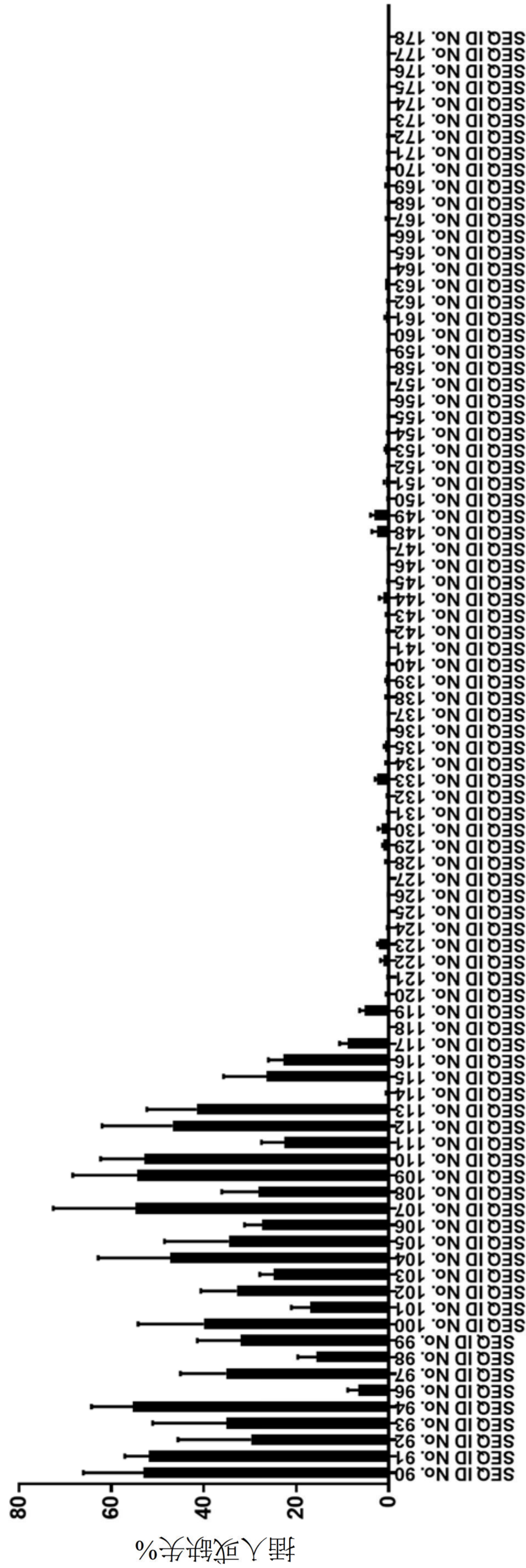
**【第321項】**

如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：217。

**【第322項】**

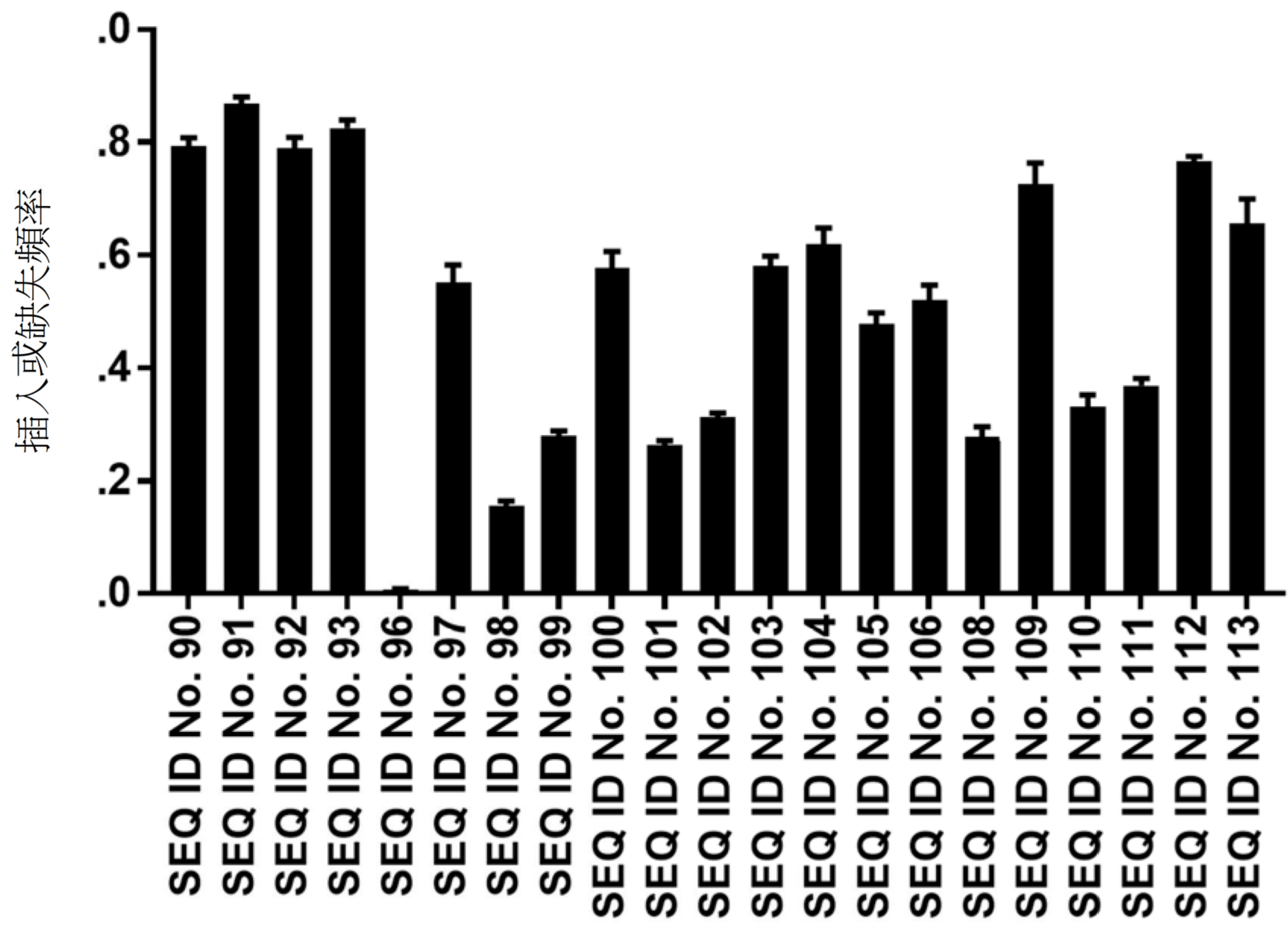
如請求項5至8、9至35、40至75、78至80、83、85至87或90至137中任一項之方法、用途、群體、細胞或組合物，其中選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之該引導RNA之序列為SEQ ID NO：218。

【發明圖式】

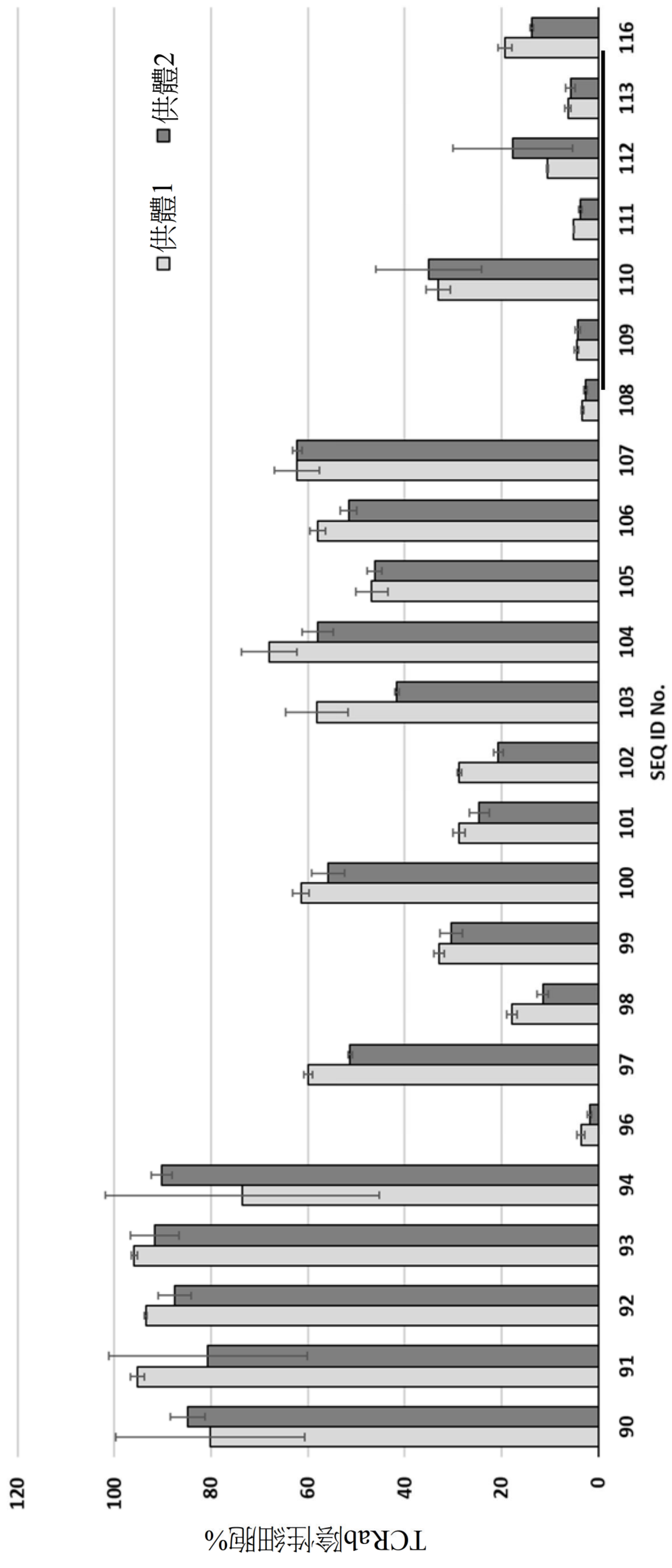


引導序列

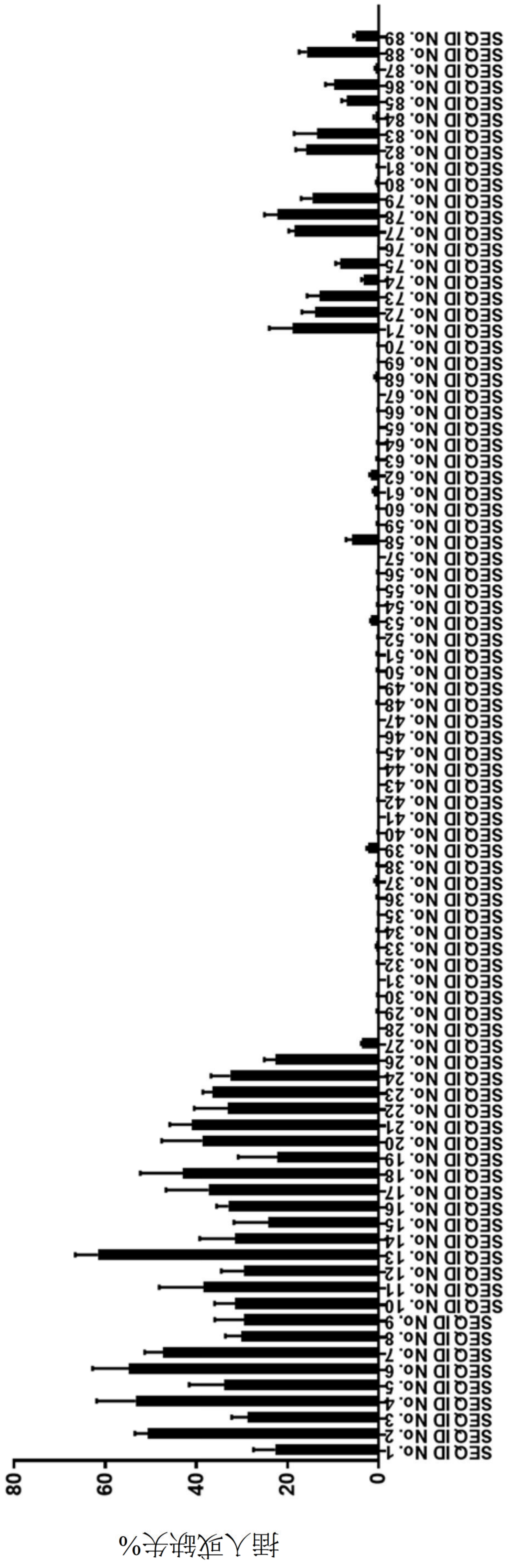
【圖1】



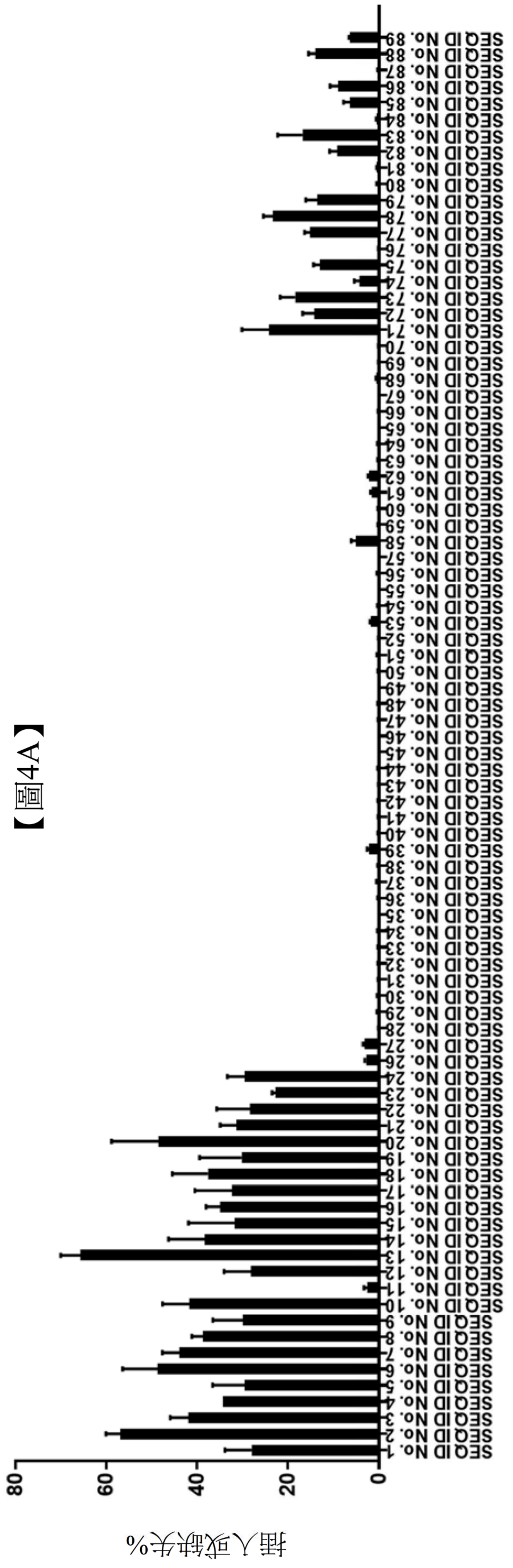
【圖2】



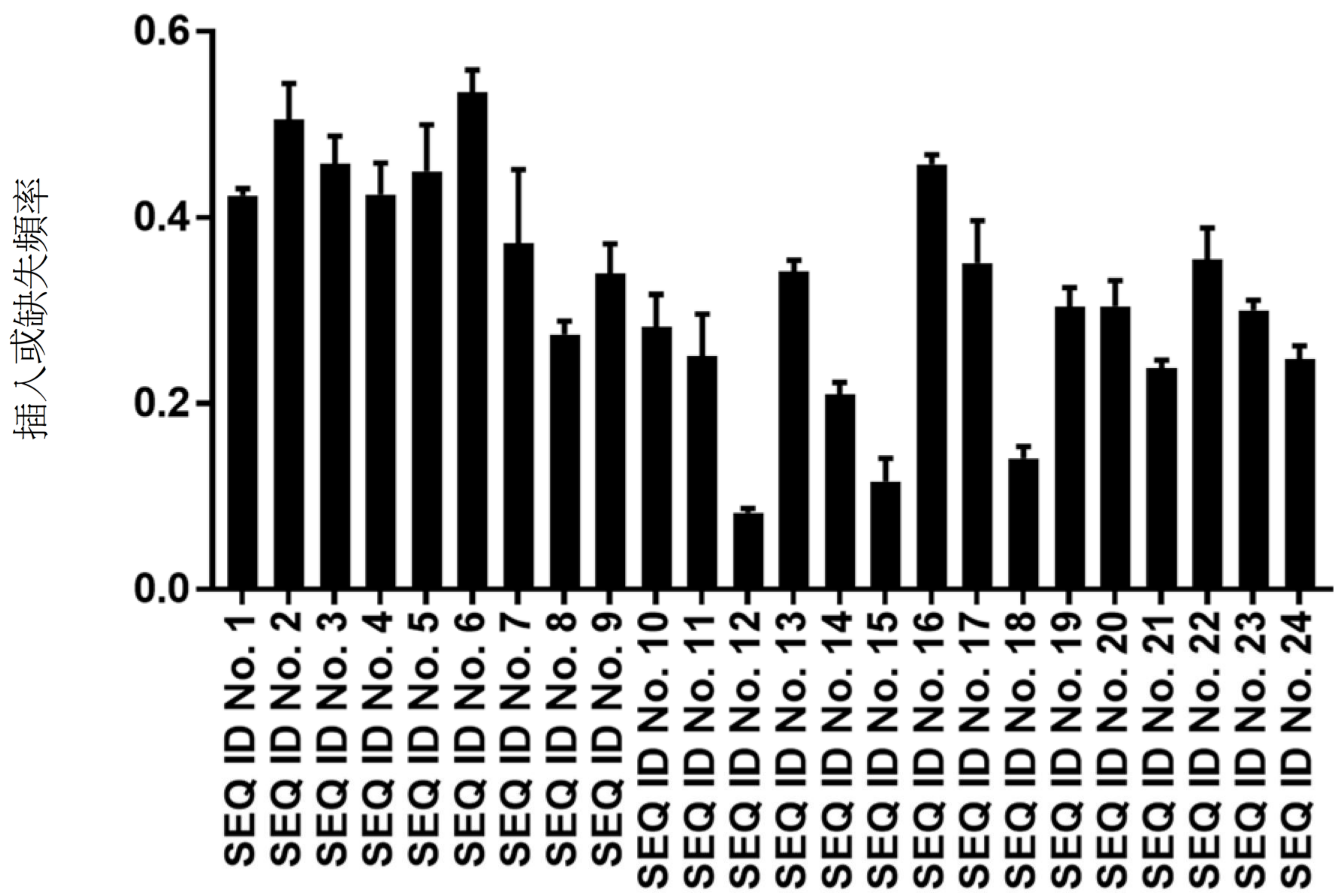
【圖3】



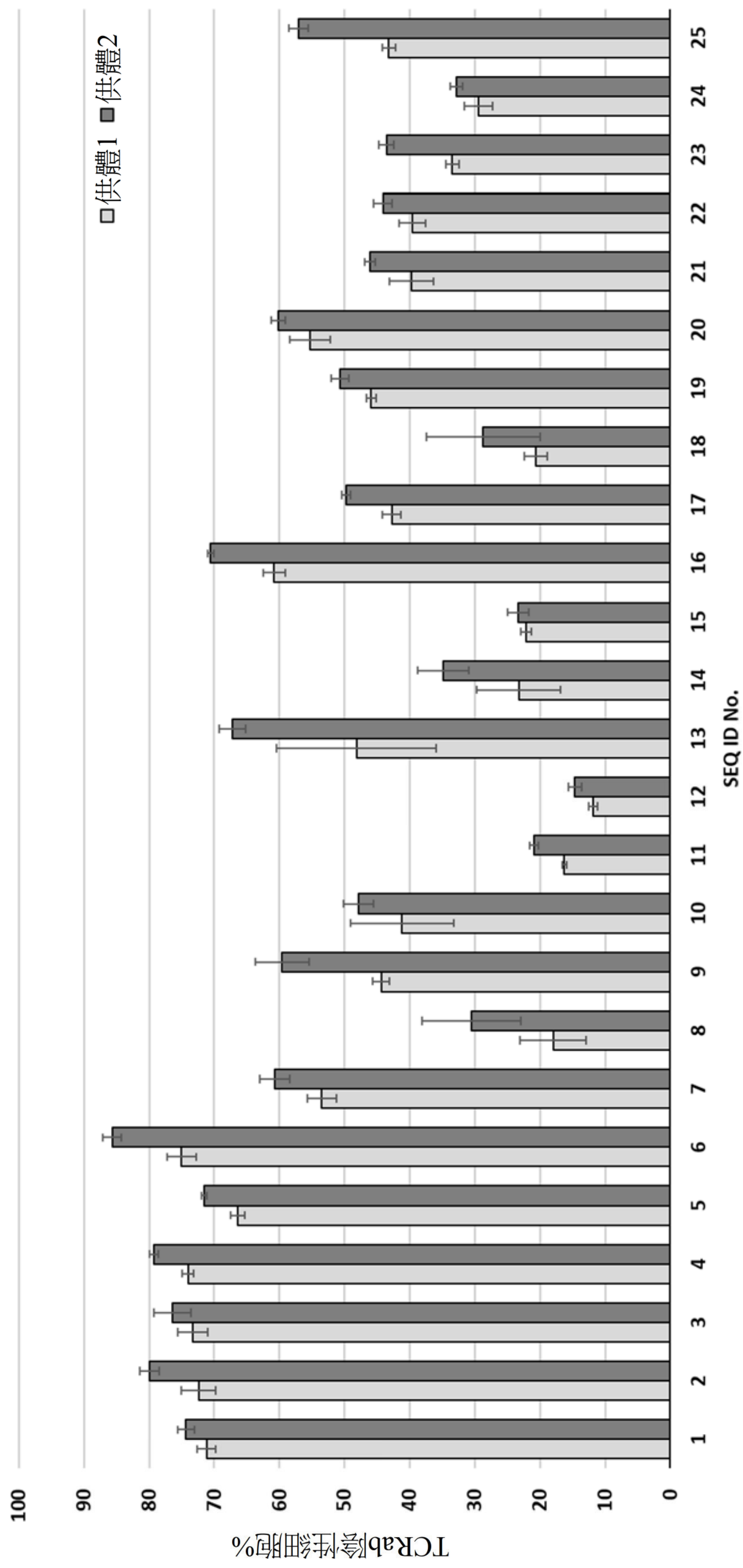
【圖4A】



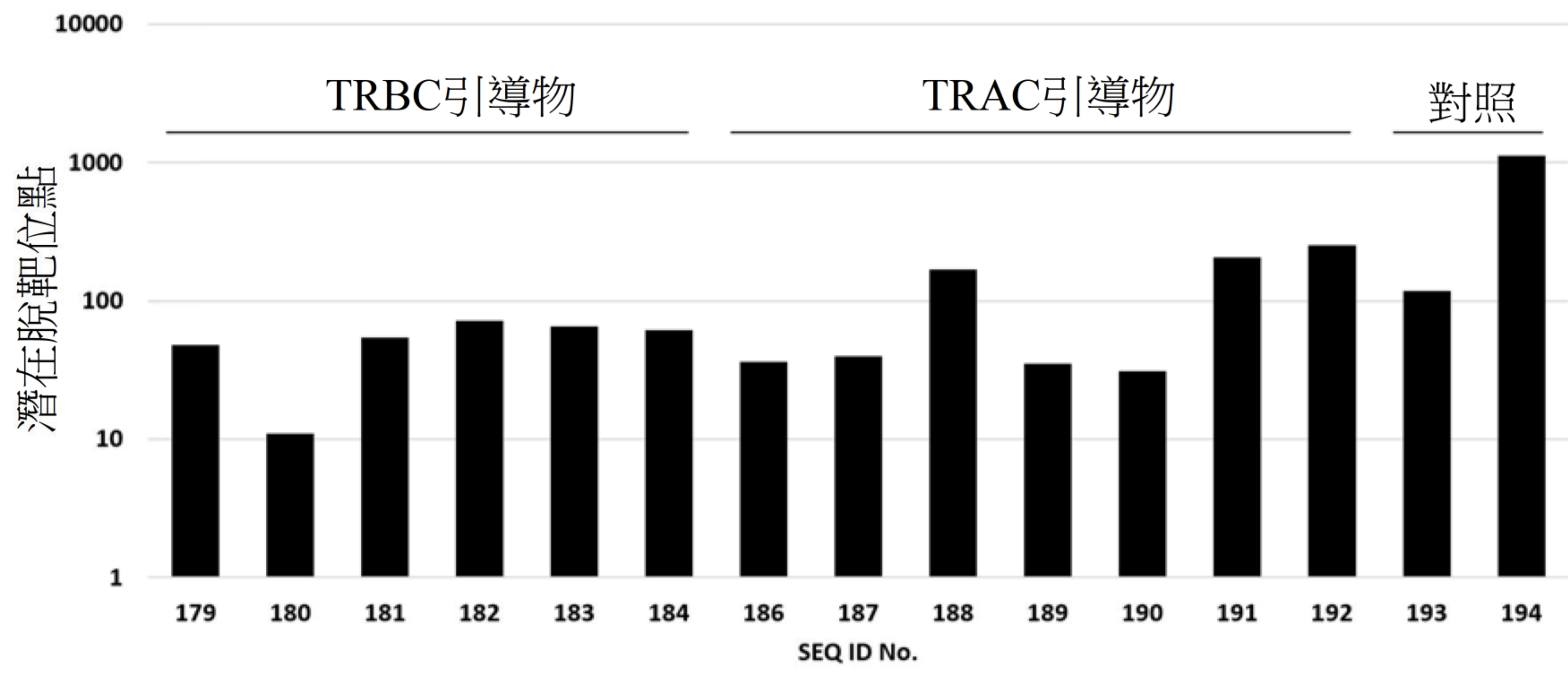
【圖4B】



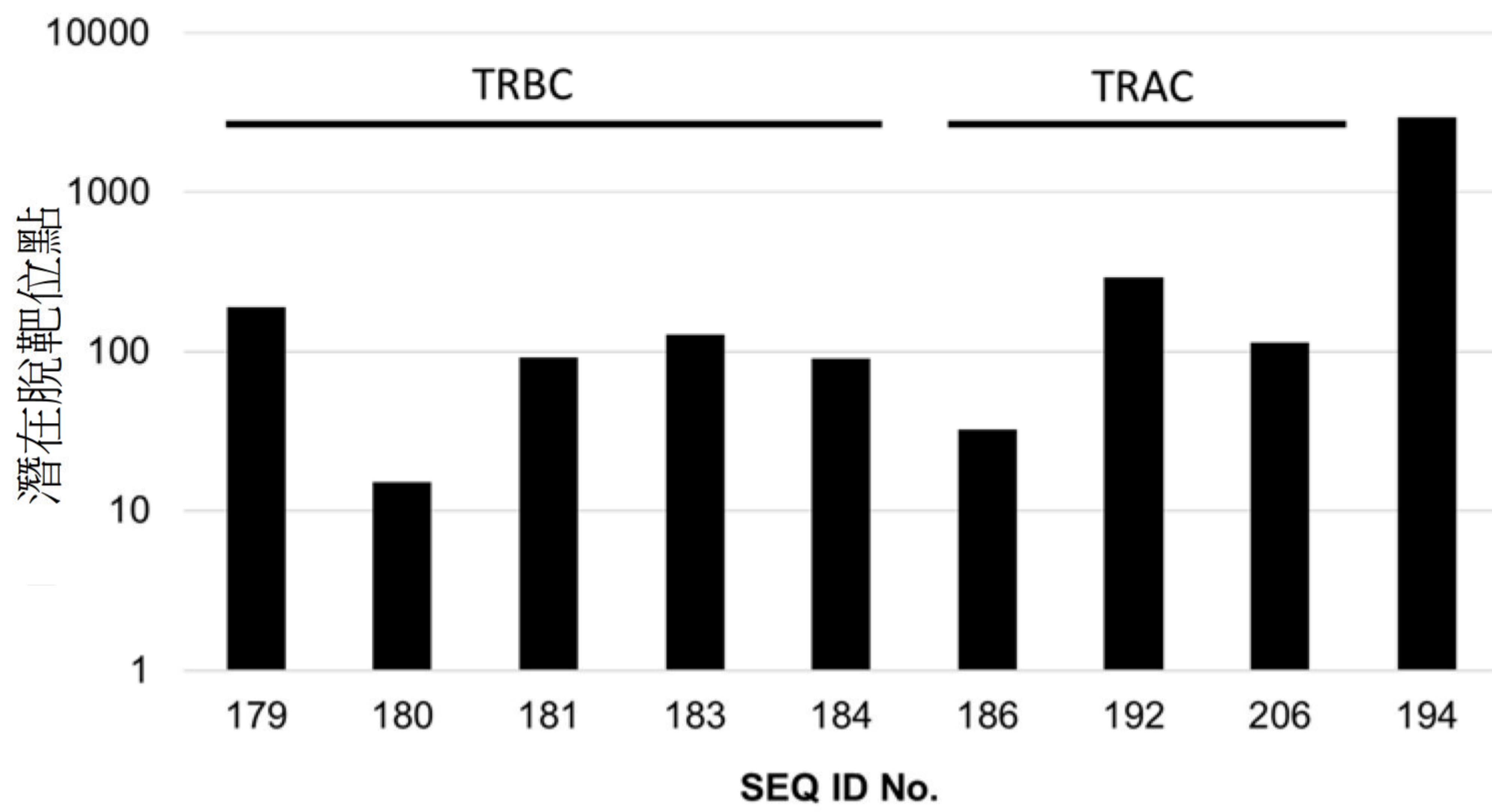
【圖5】



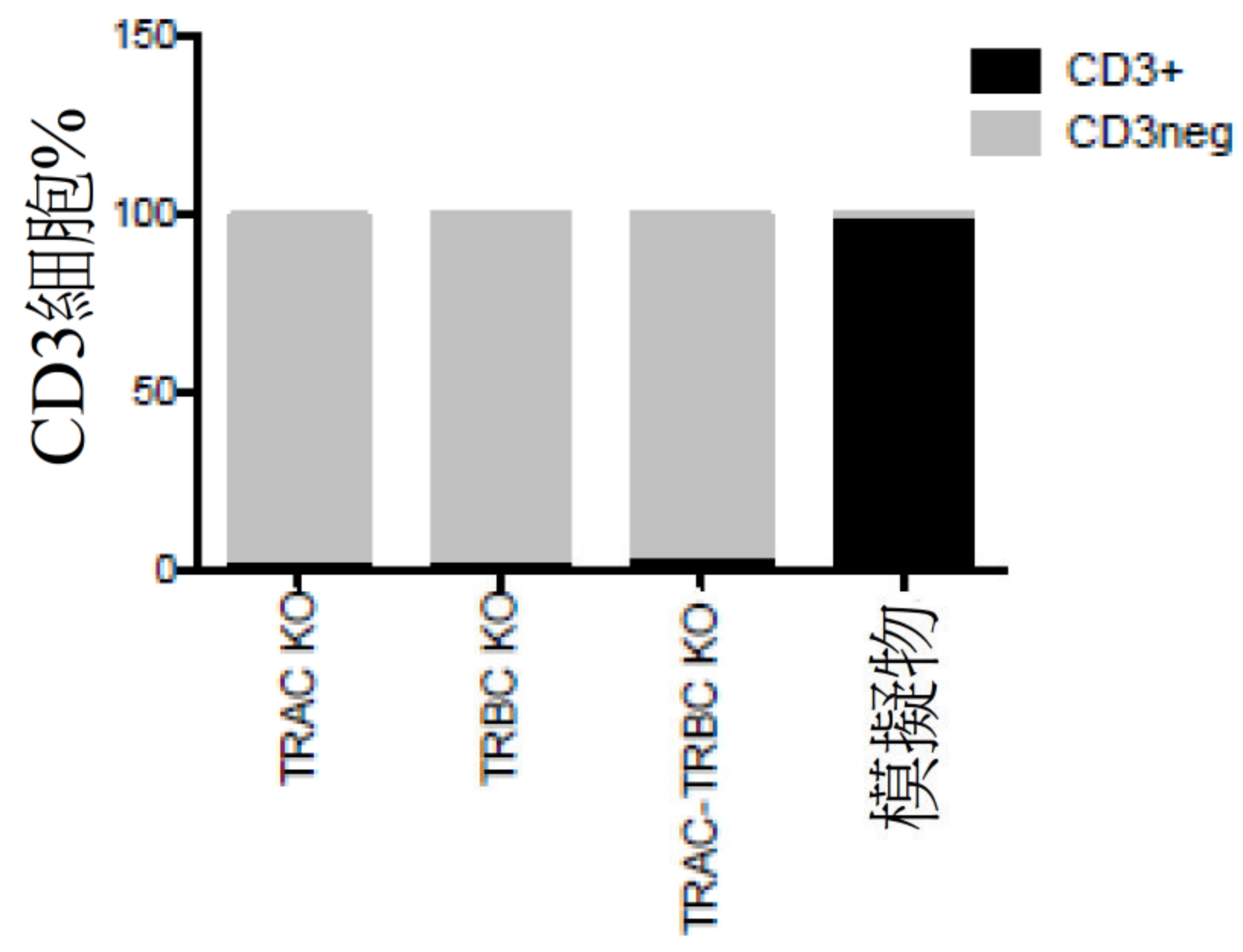
【圖6】



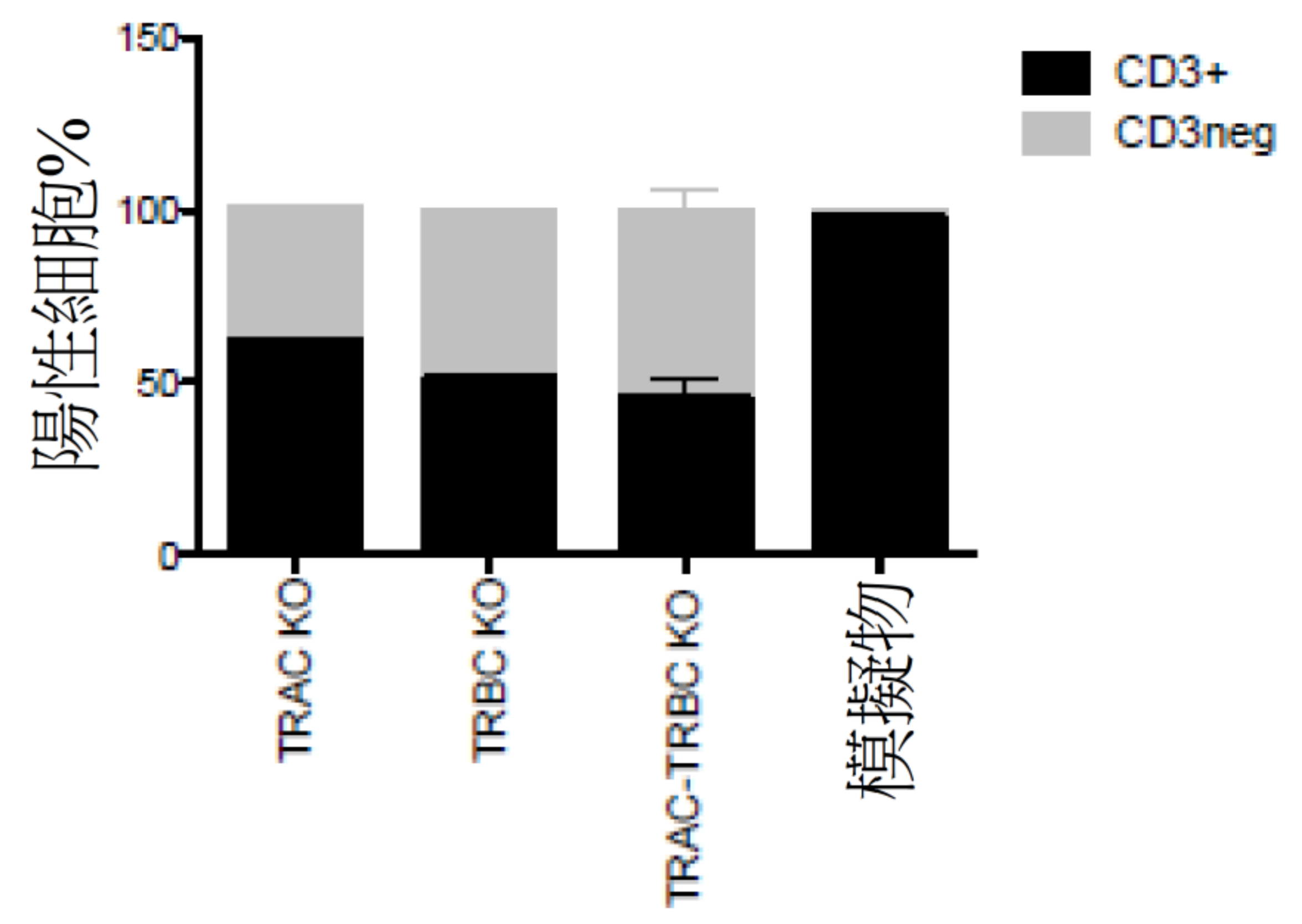
【圖7A】



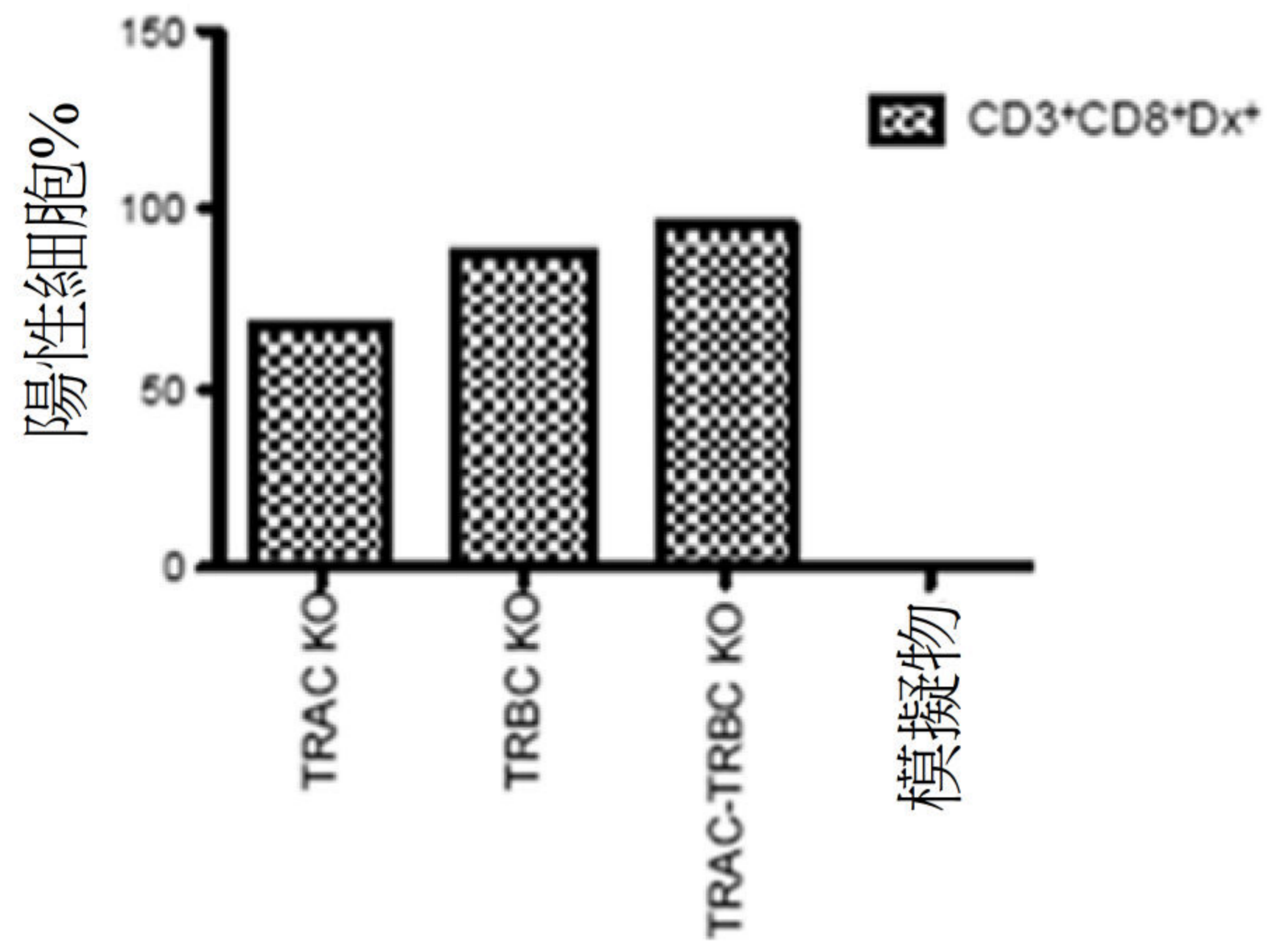
【圖7B】



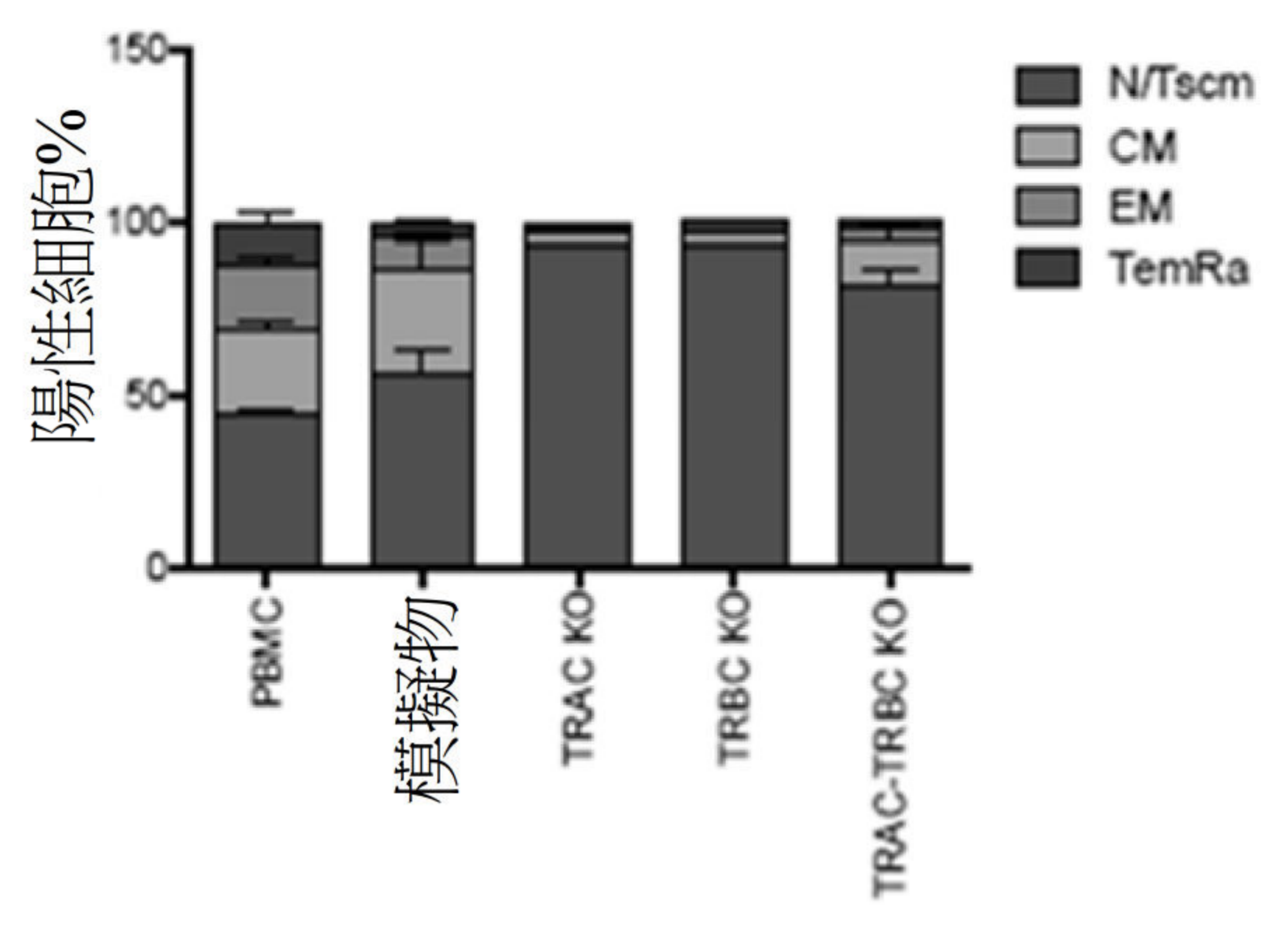
【圖8A】



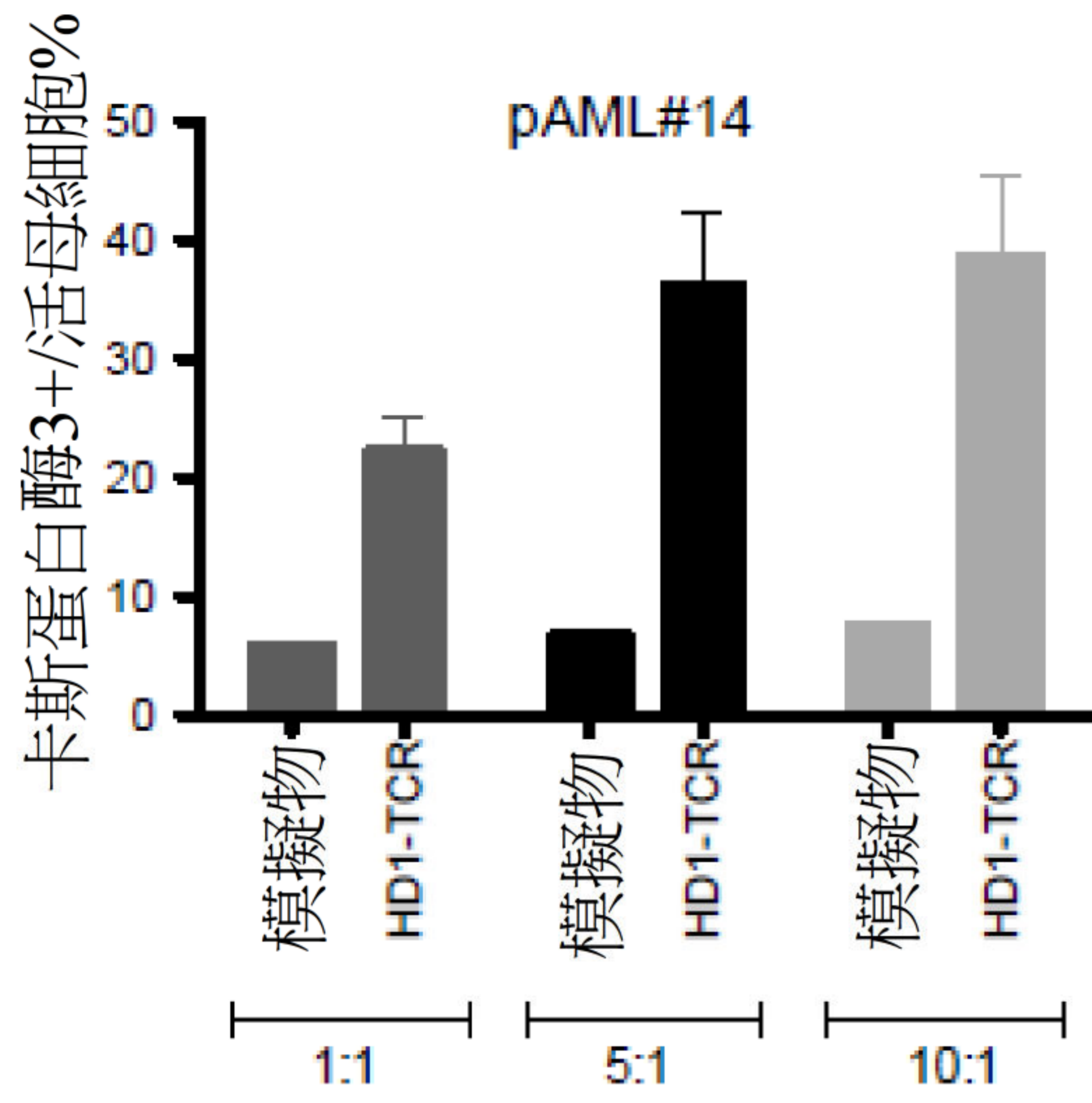
【圖8B】



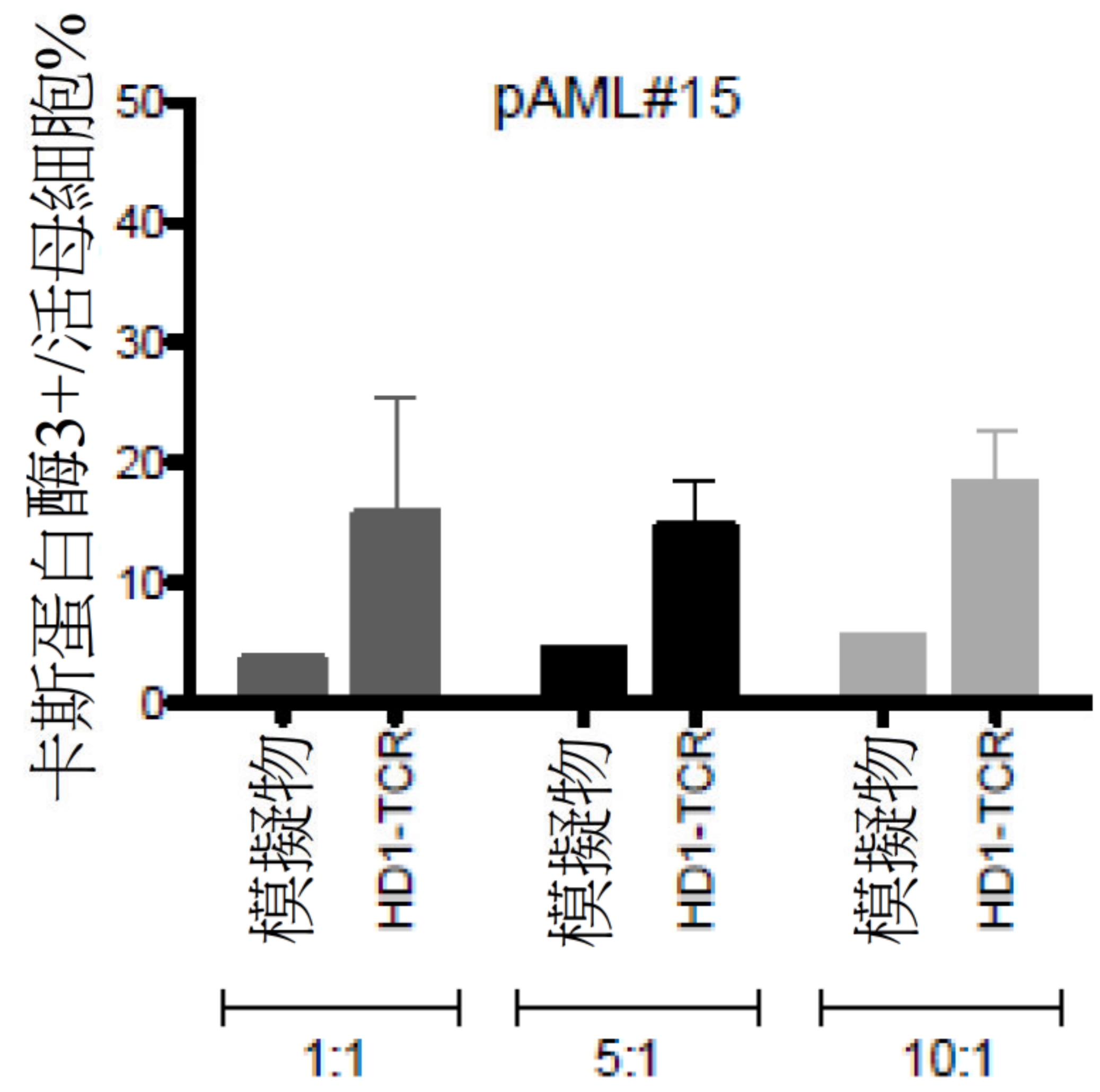
【圖8C】



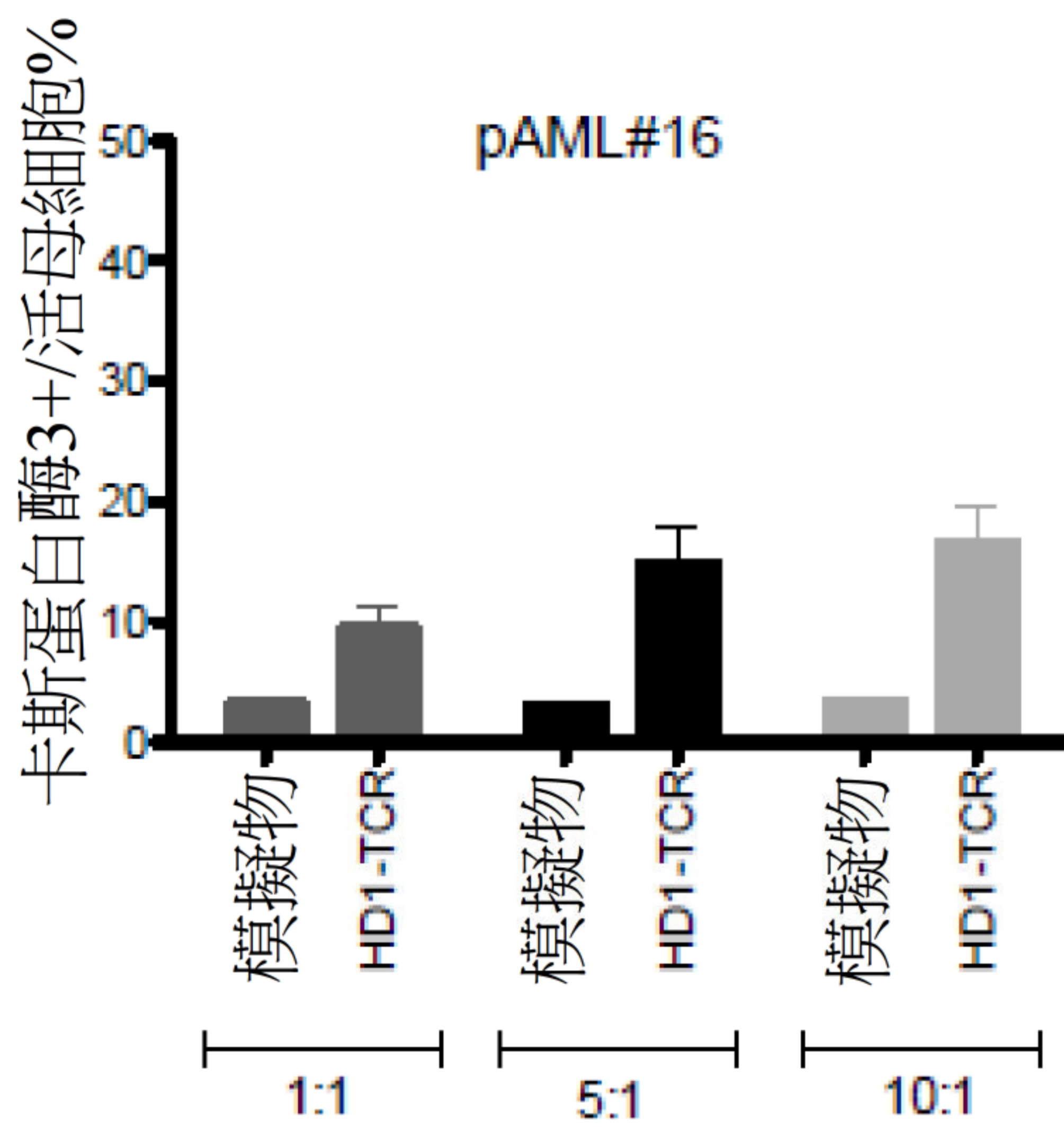
【圖8D】



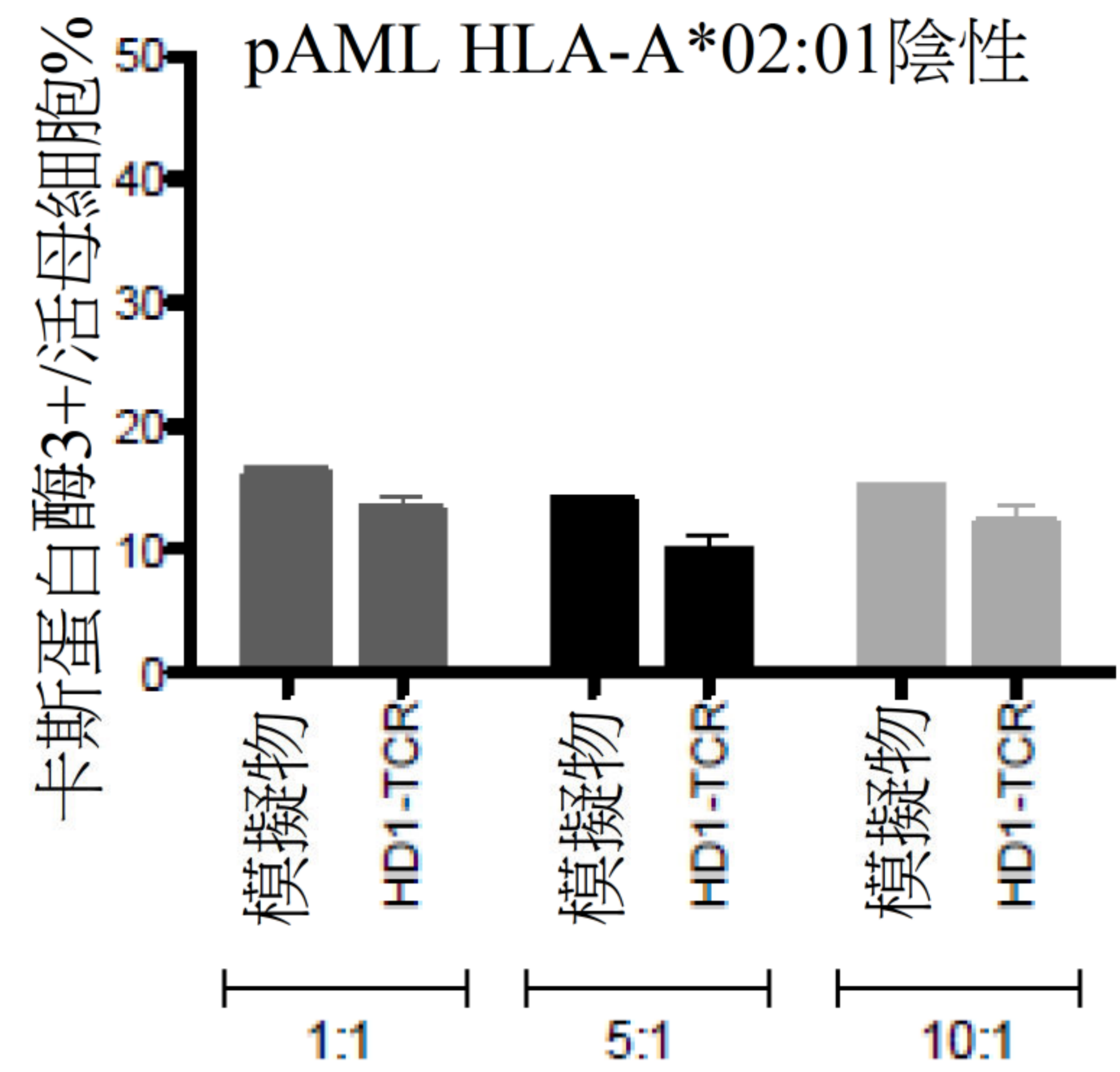
【圖9A】



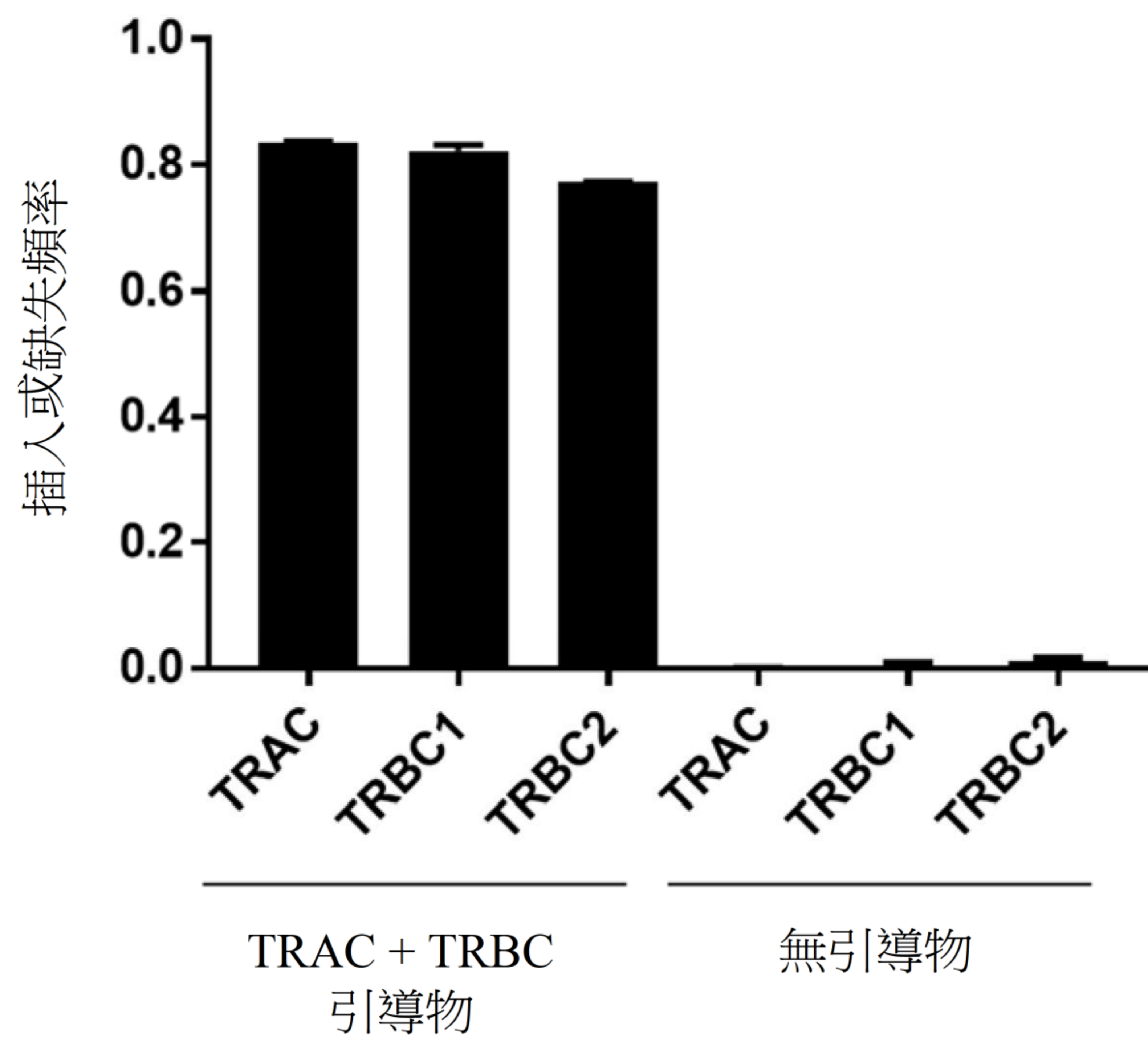
【圖9B】



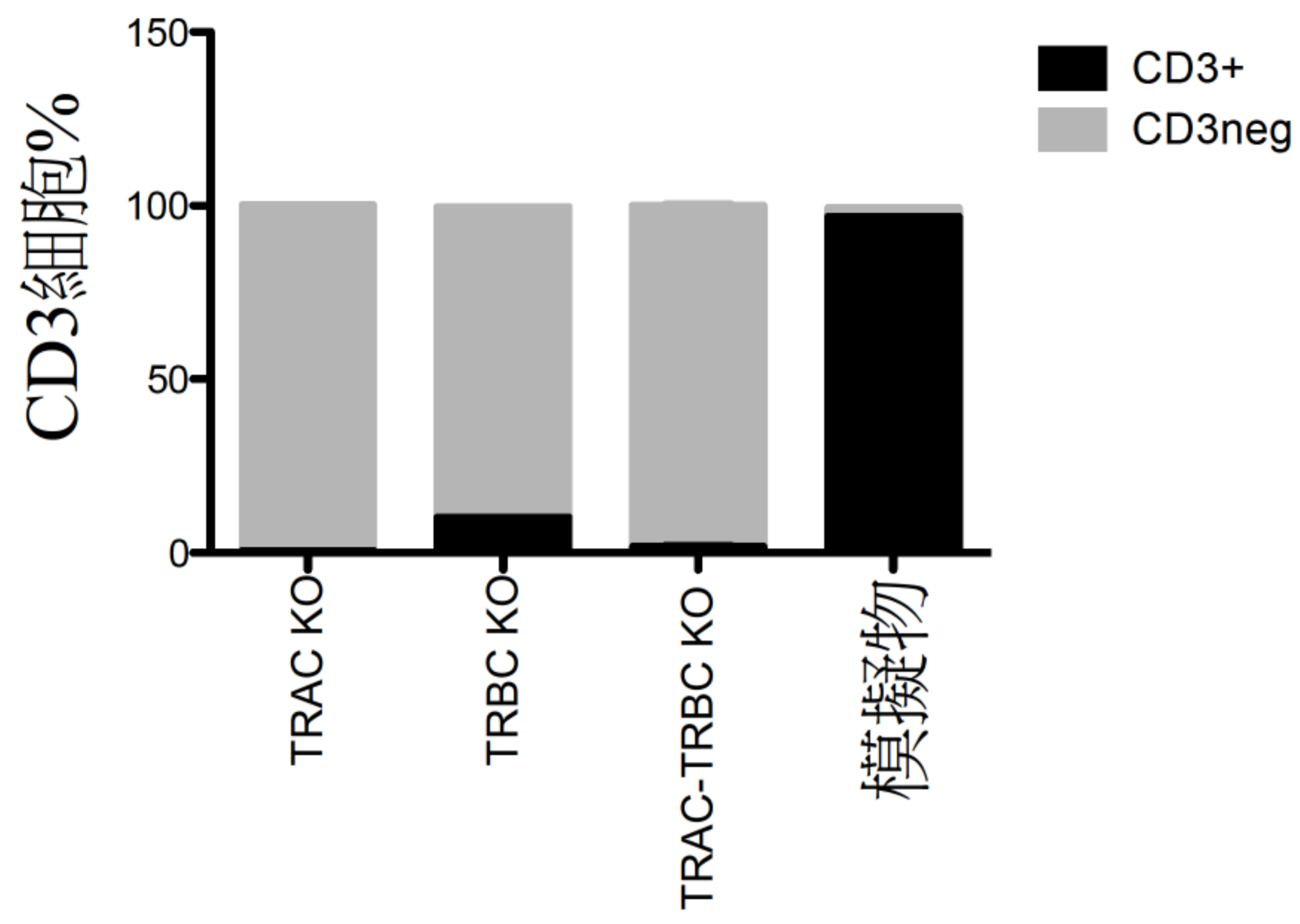
【圖9C】



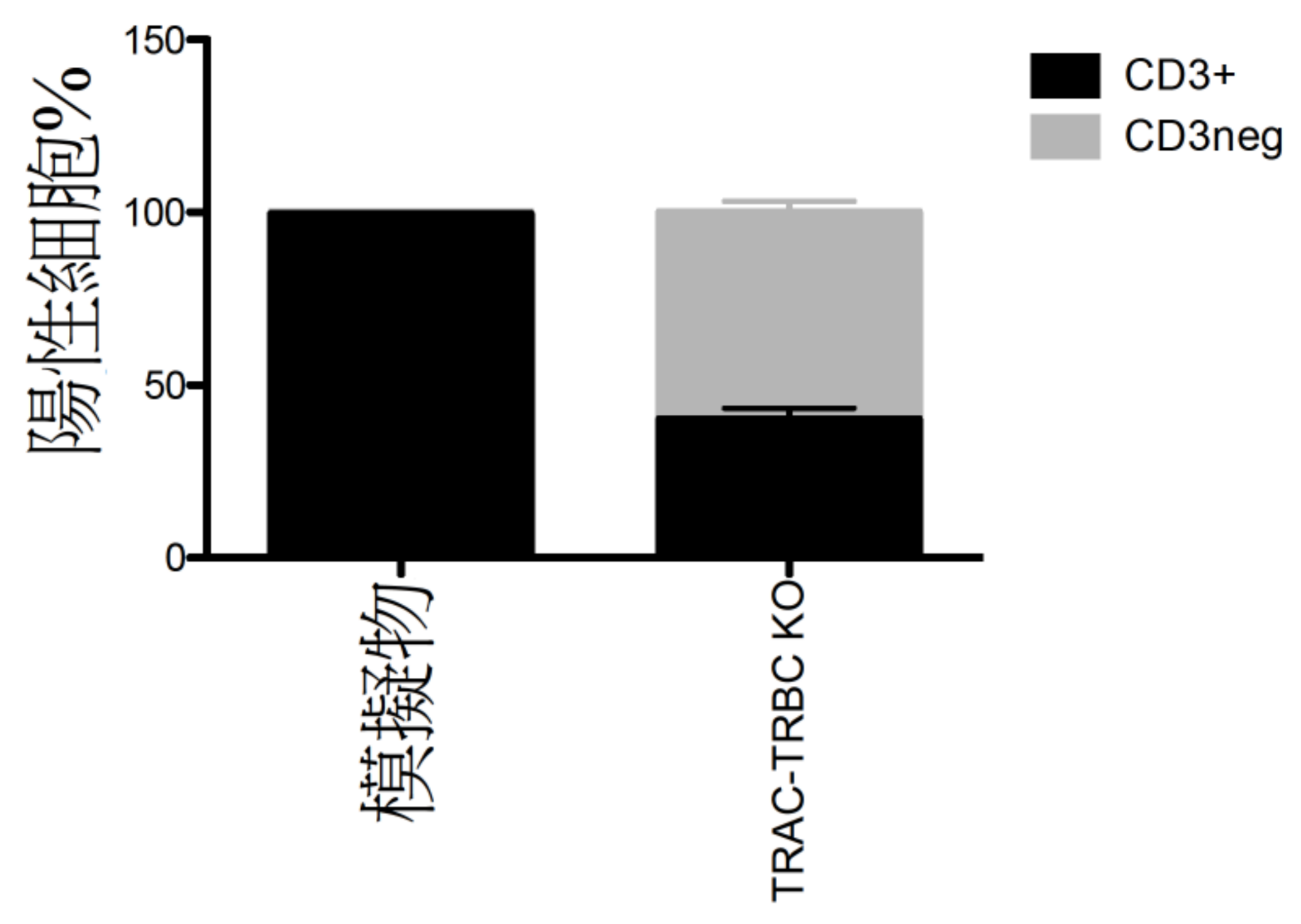
【圖9D】



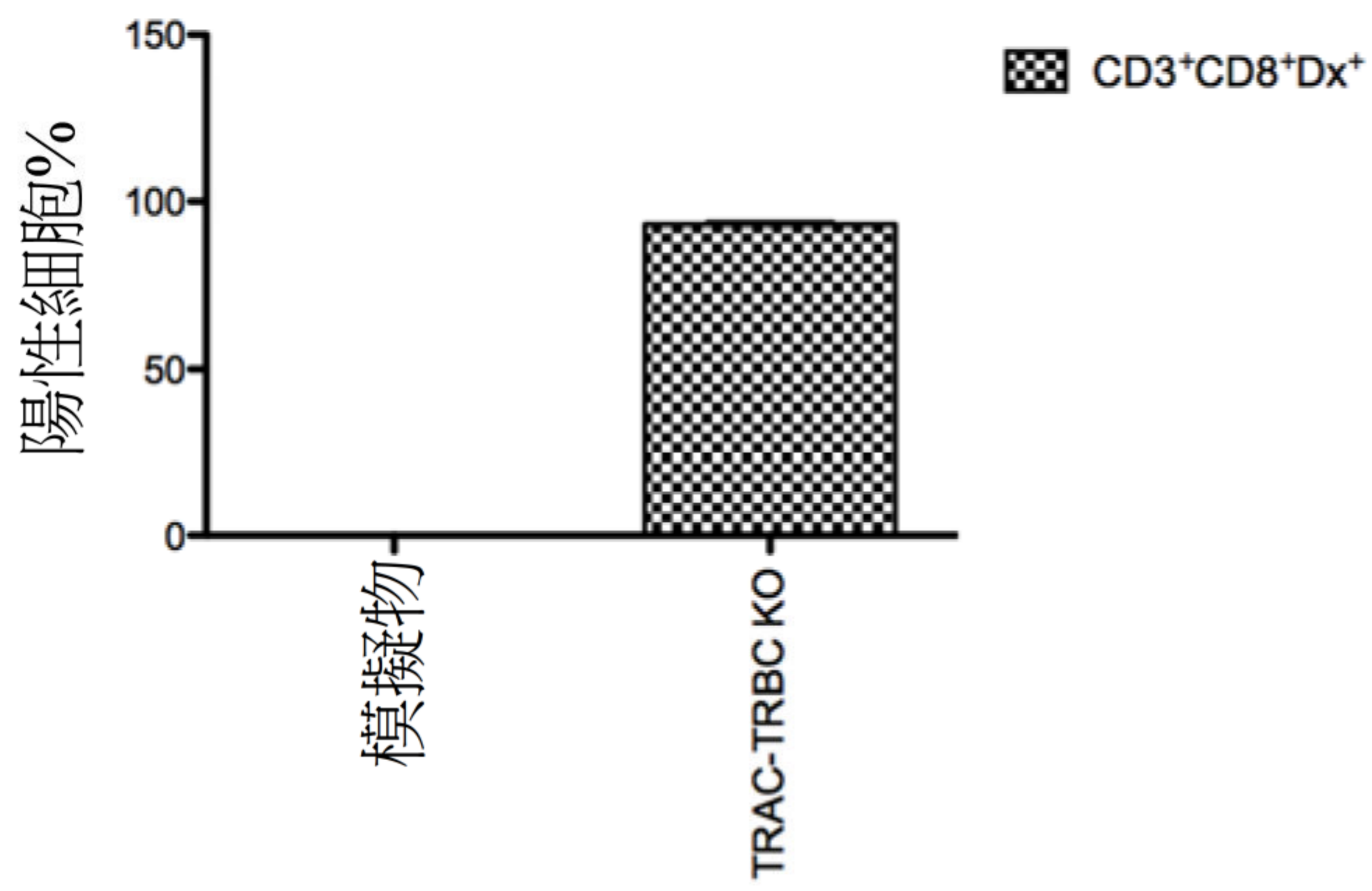
【圖10】



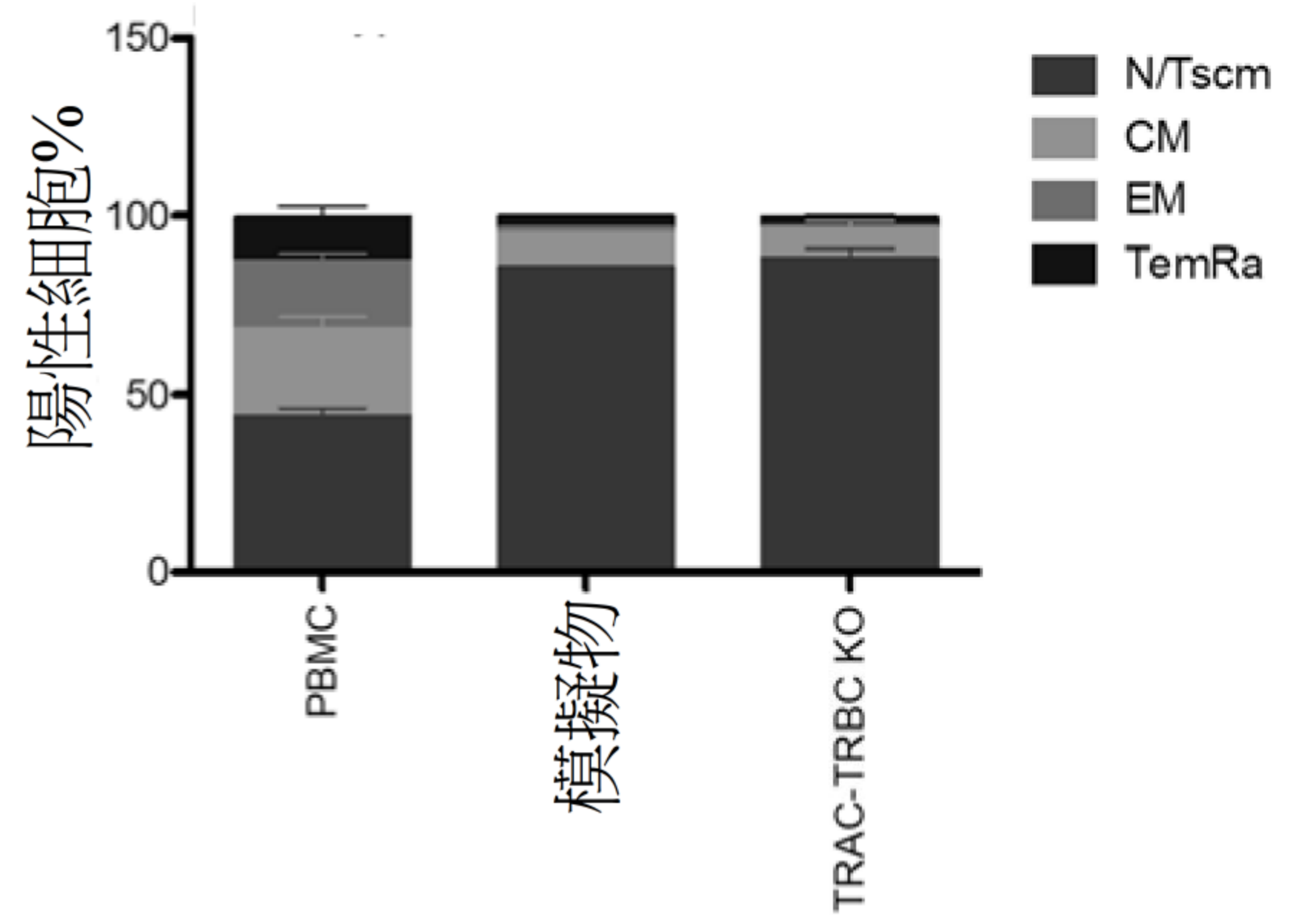
【圖 11A】



【圖 11B】

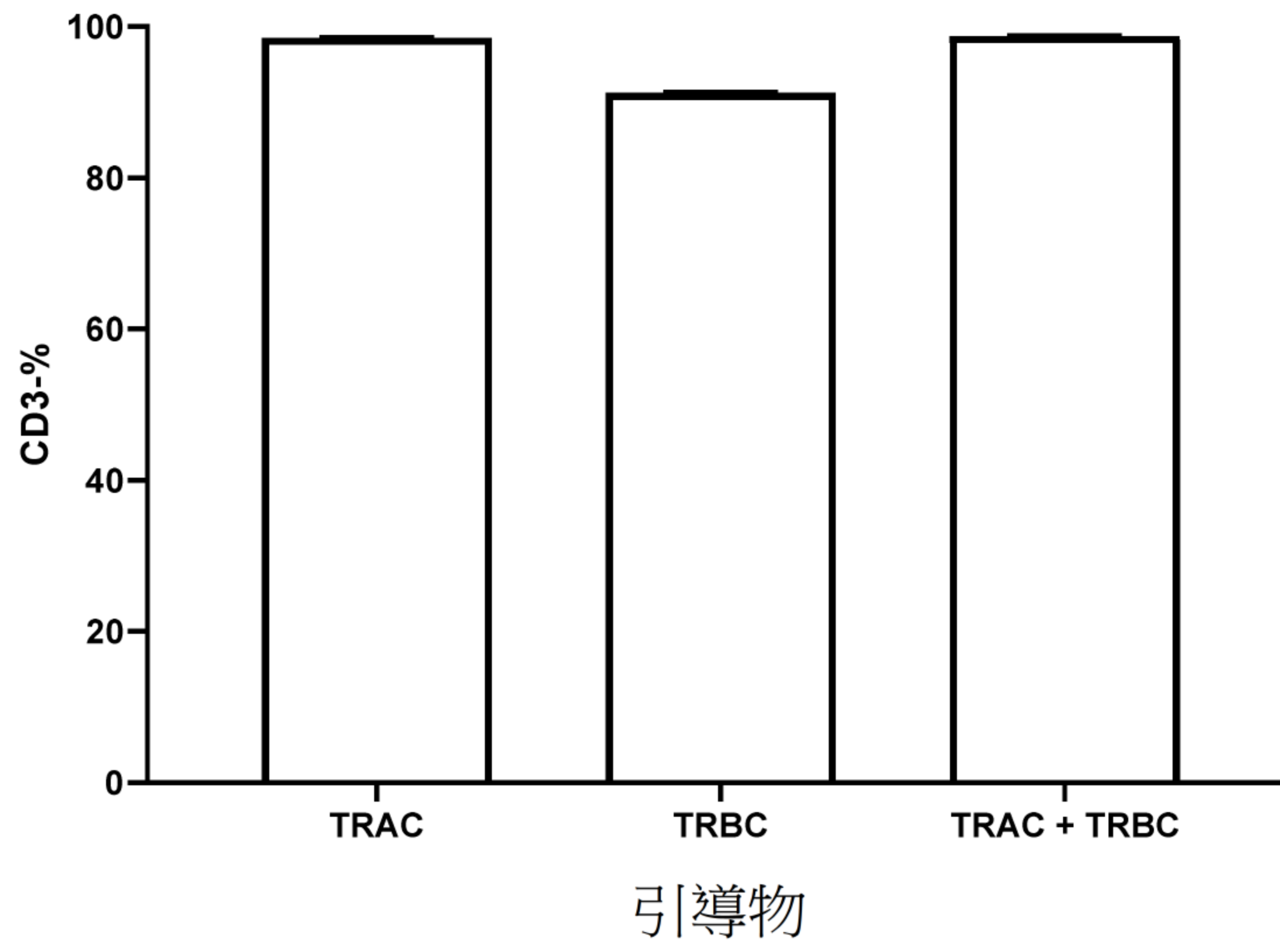


【圖 11C】



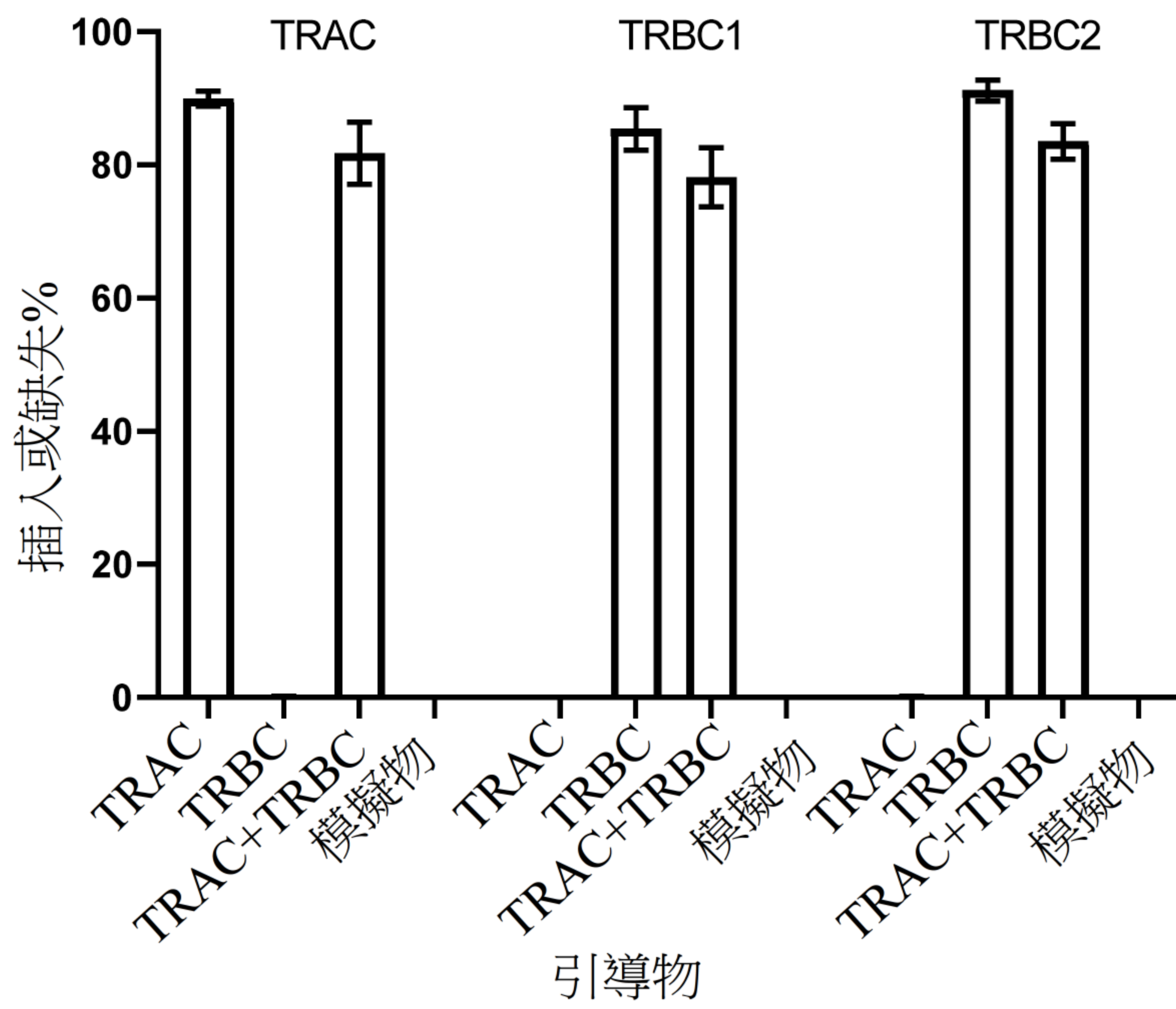
【圖 11D】

表面上缺乏TCR之細胞

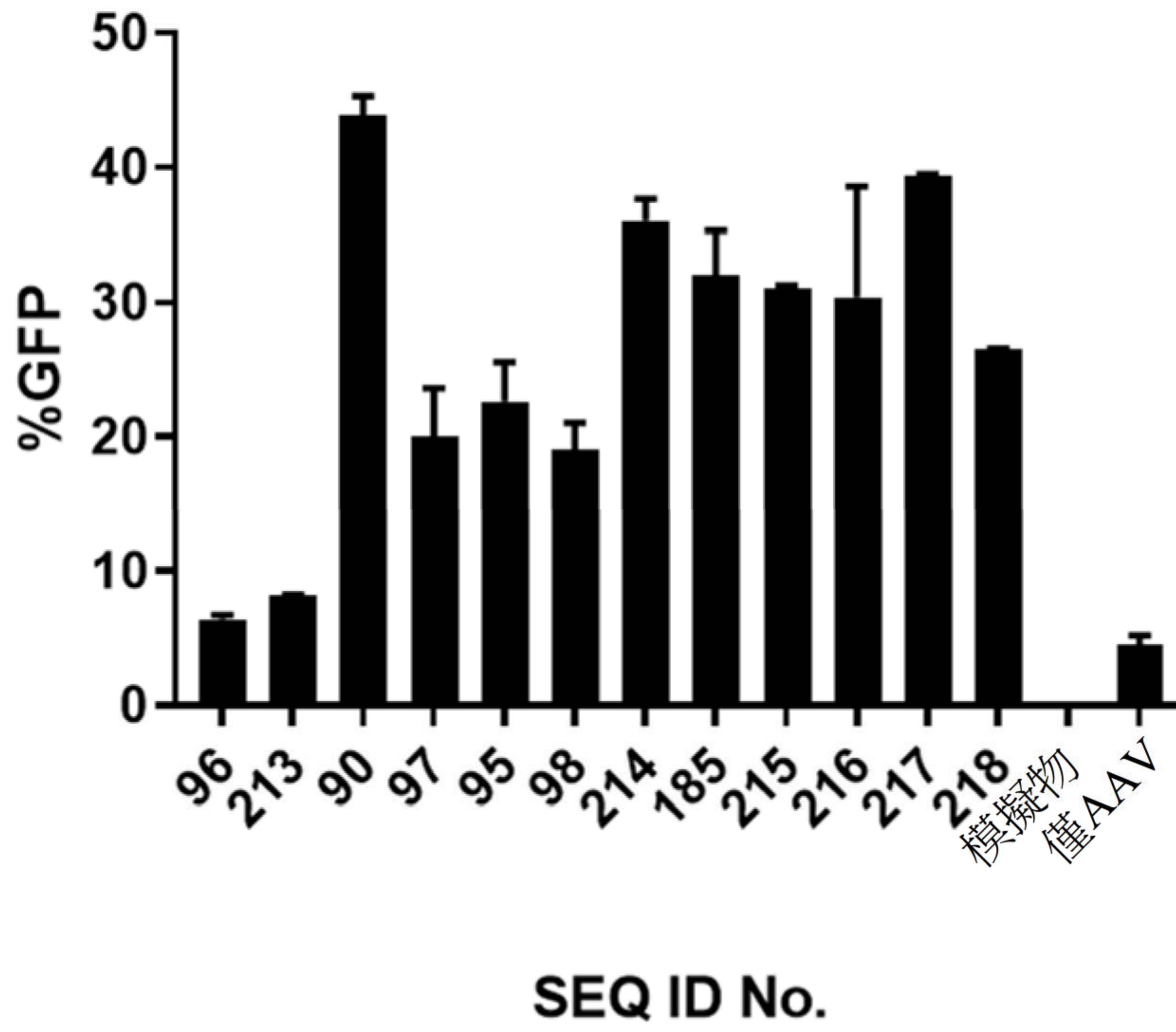


【圖12A】

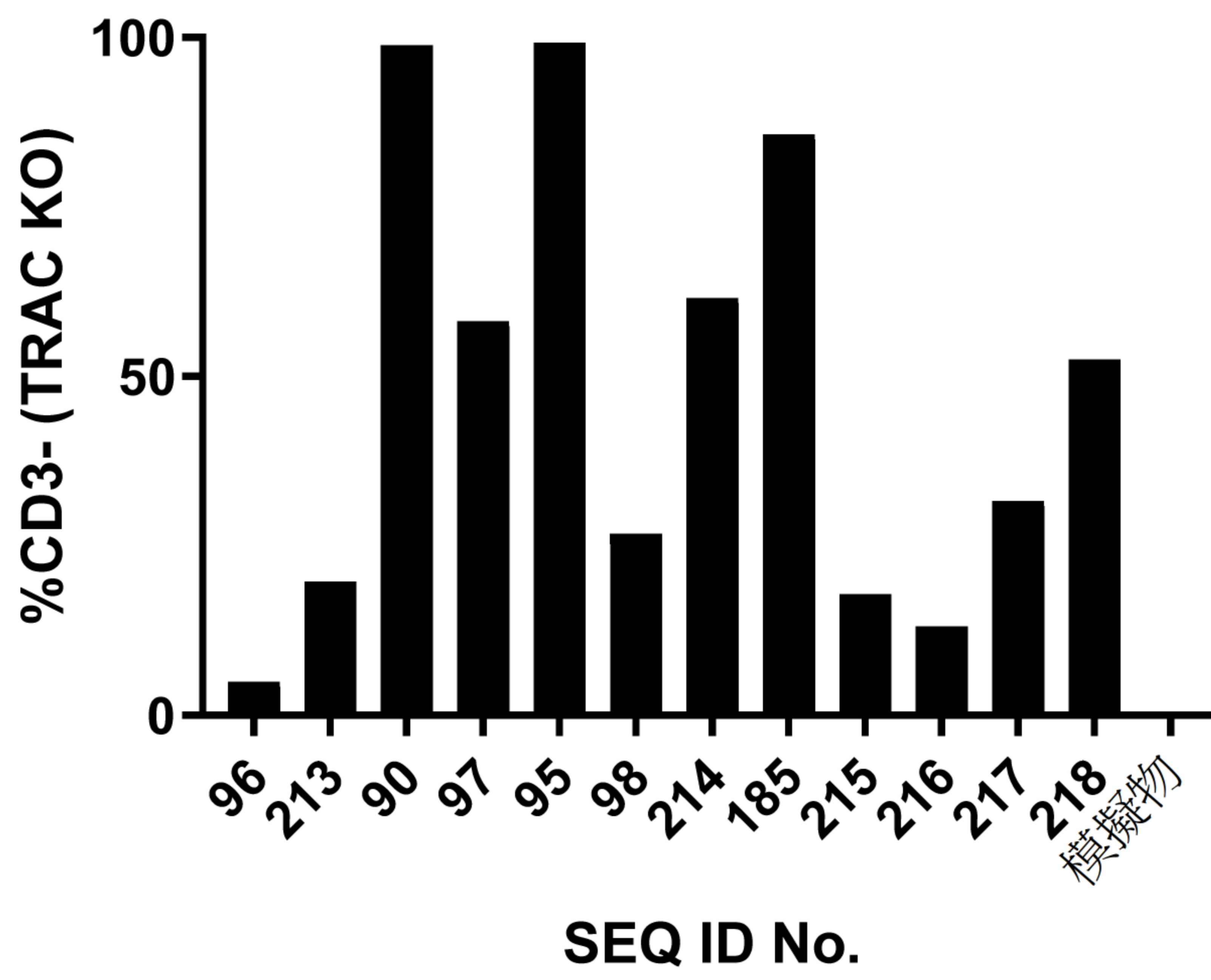
每基因座之編輯



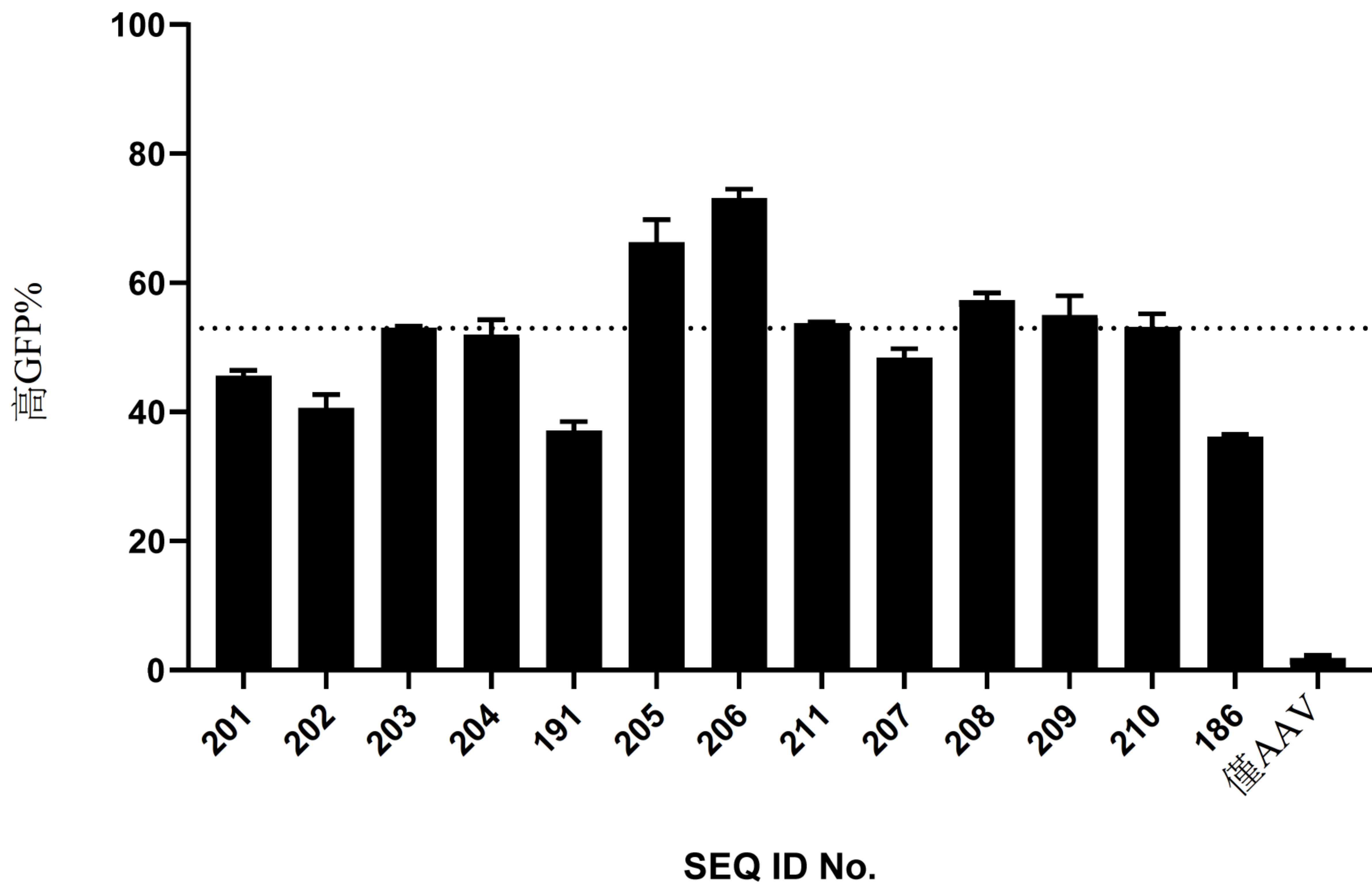
【圖12B】



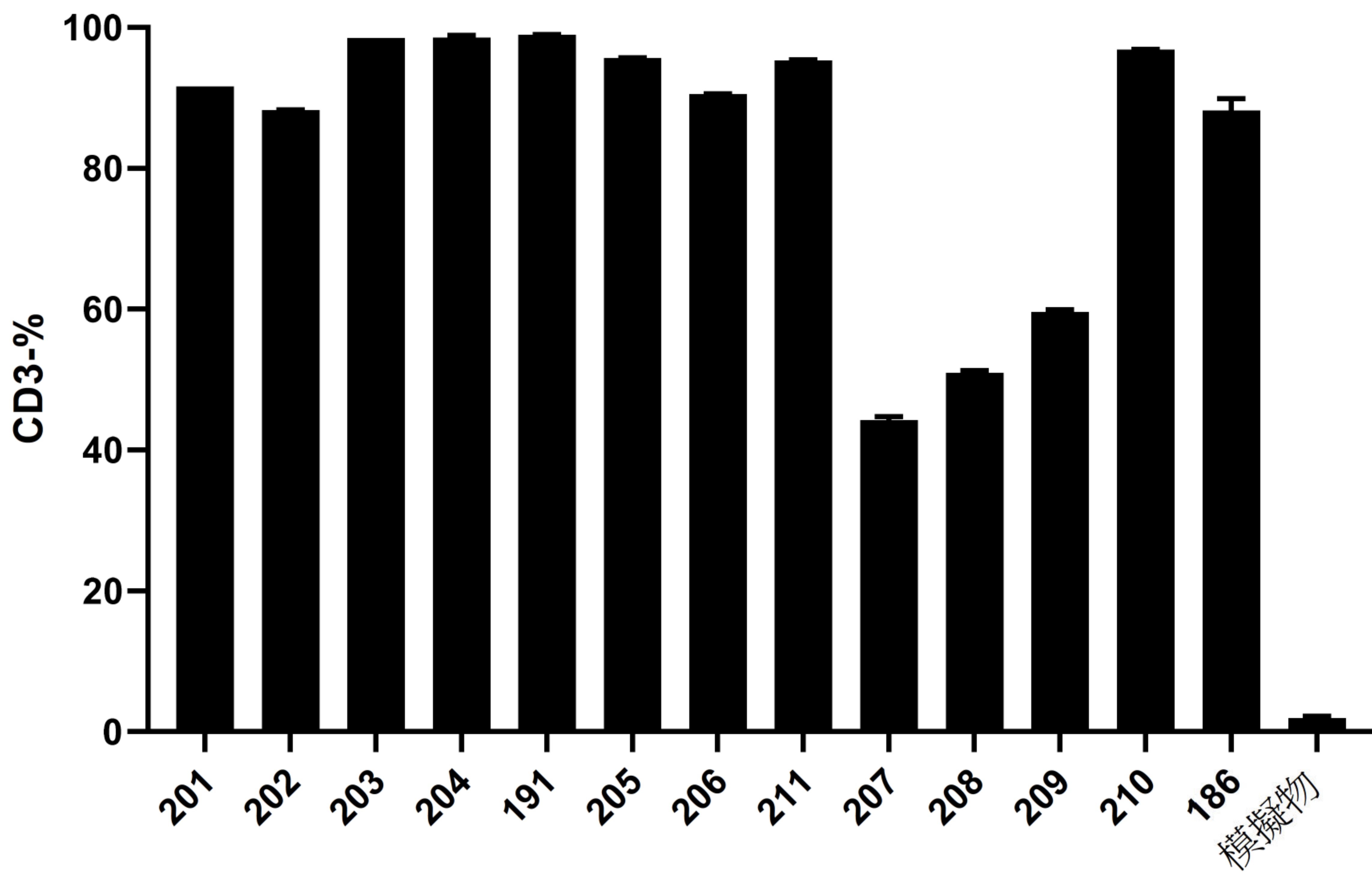
【圖13A】



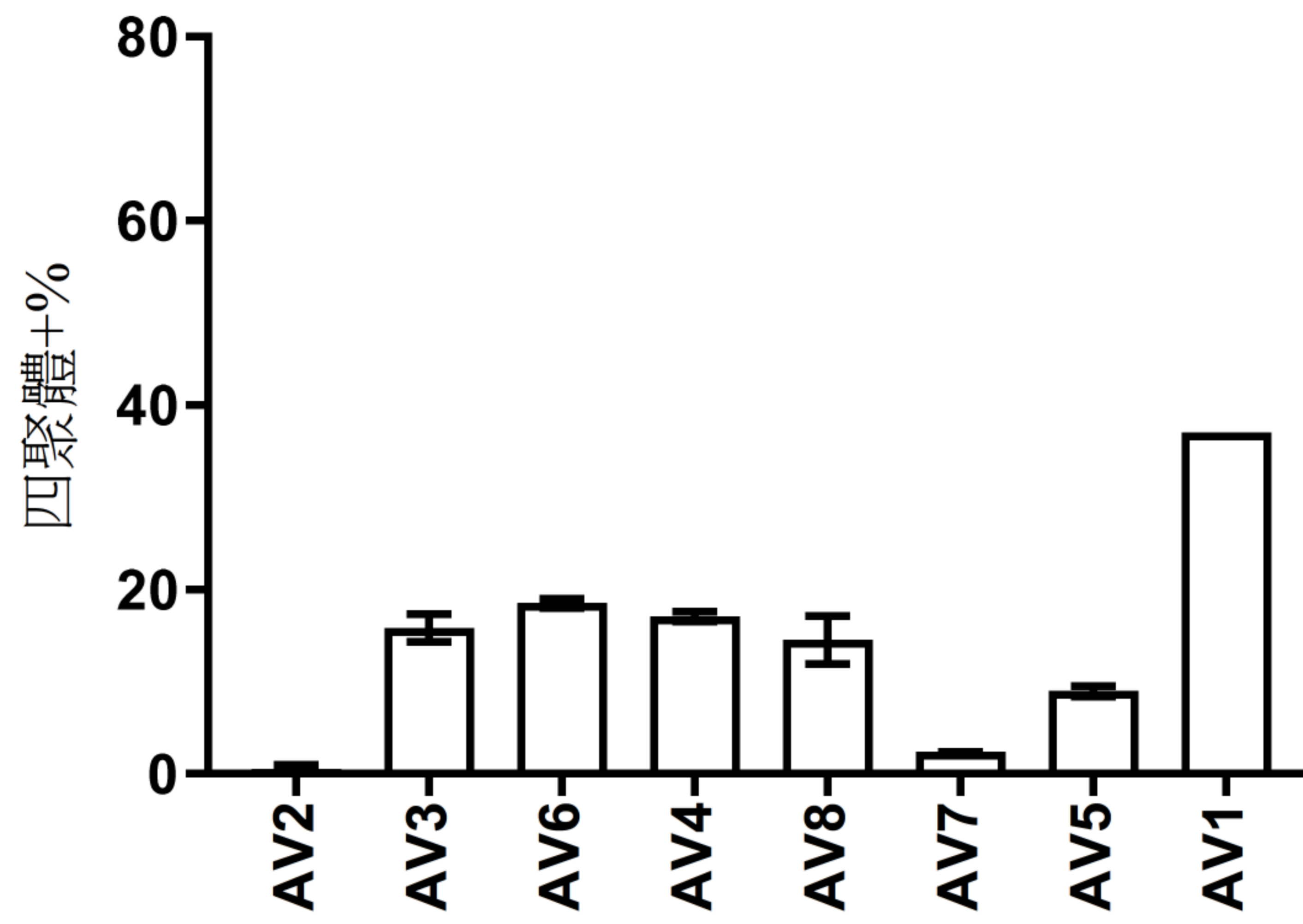
【圖13B】



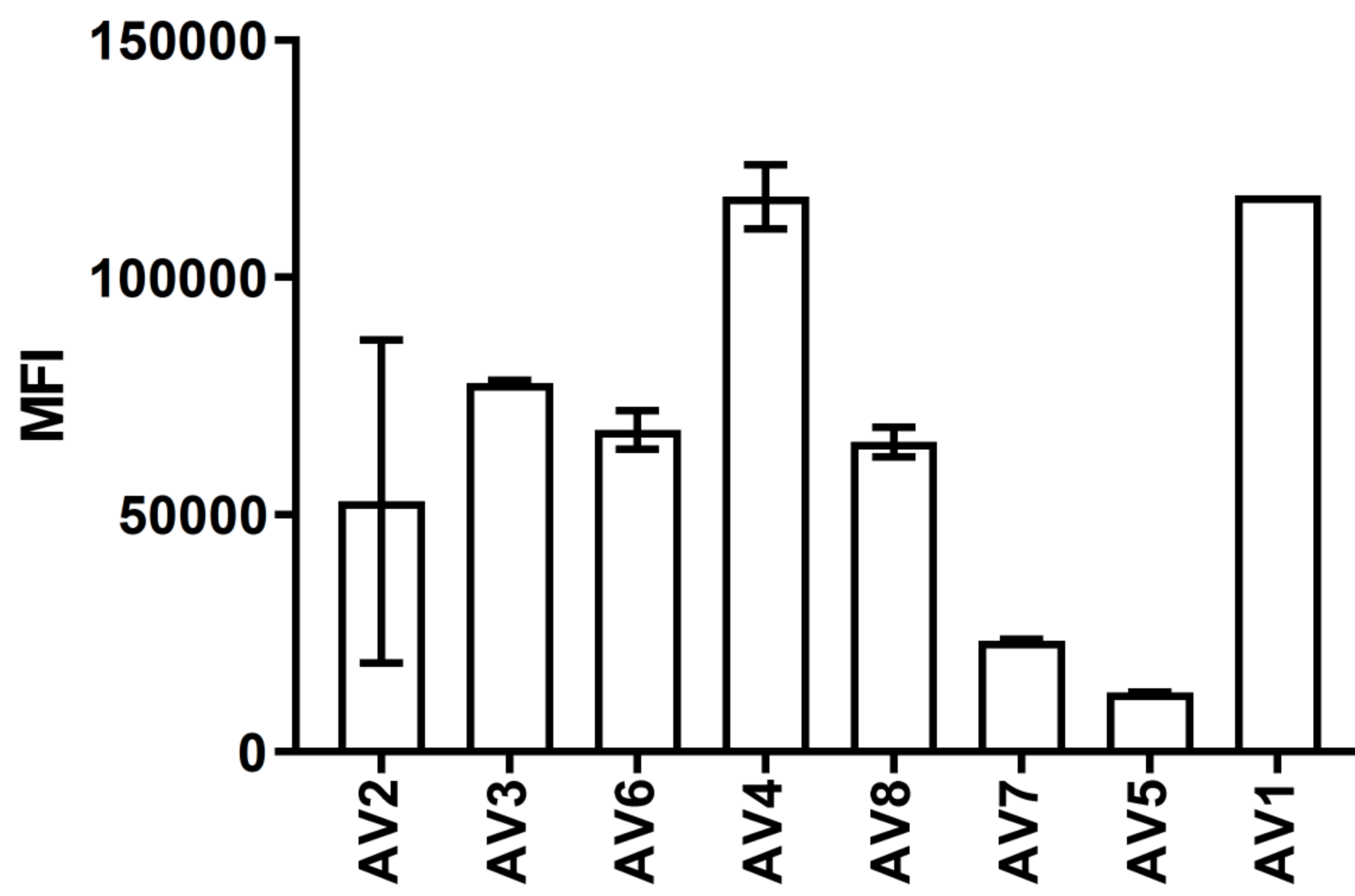
【圖14A】



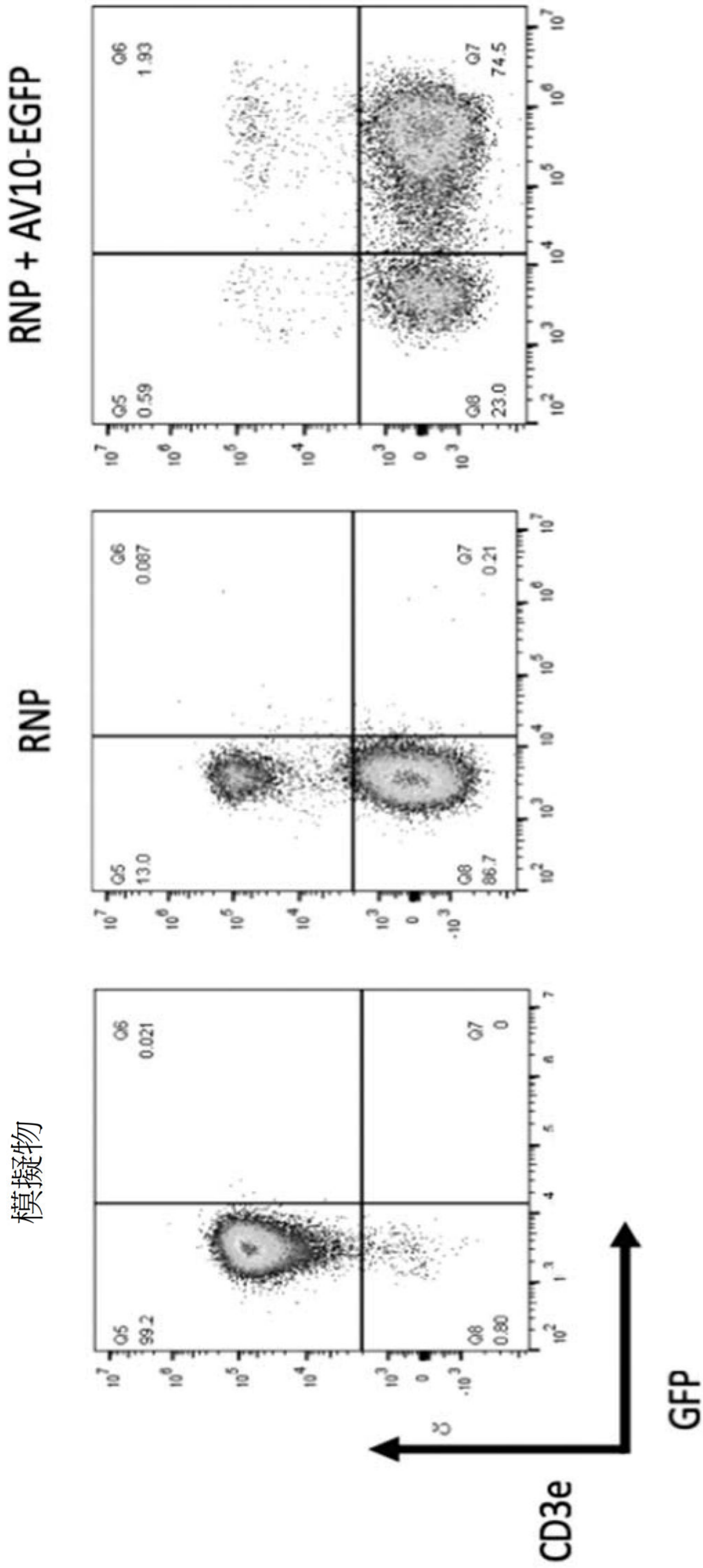
【圖14B】



【圖15A】



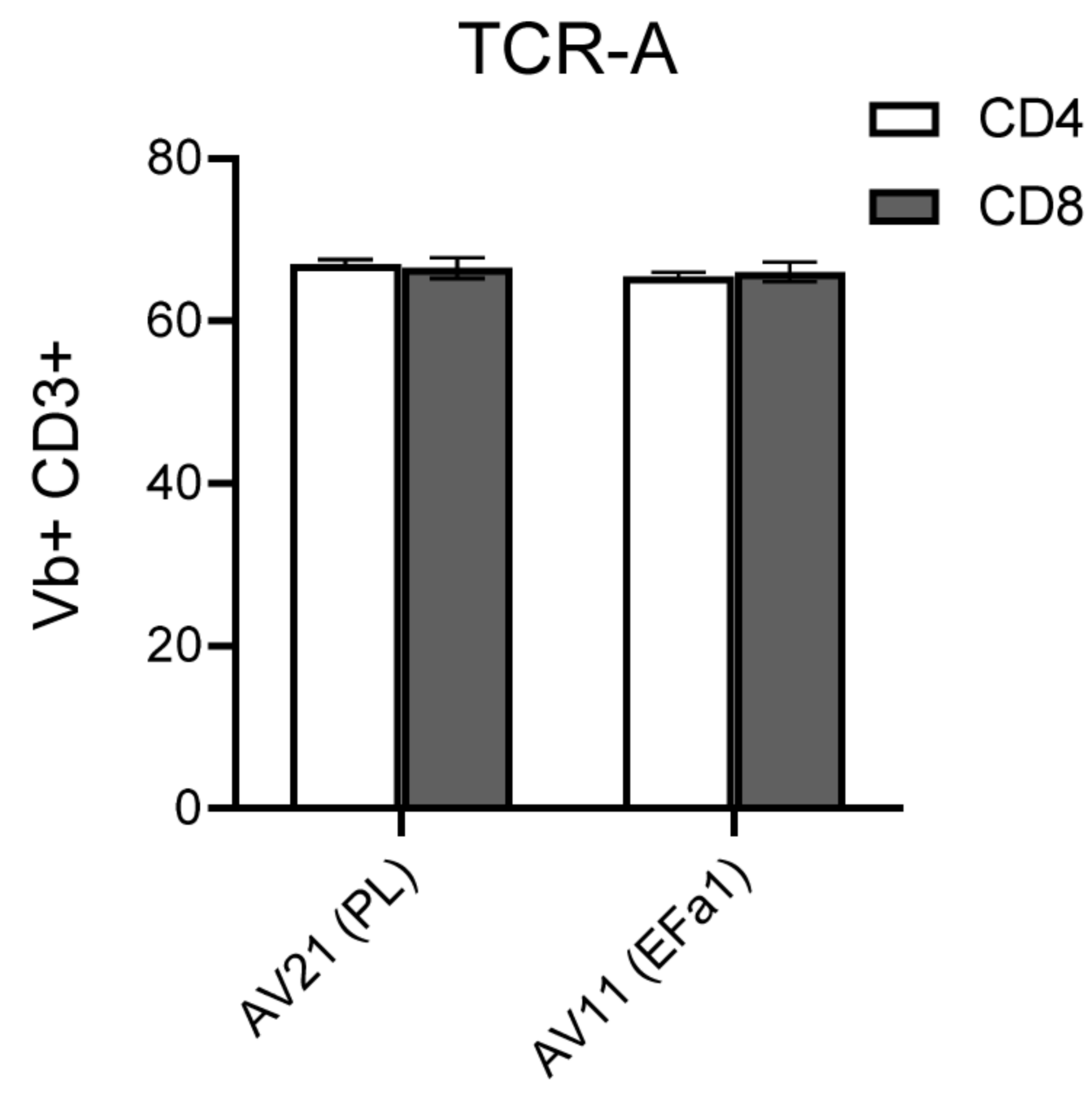
【圖15B】



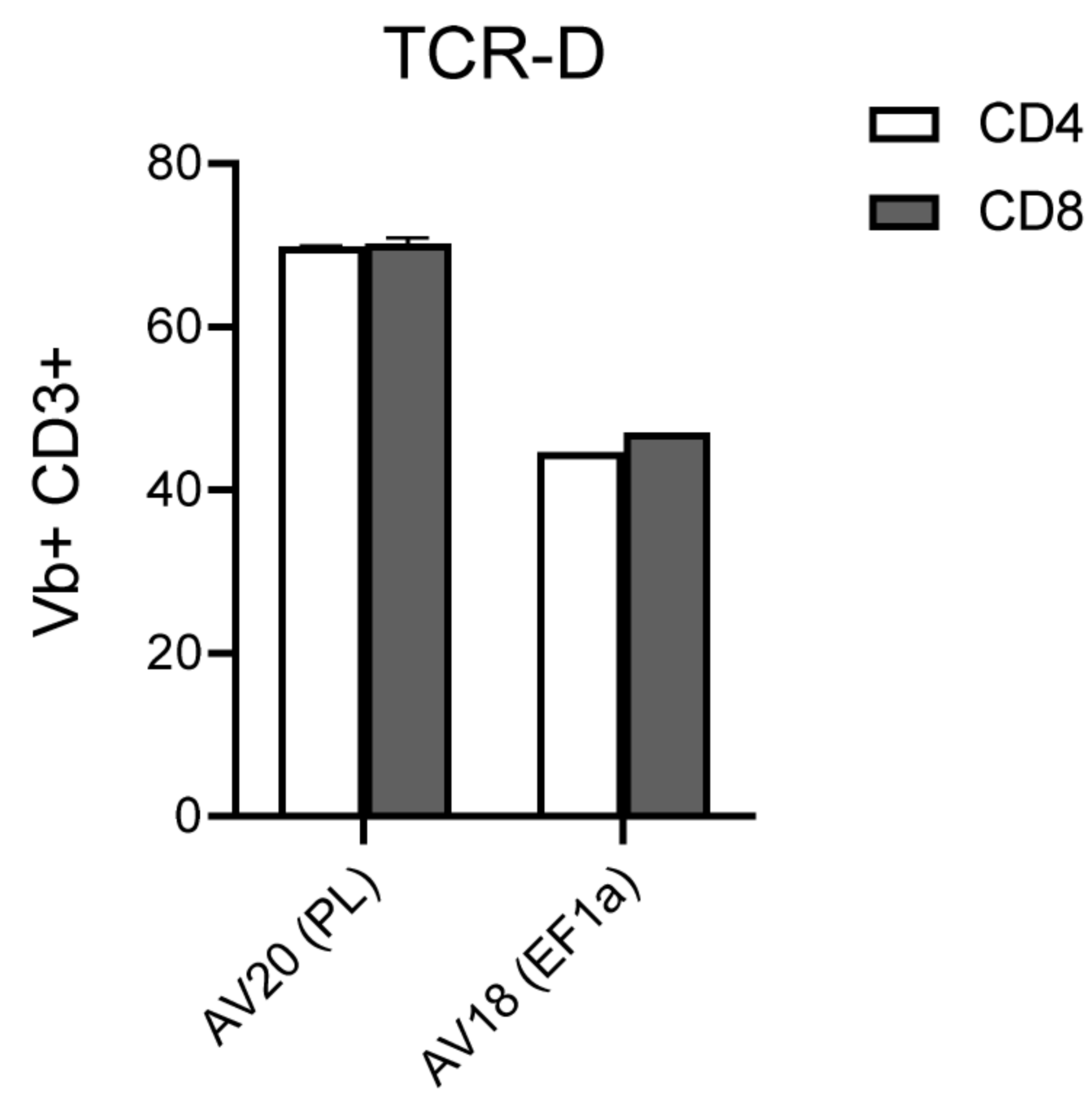
【圖16A】

【圖16B】

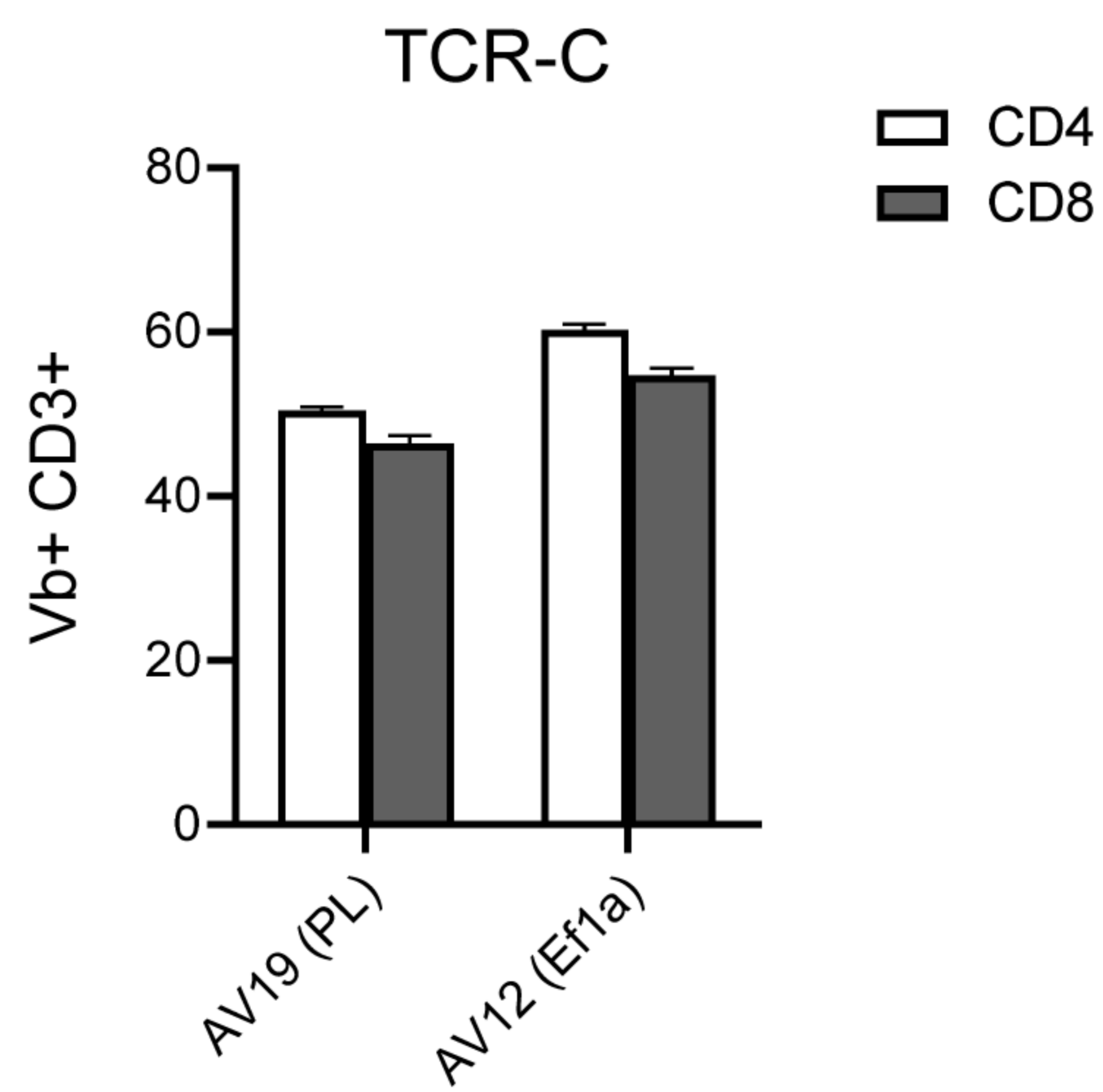
【圖16C】



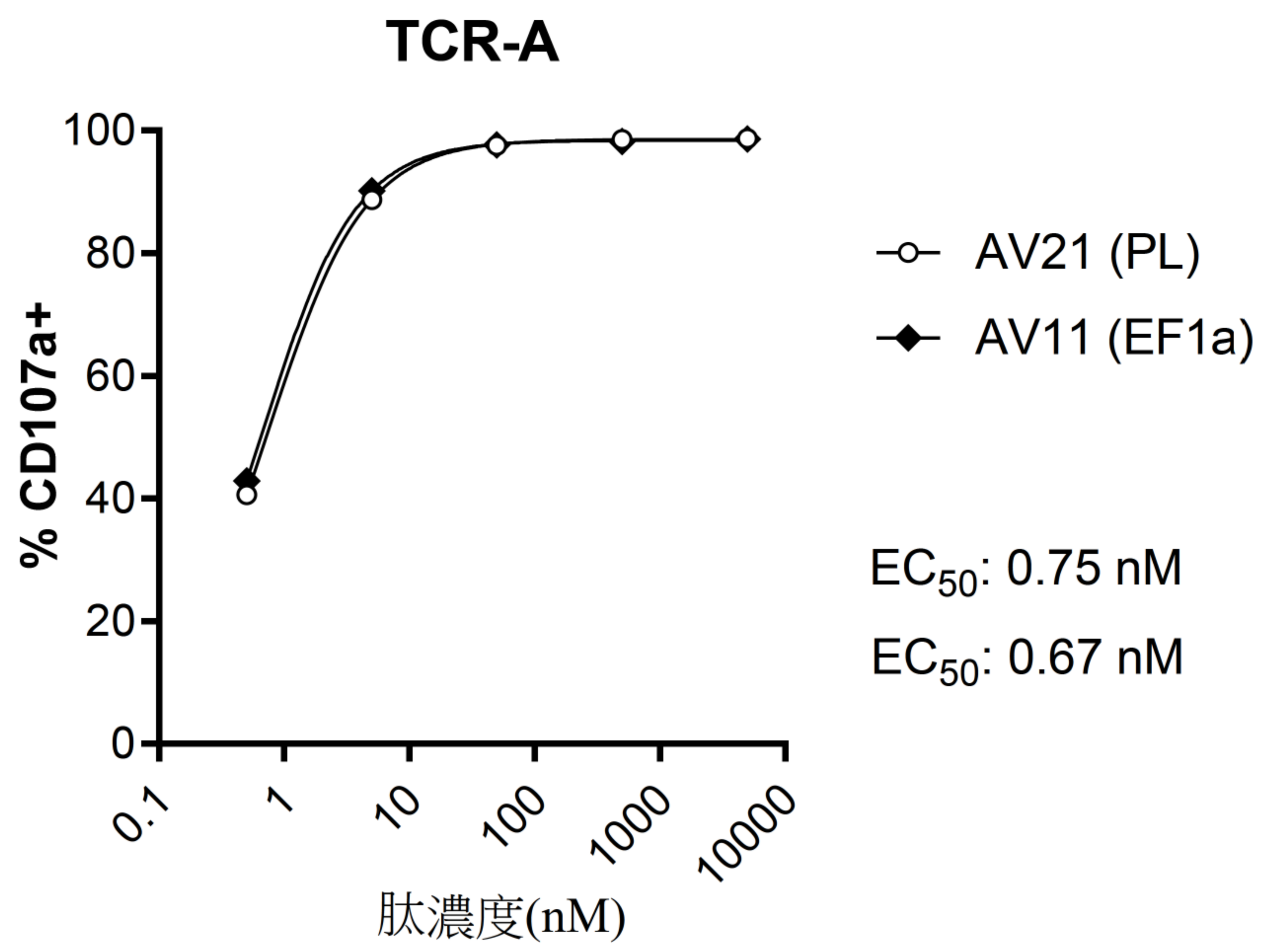
【圖17A】



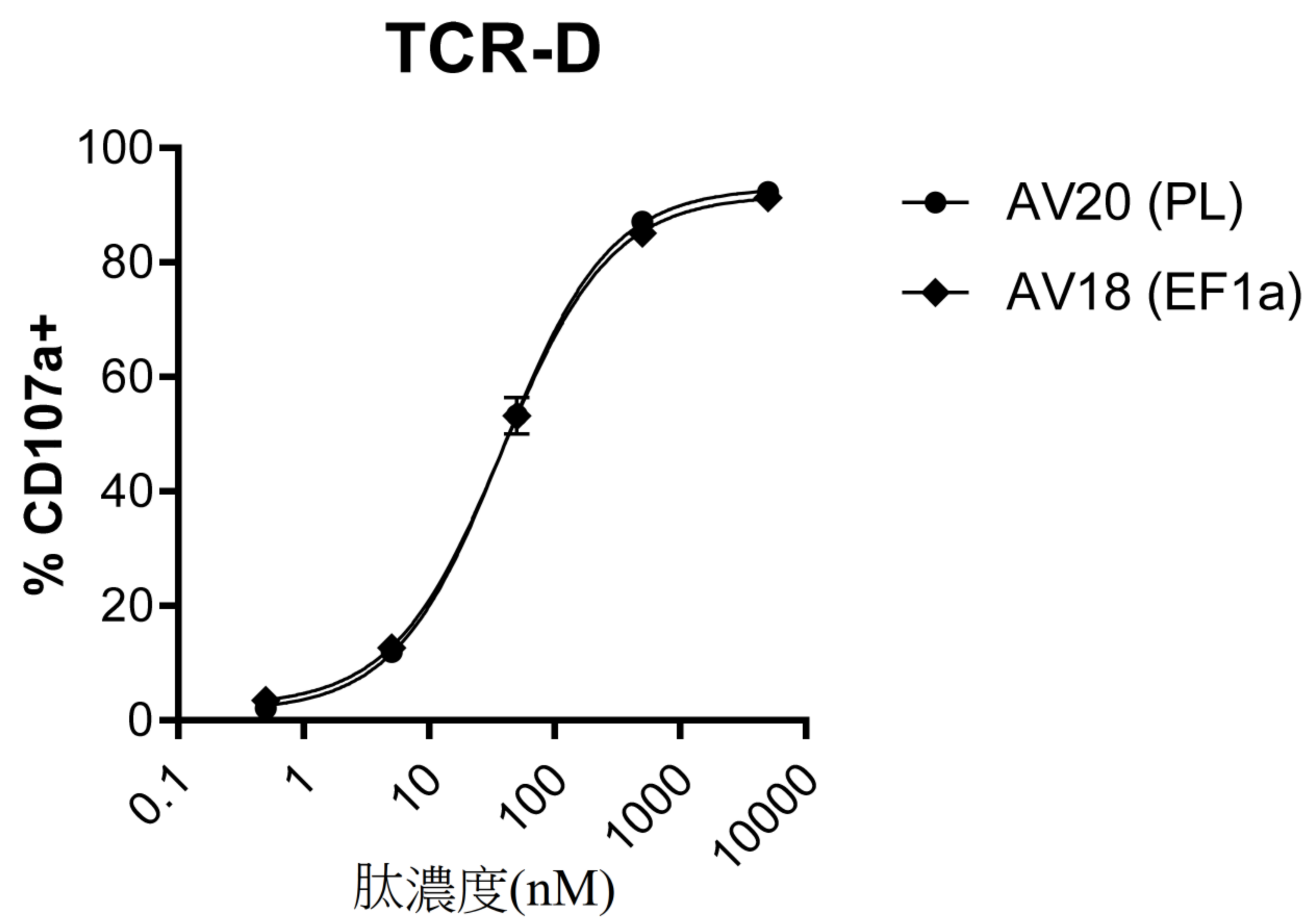
【圖17B】



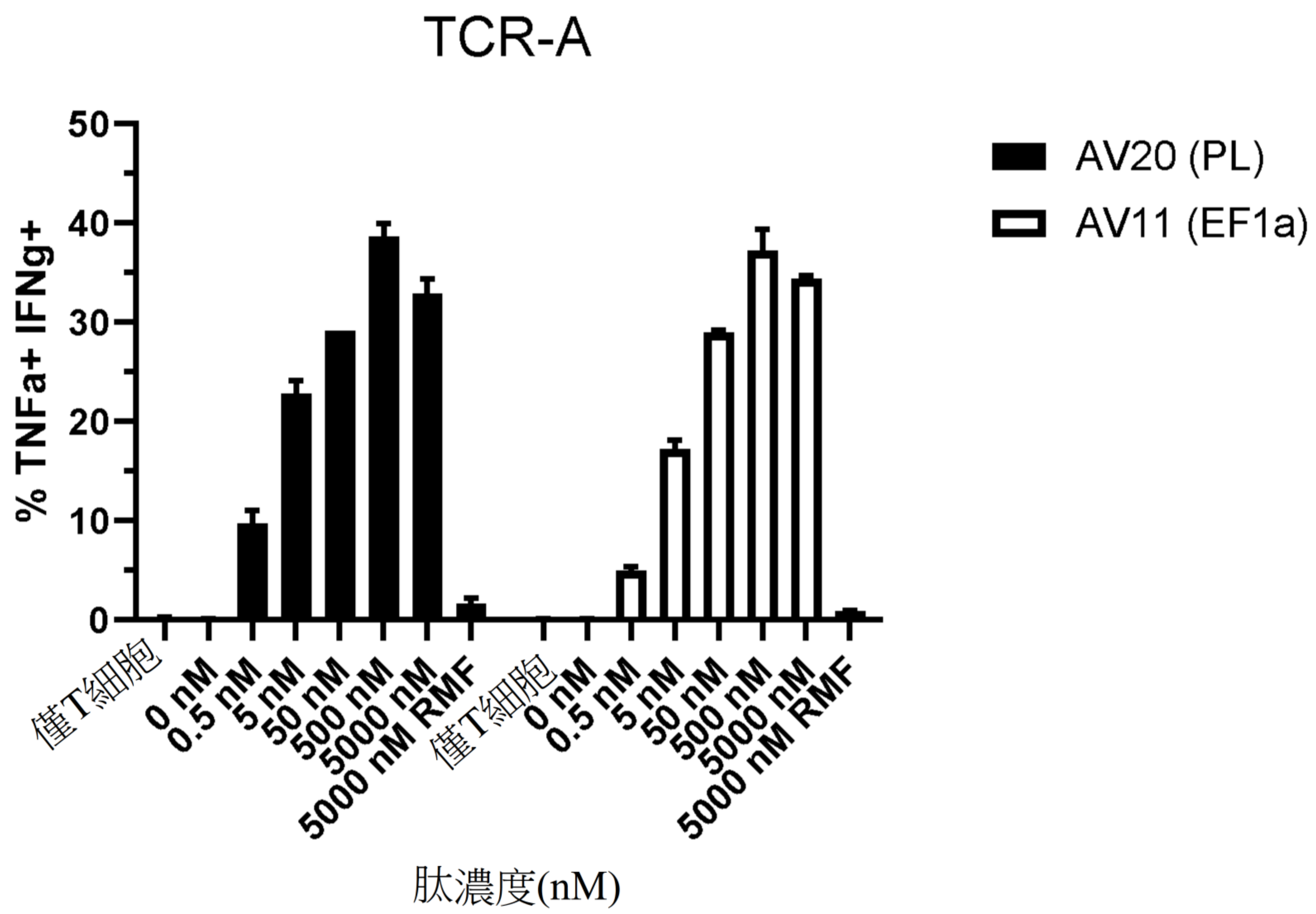
【圖17C】



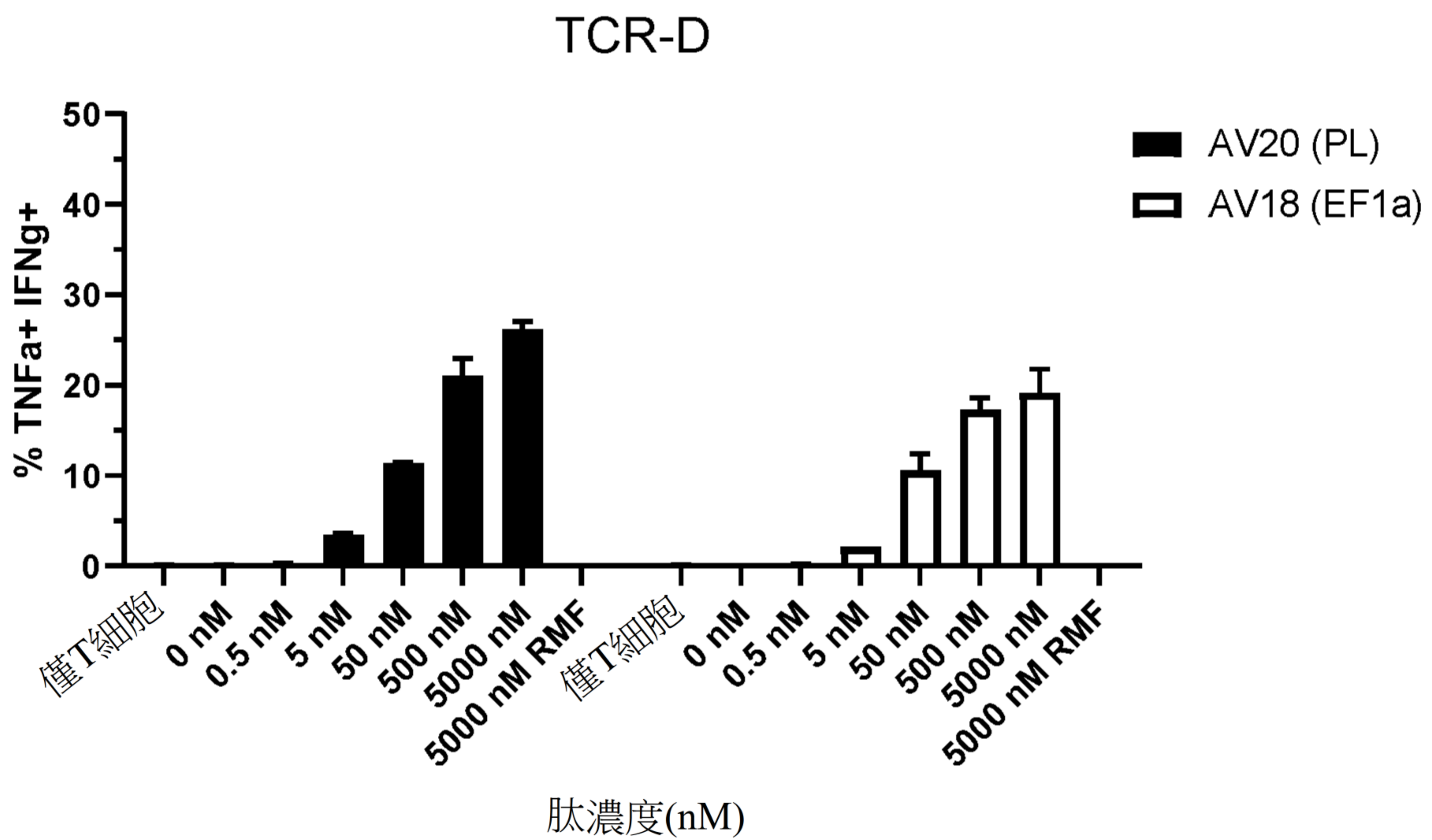
【圖18A】



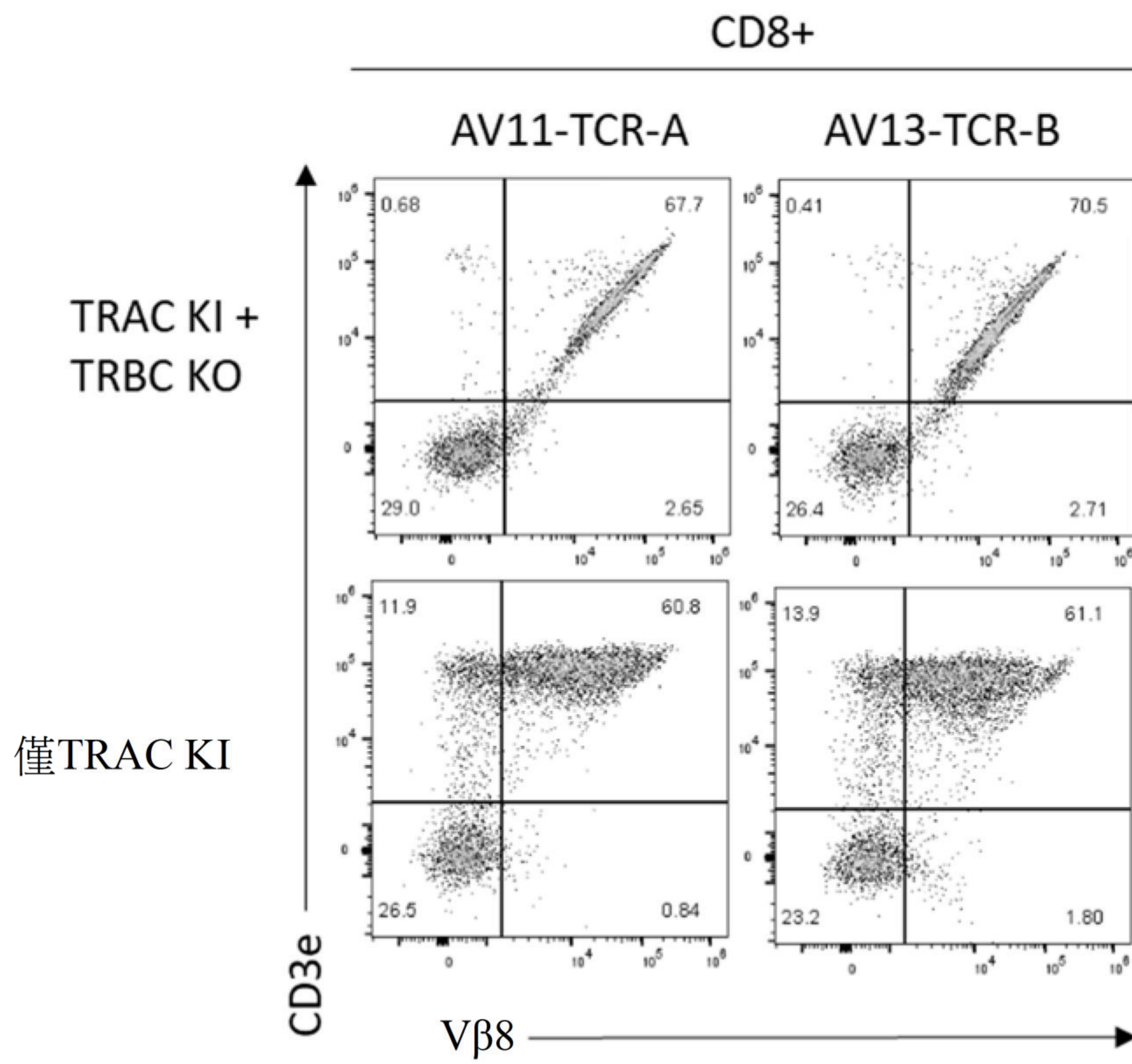
【圖18B】



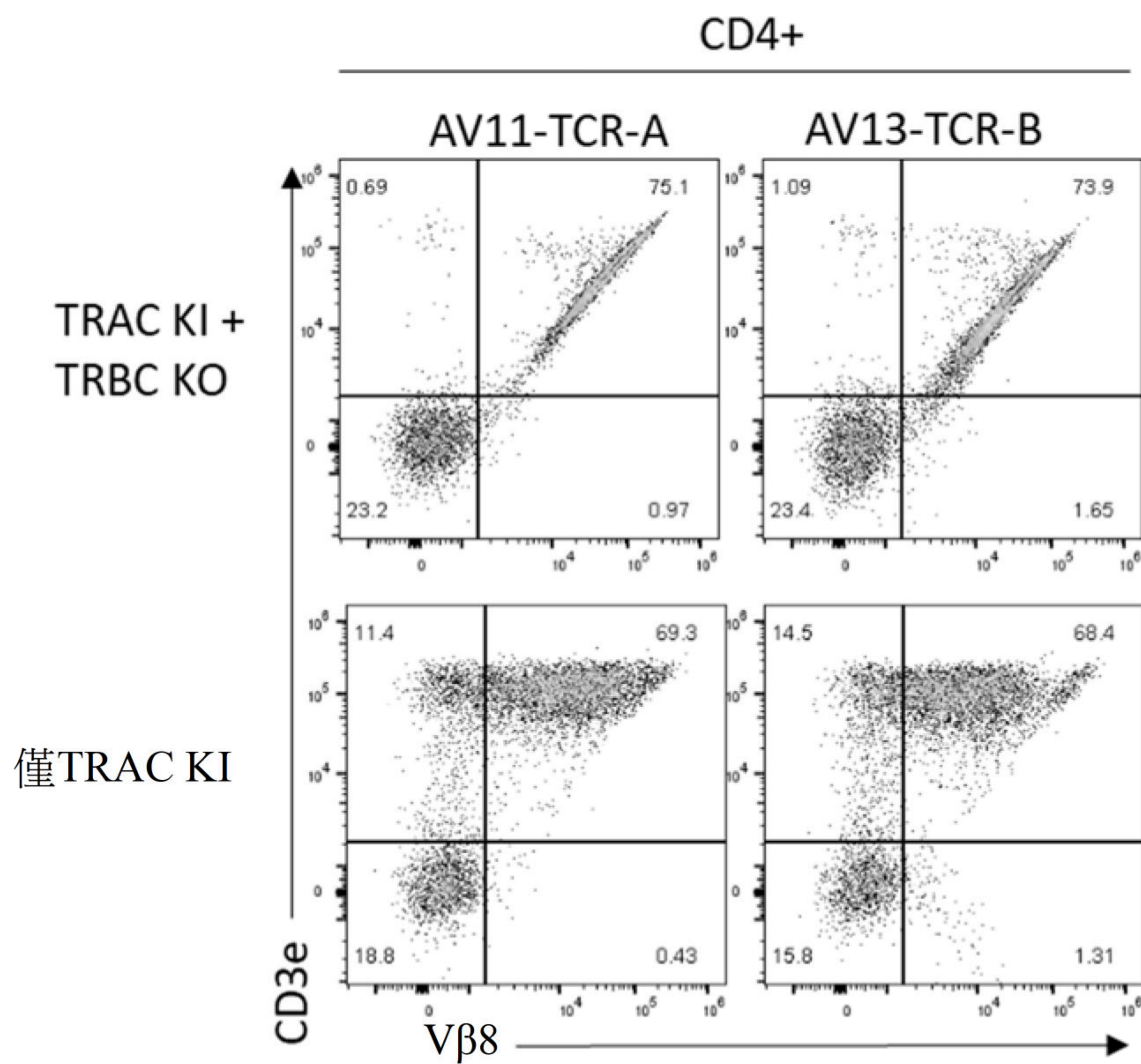
【圖19A】



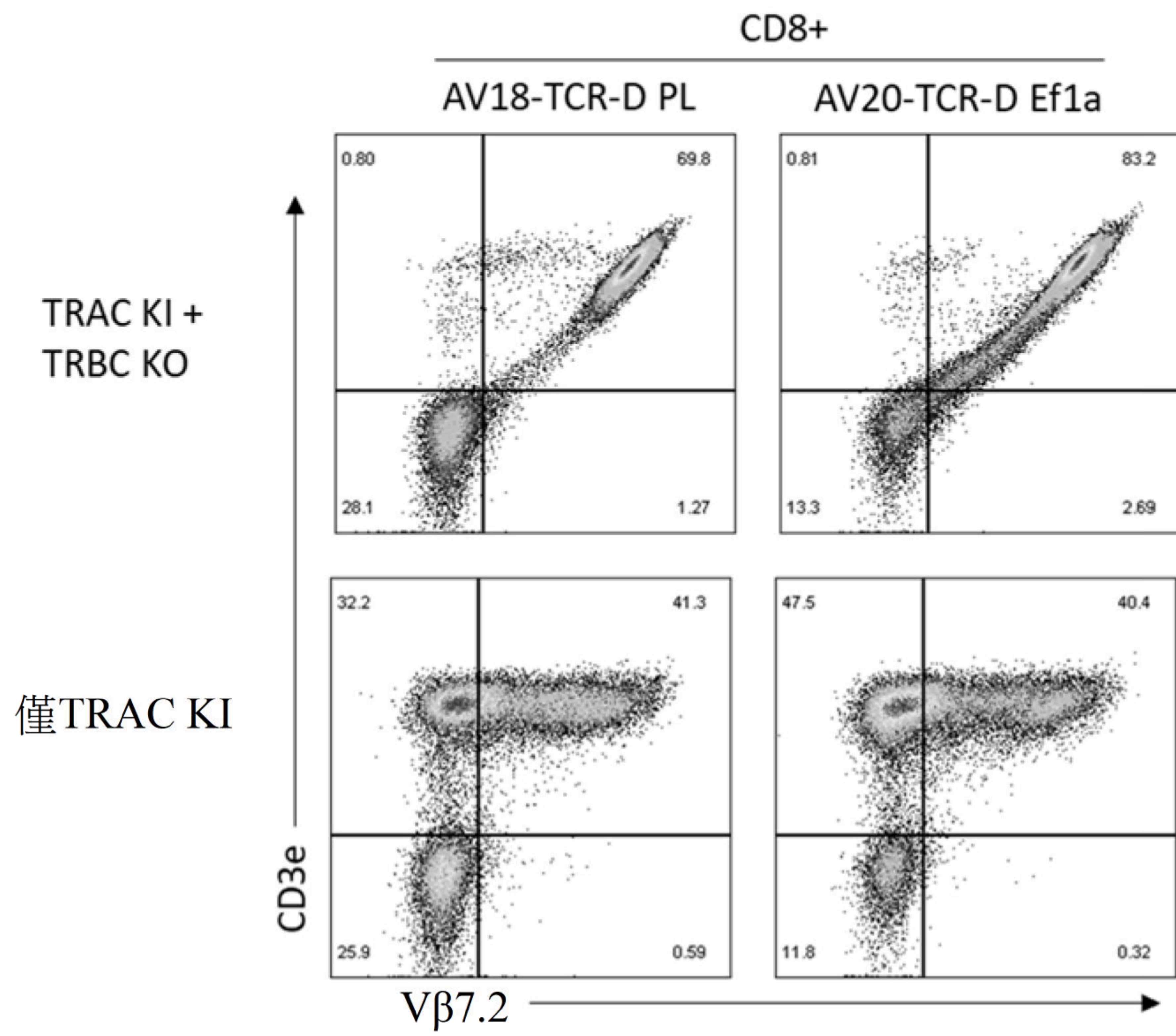
【圖19B】



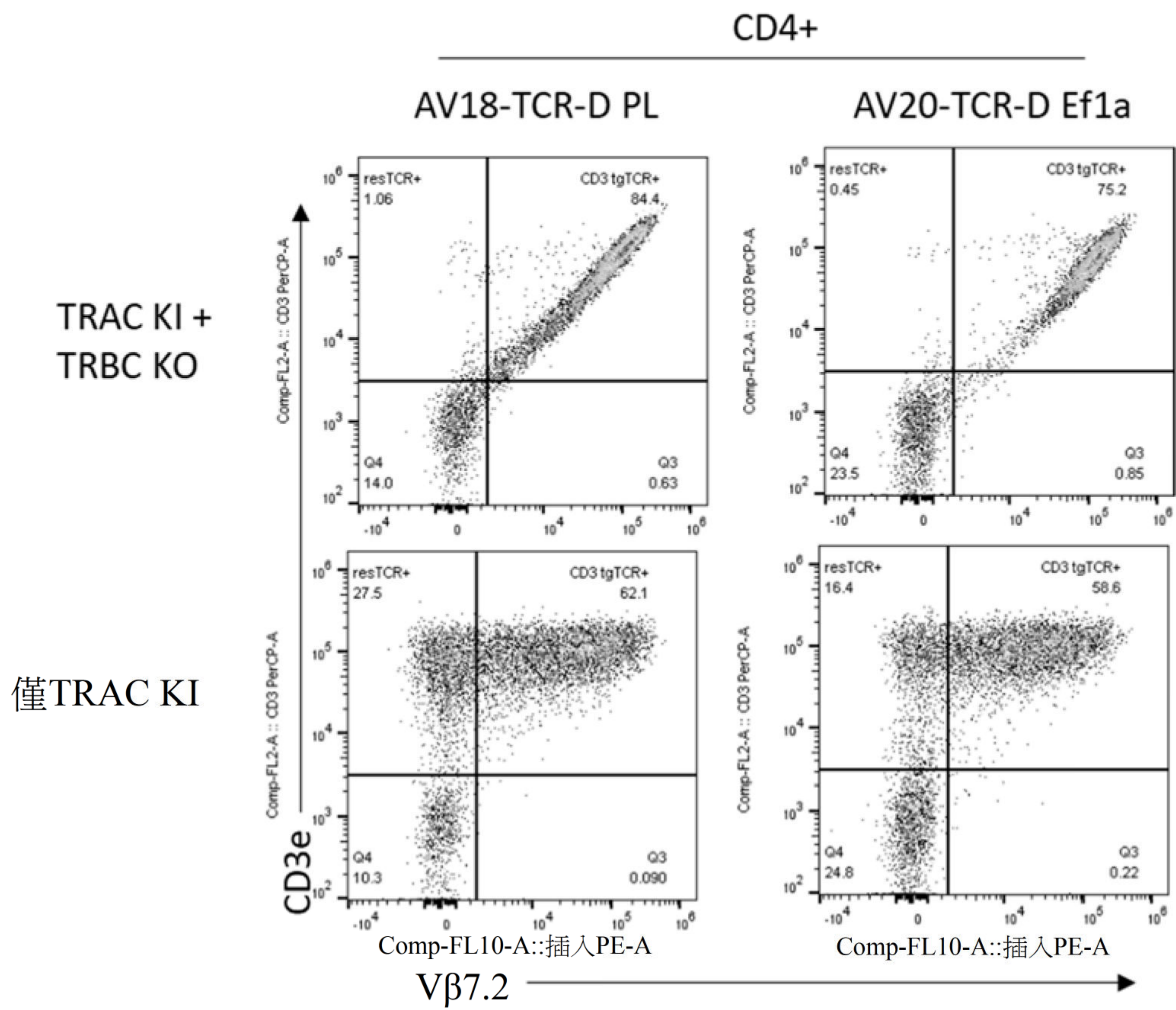
【圖20A】



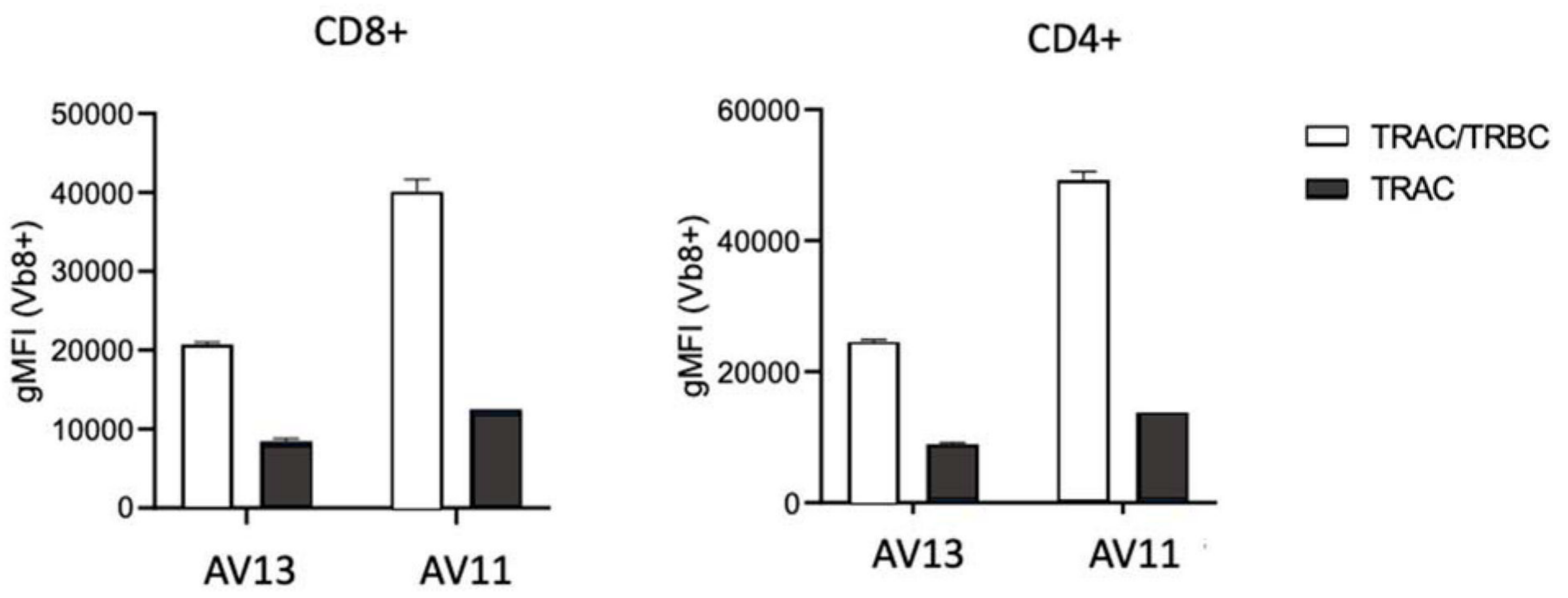
【圖20B】



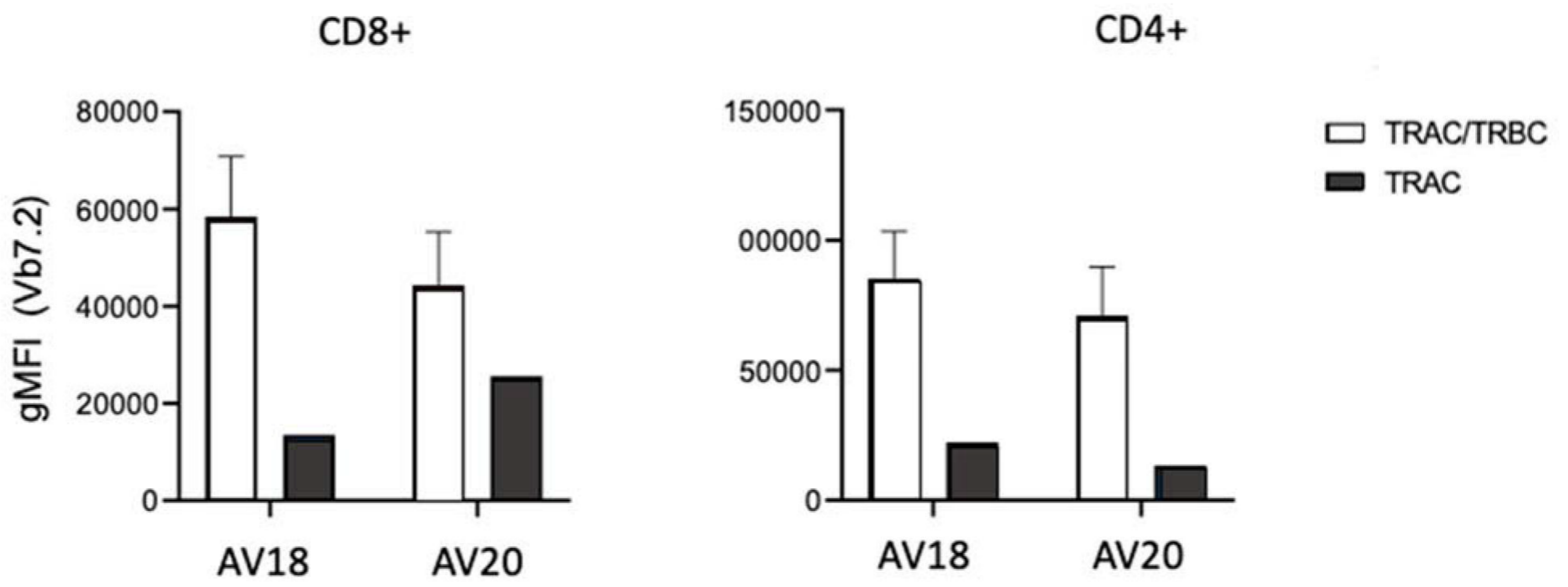
【圖21A】



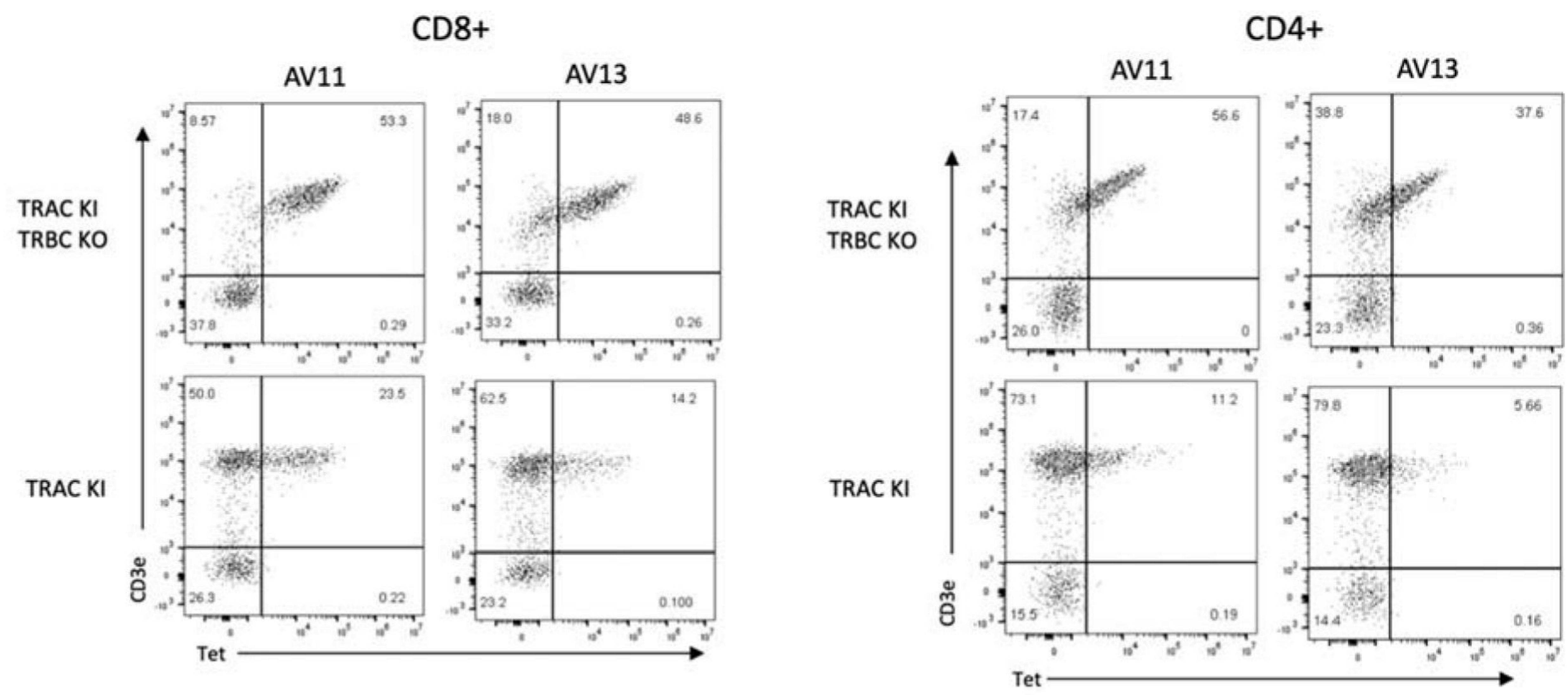
【圖21B】



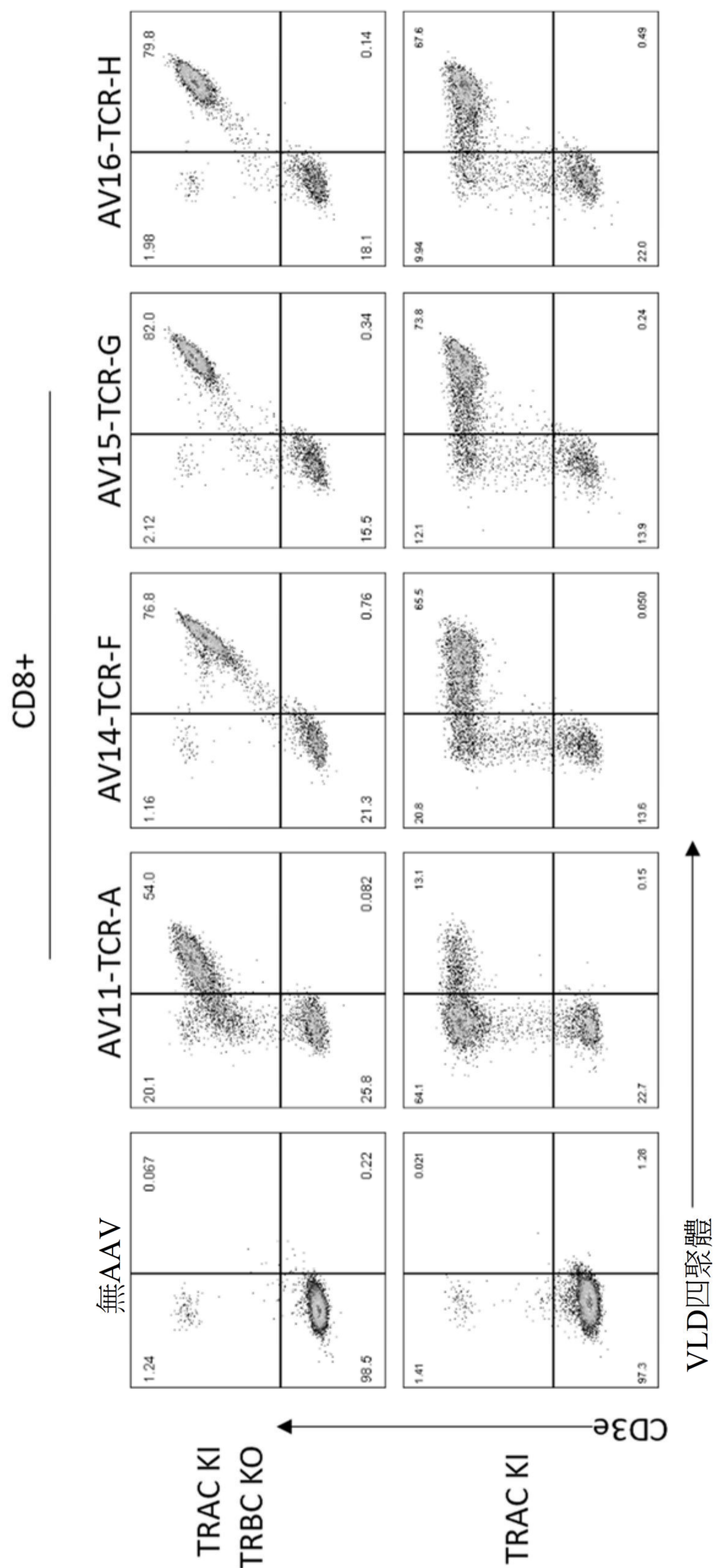
【圖21C】



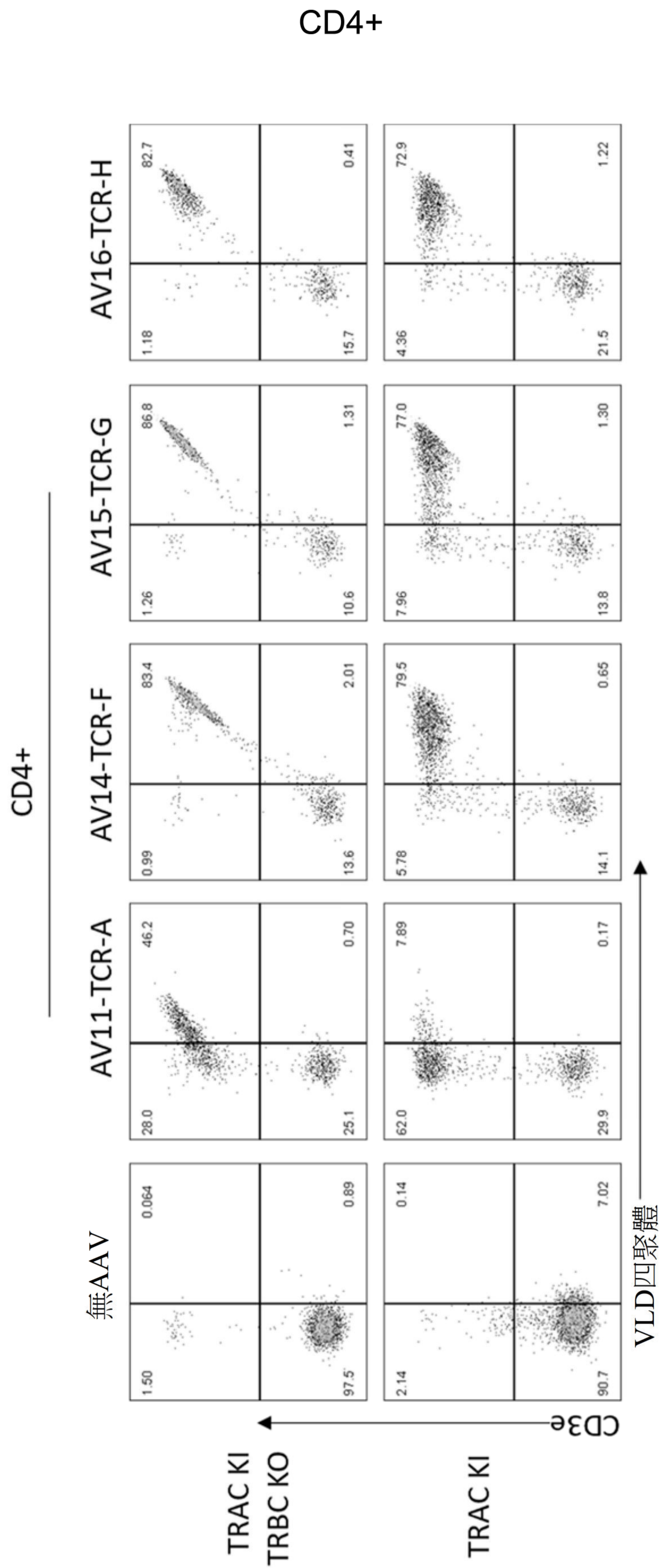
【圖21D】



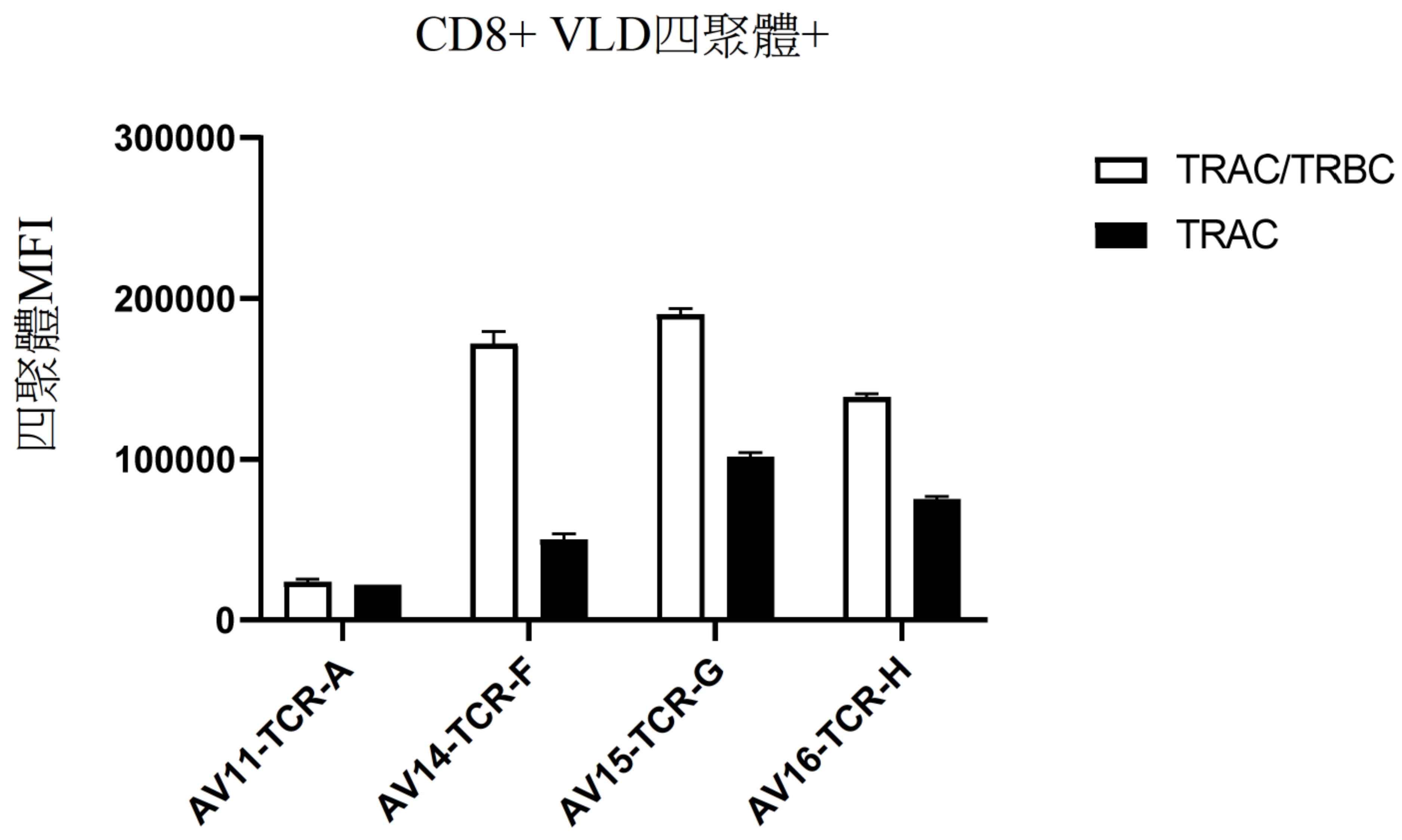
【圖22】



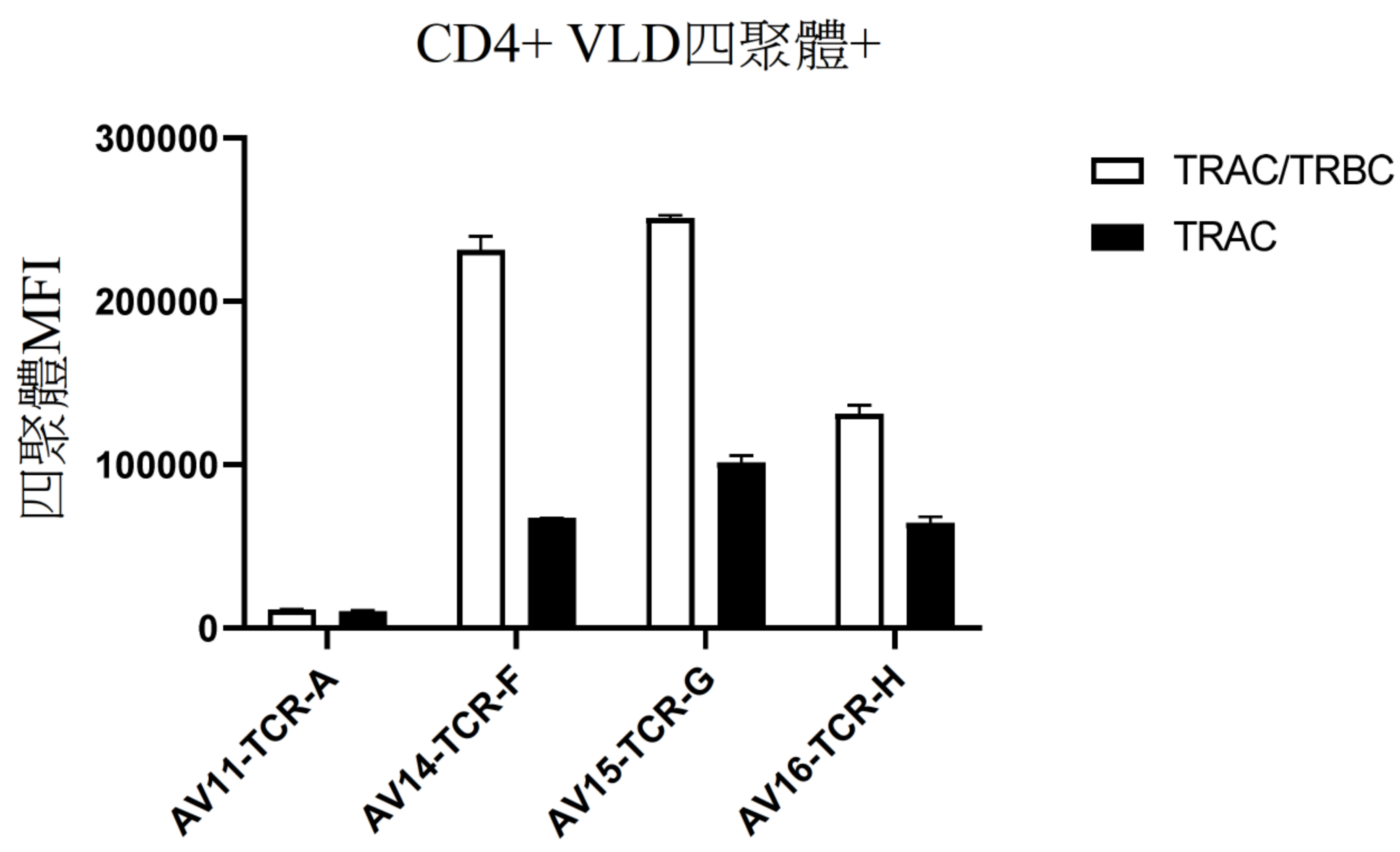
【圖23】



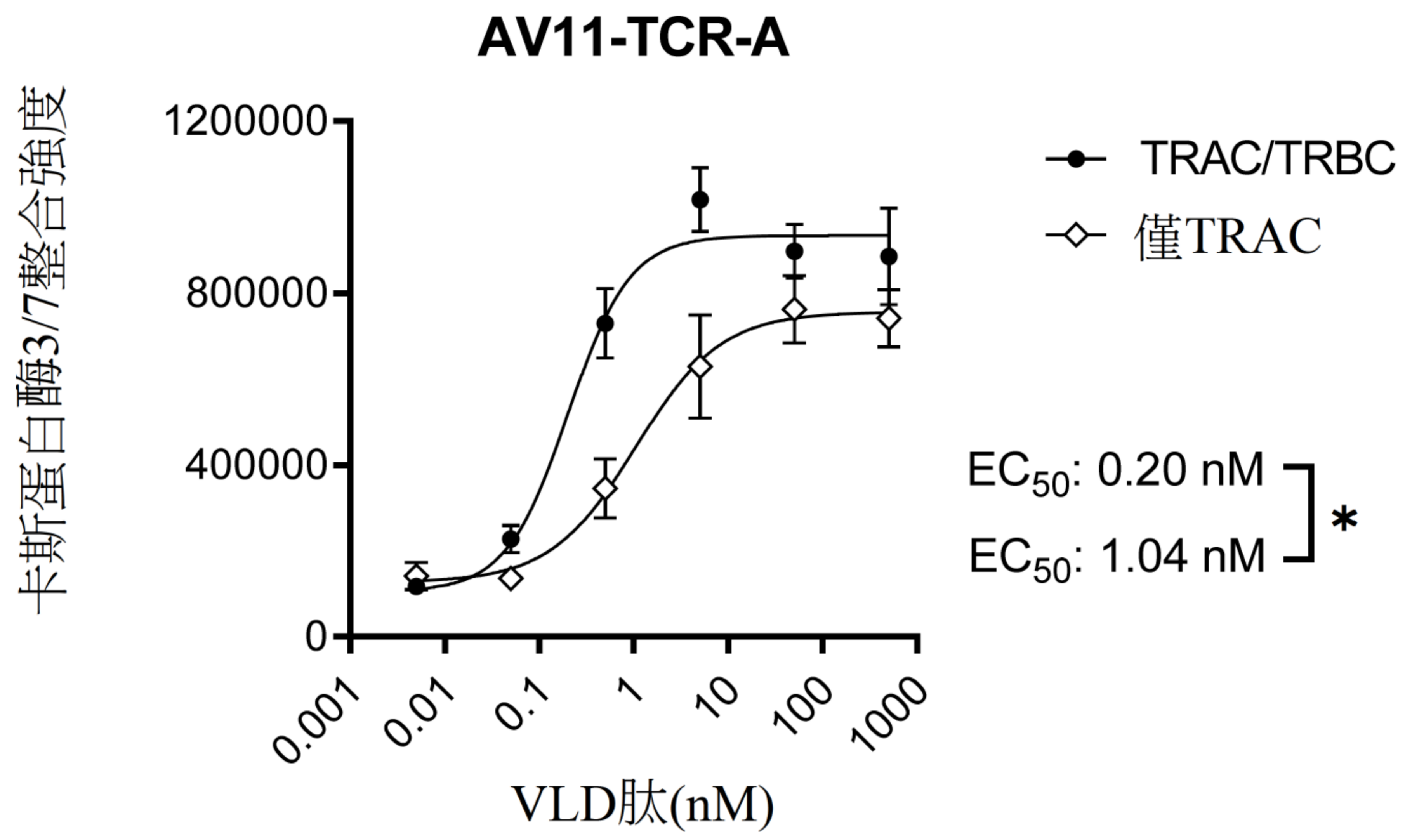
【圖24】



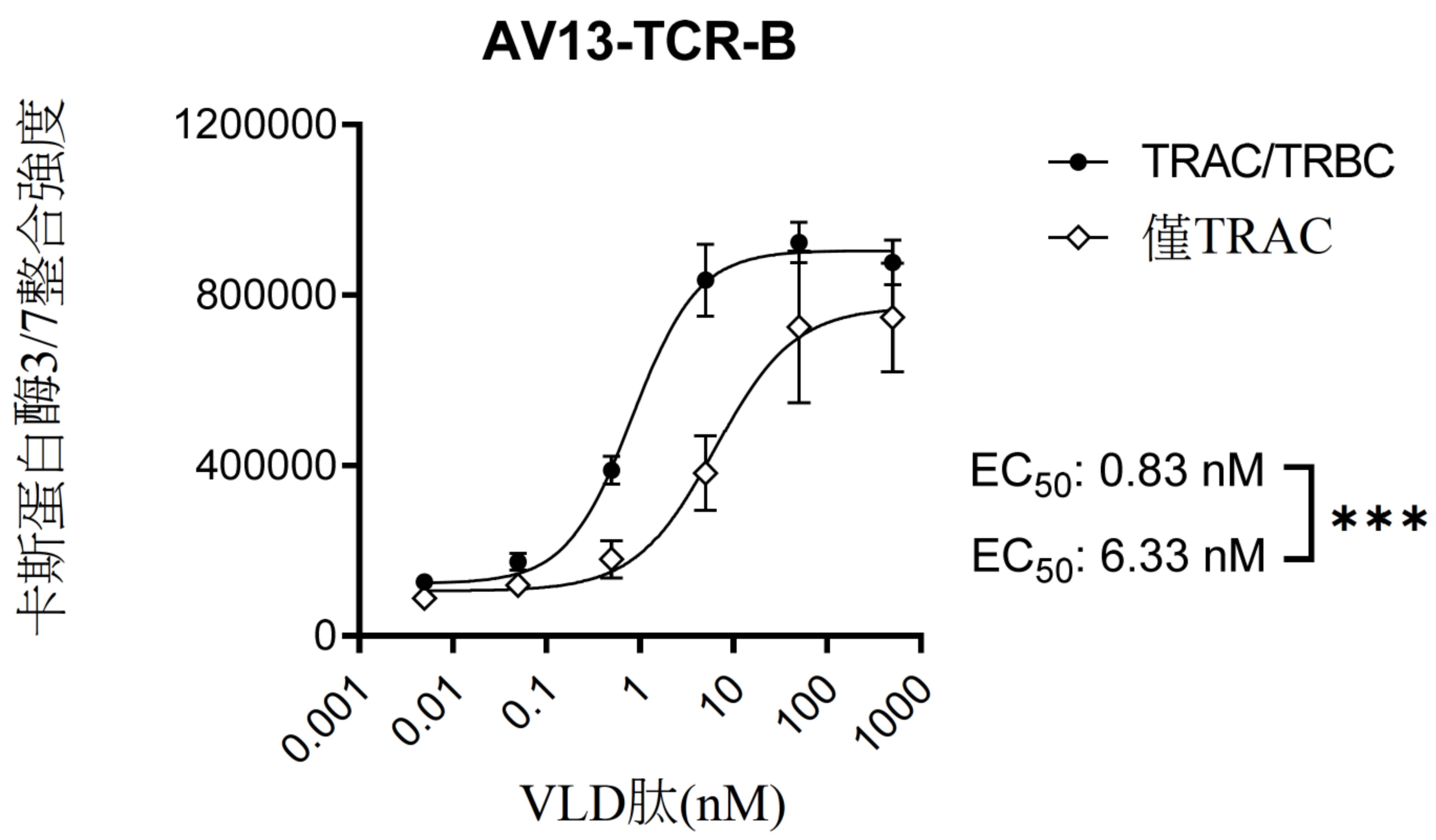
【圖25】



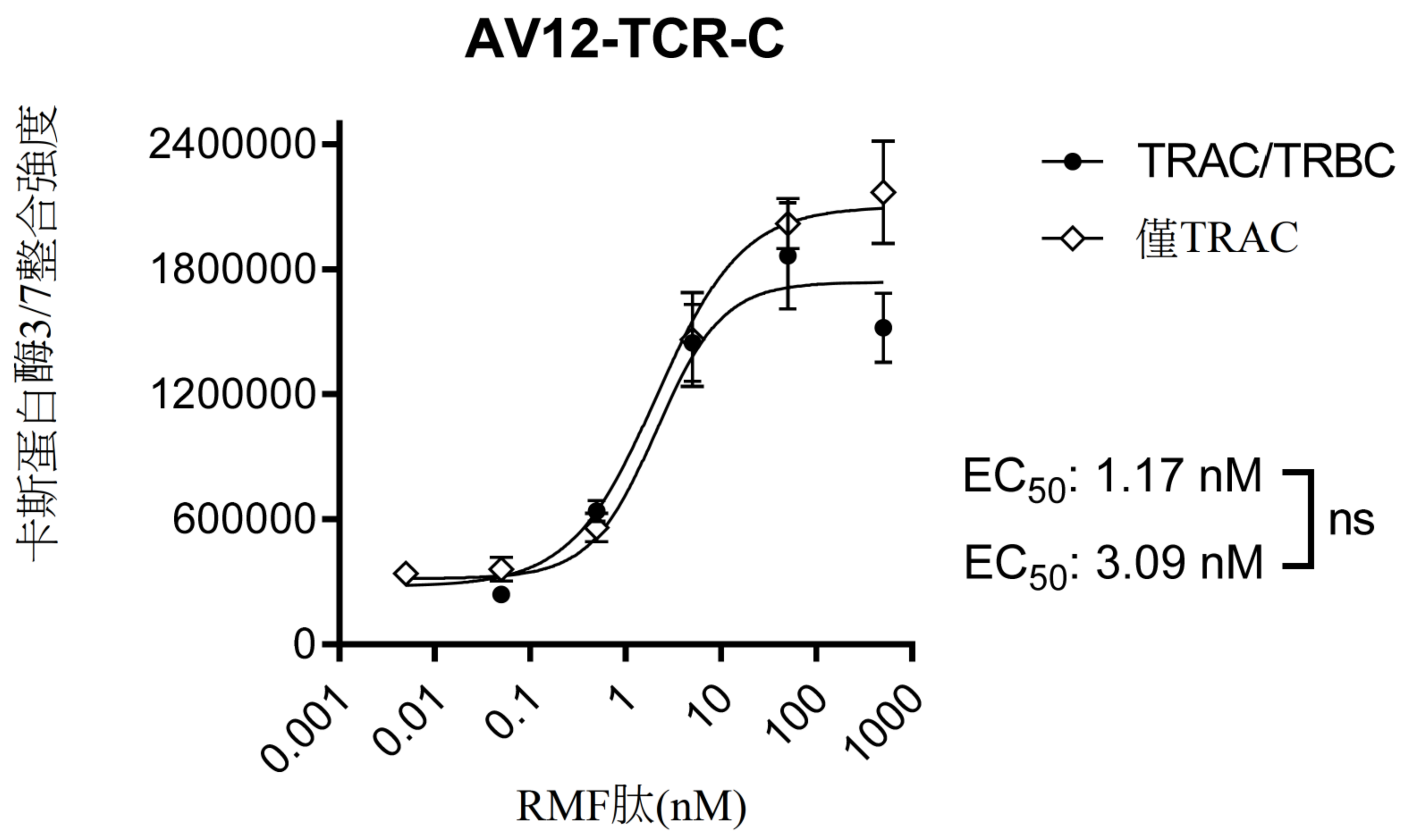
【圖26】



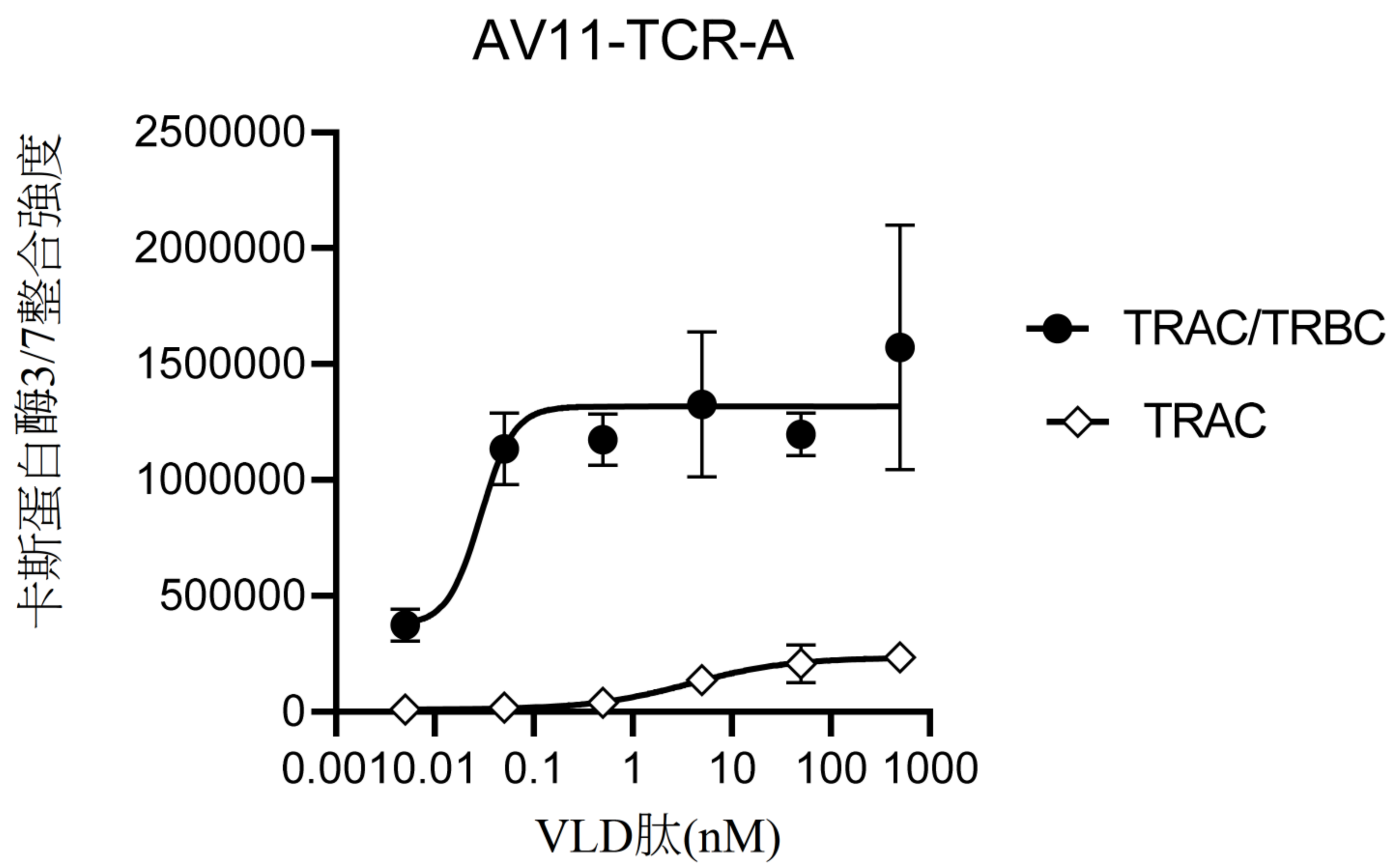
【圖27A】



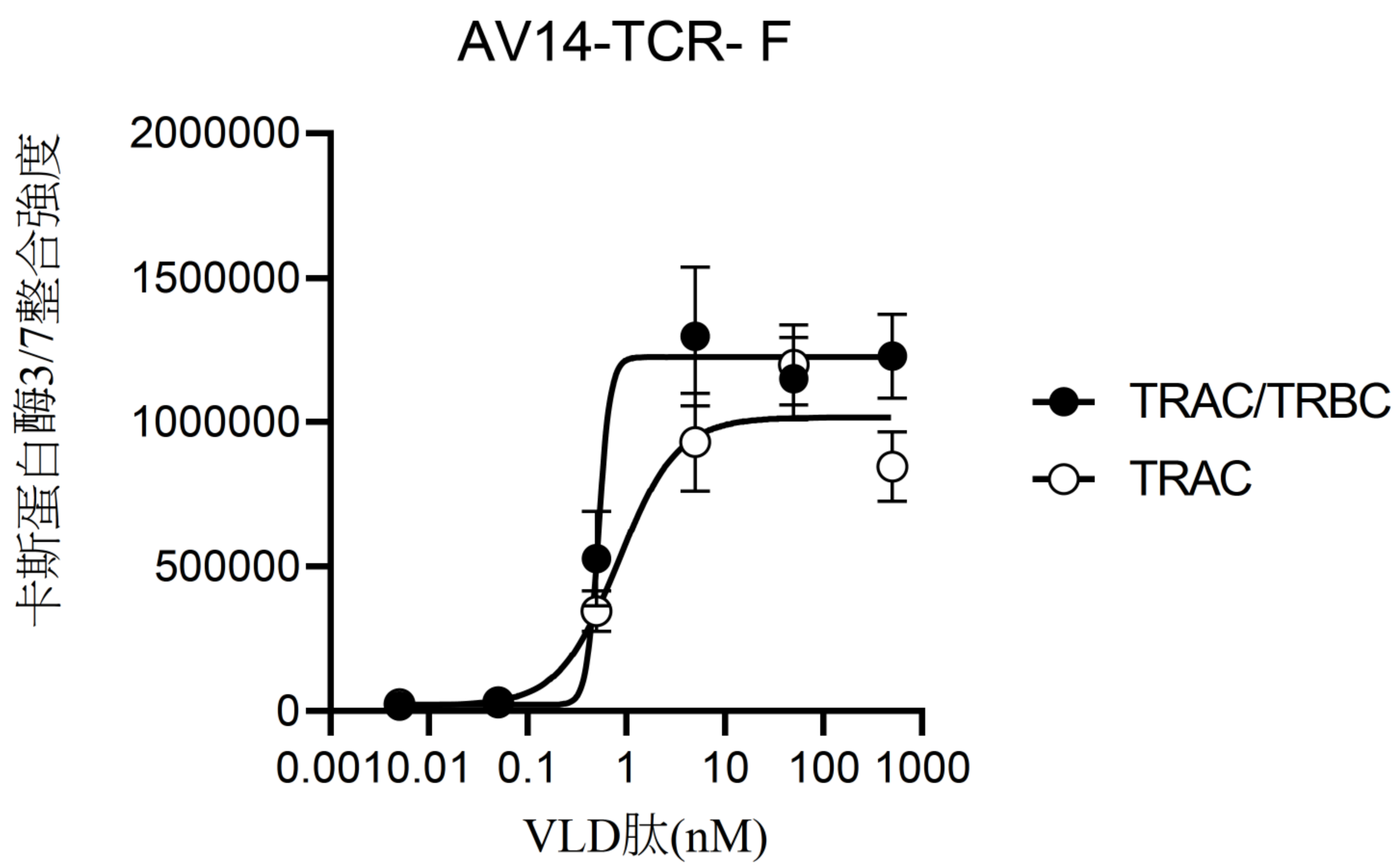
【圖27B】



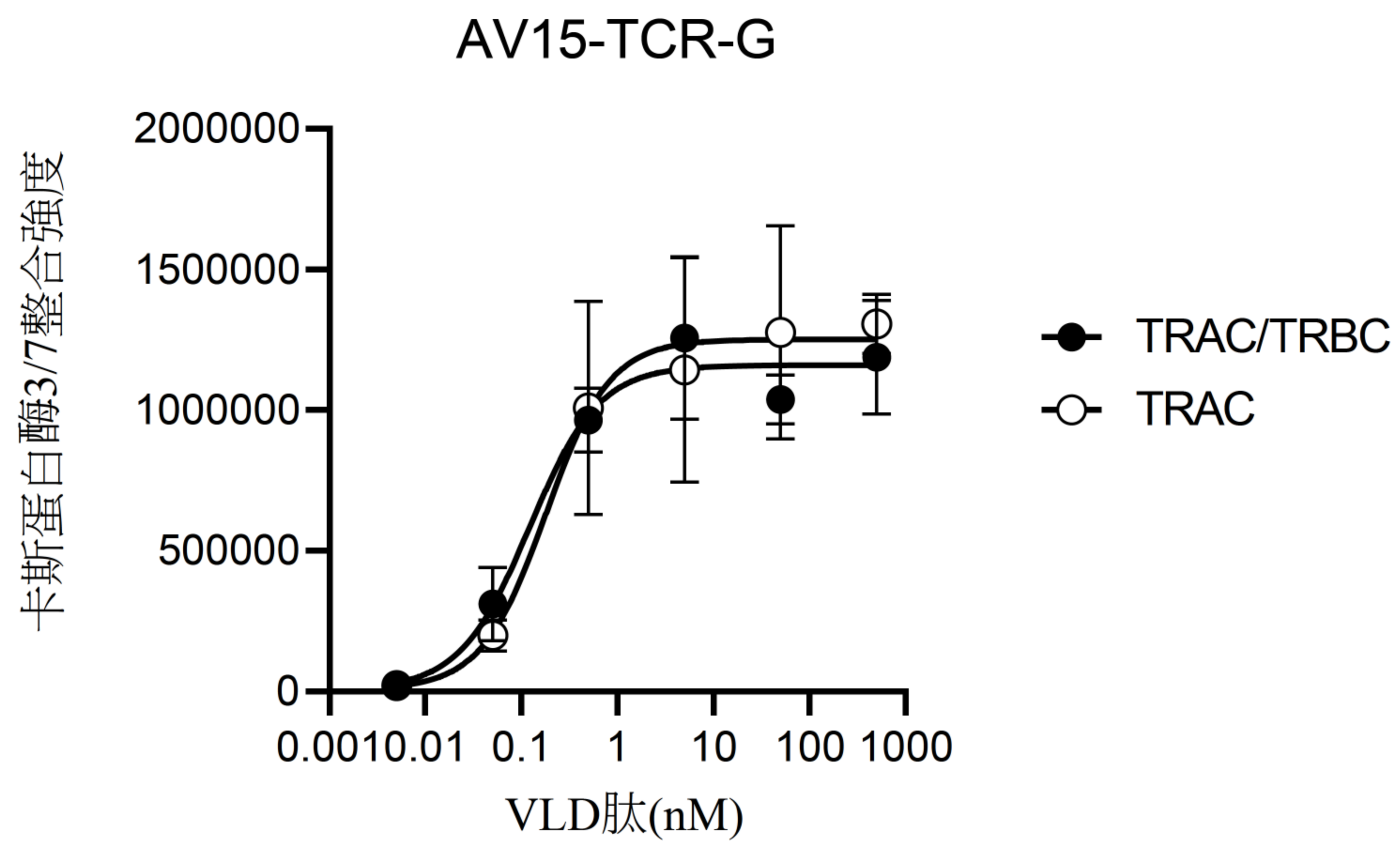
【圖27C】



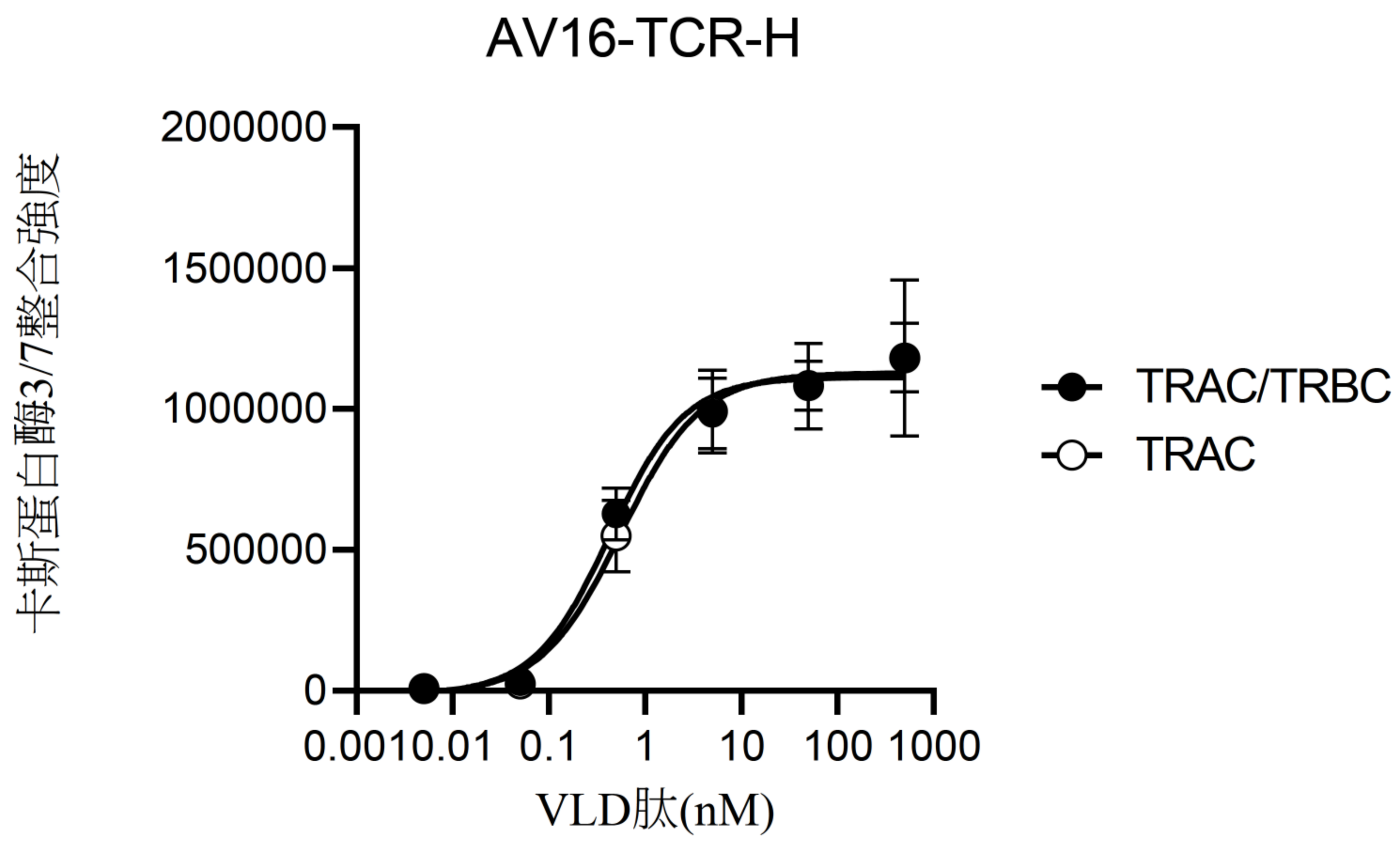
【圖28A】



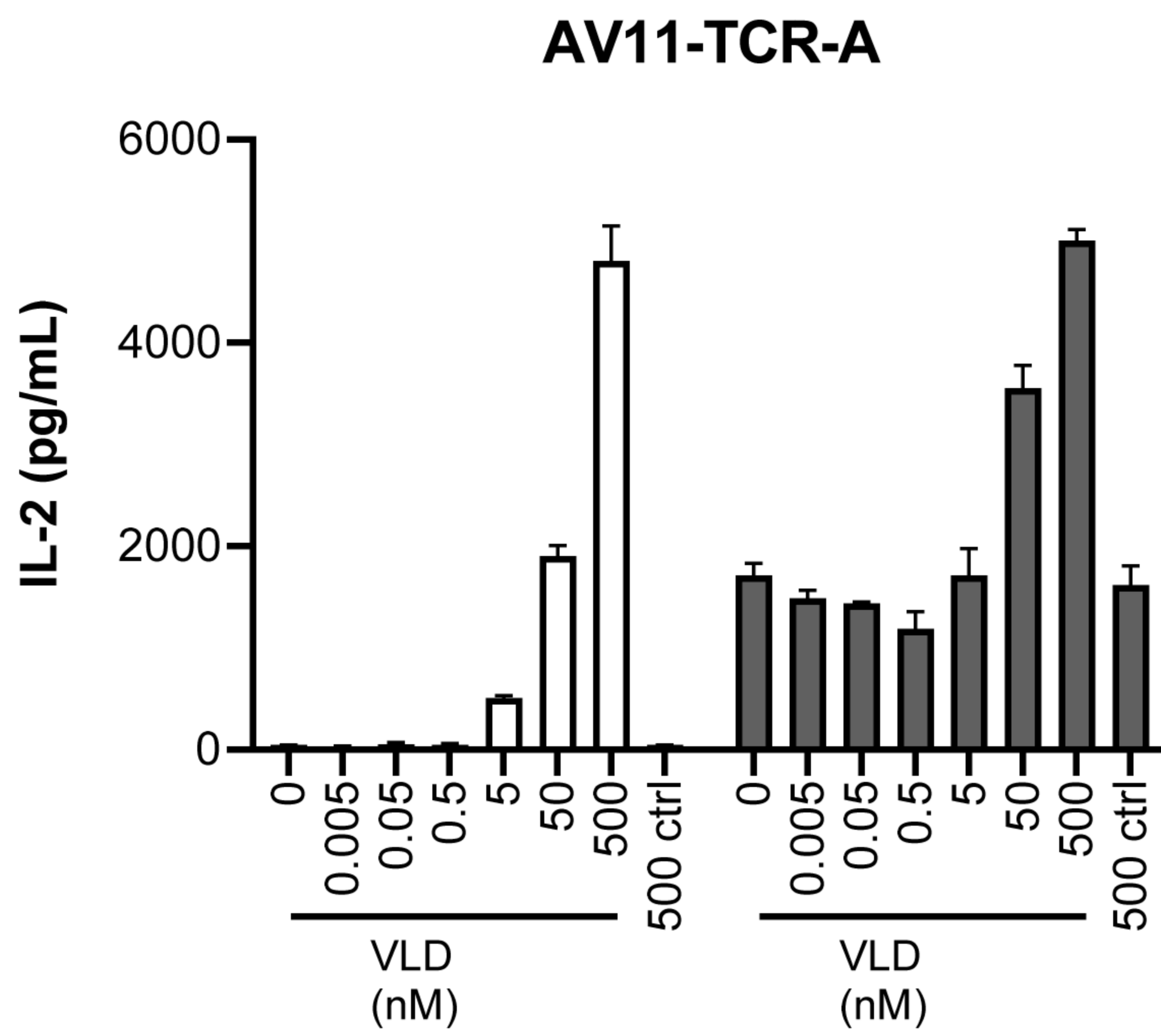
【圖28B】



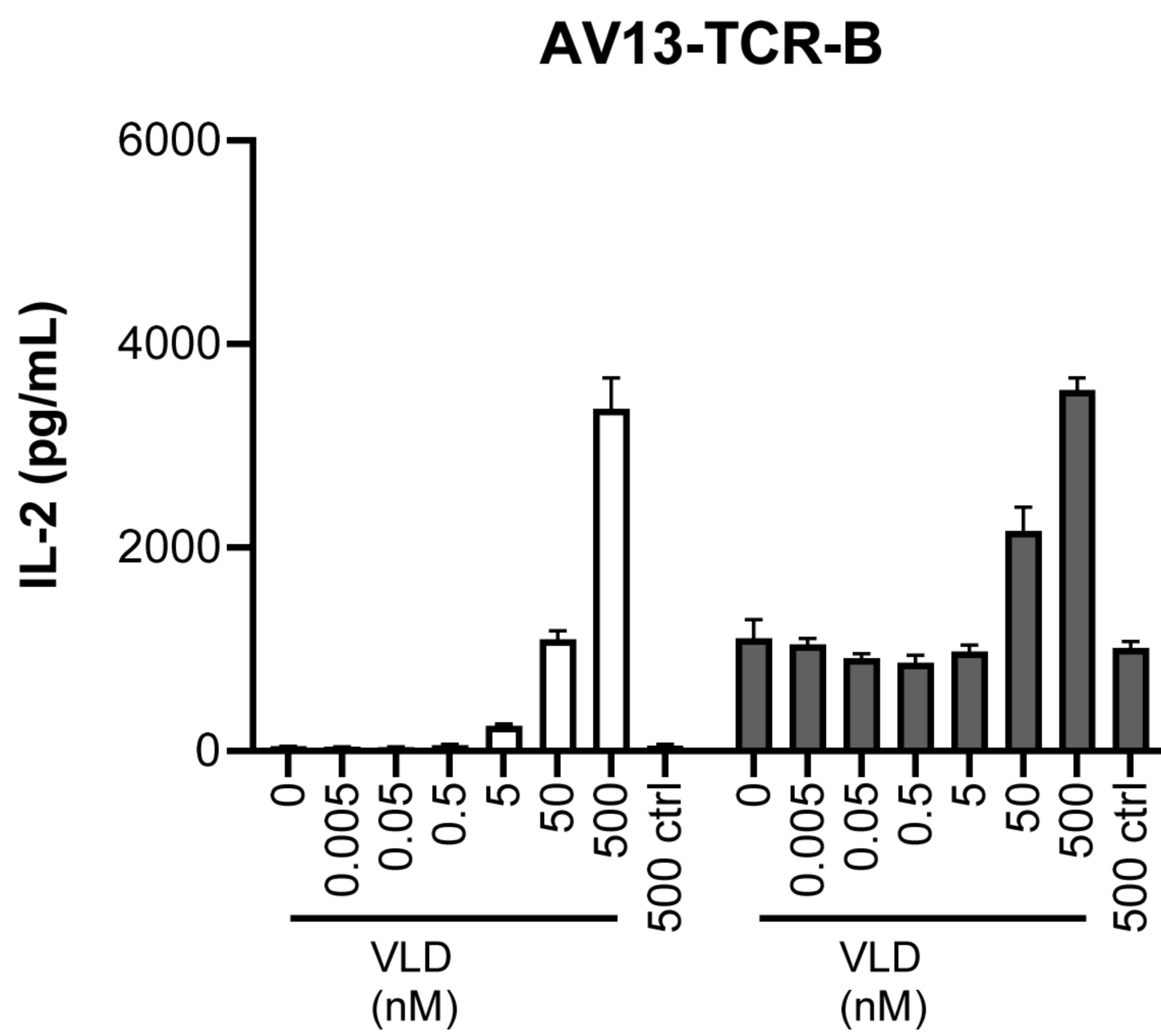
【圖28C】



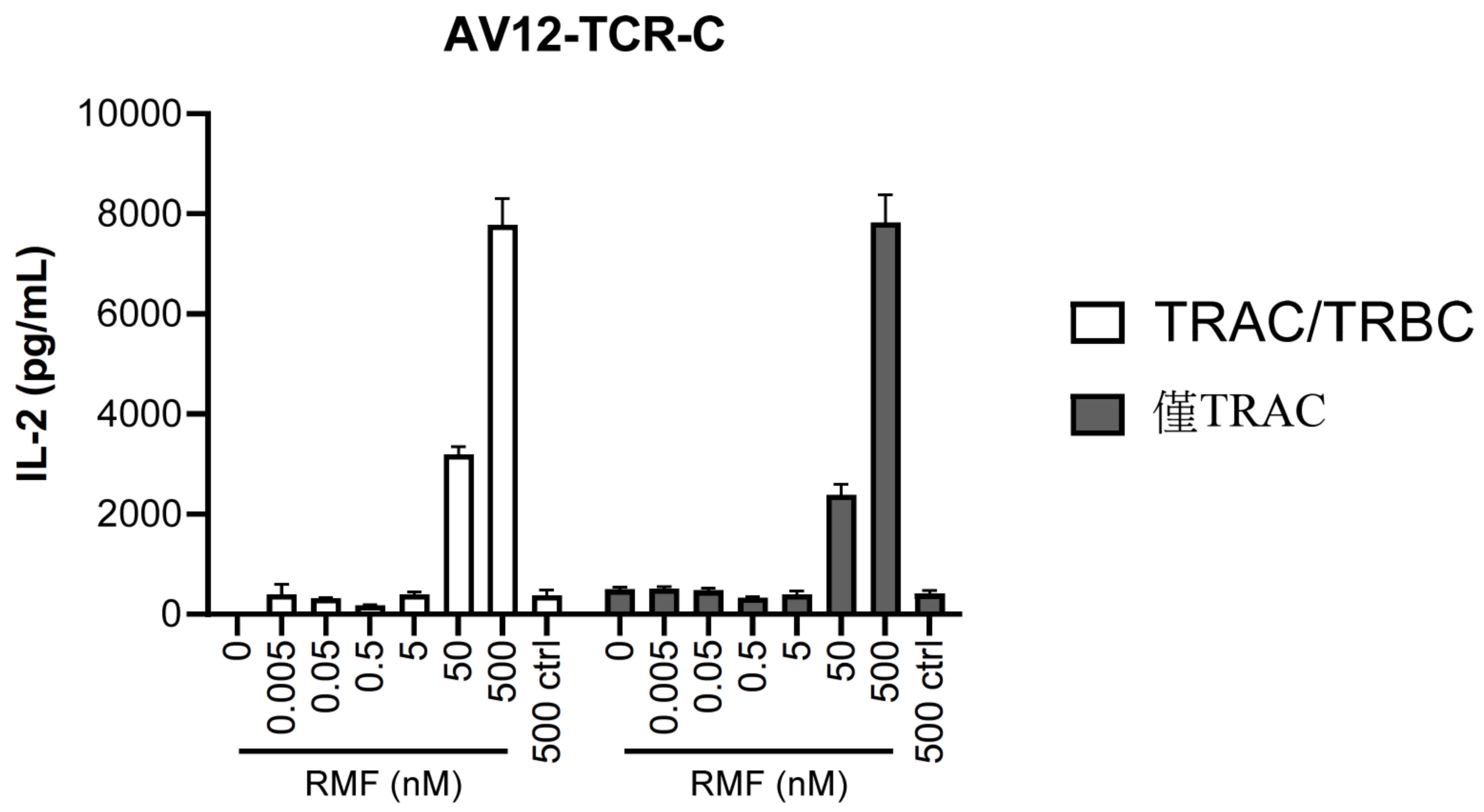
【圖28D】



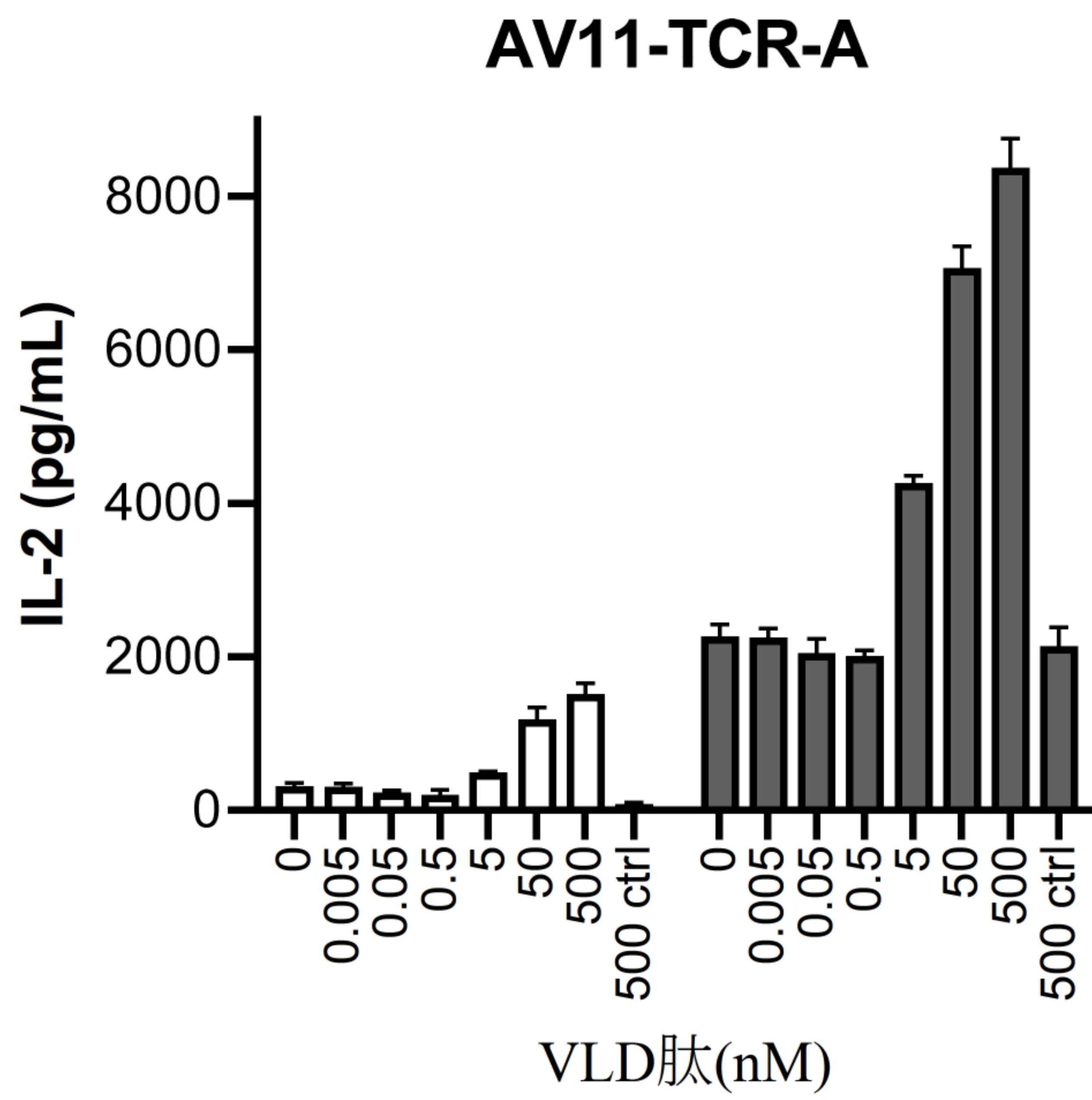
【圖29A】



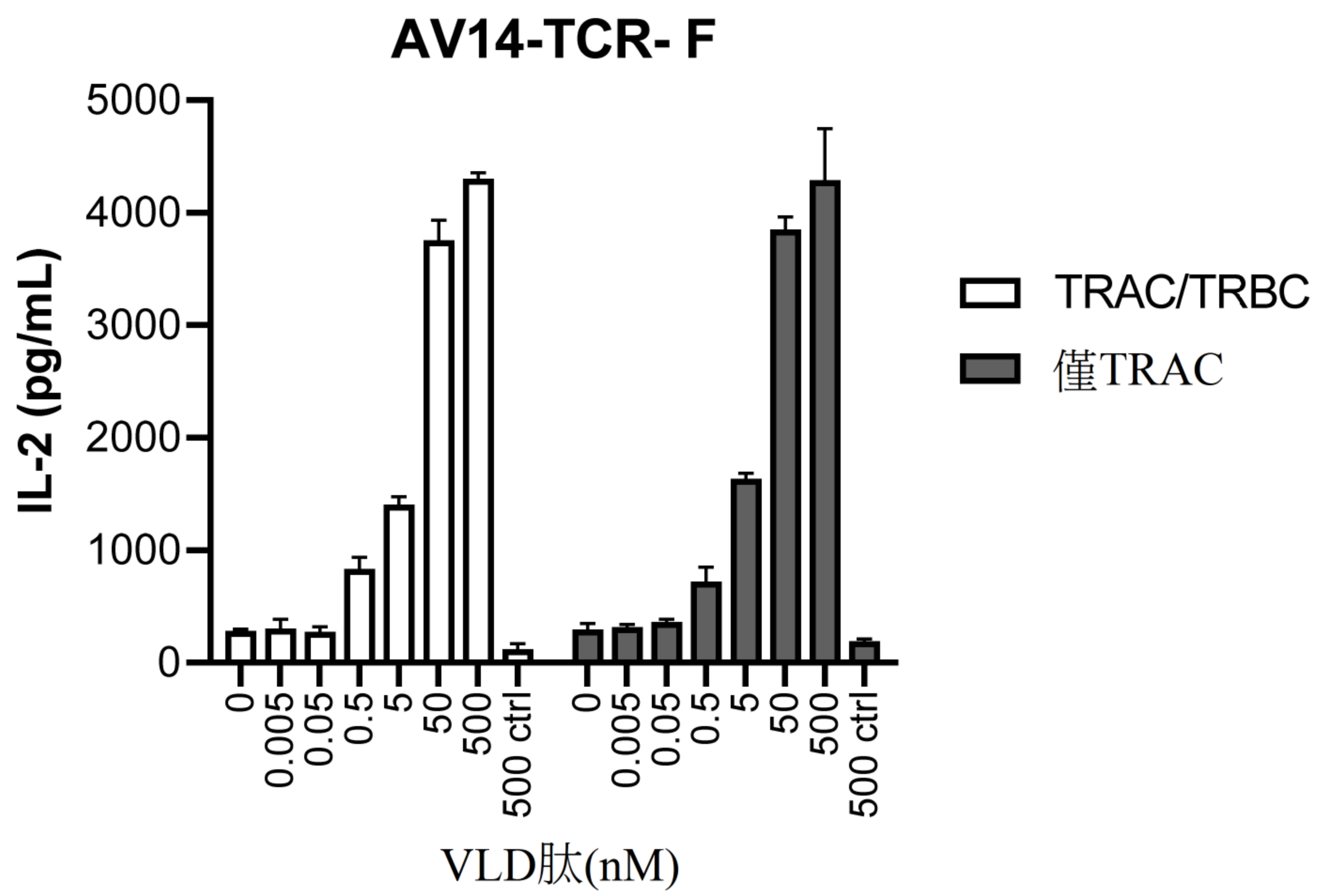
【圖29B】



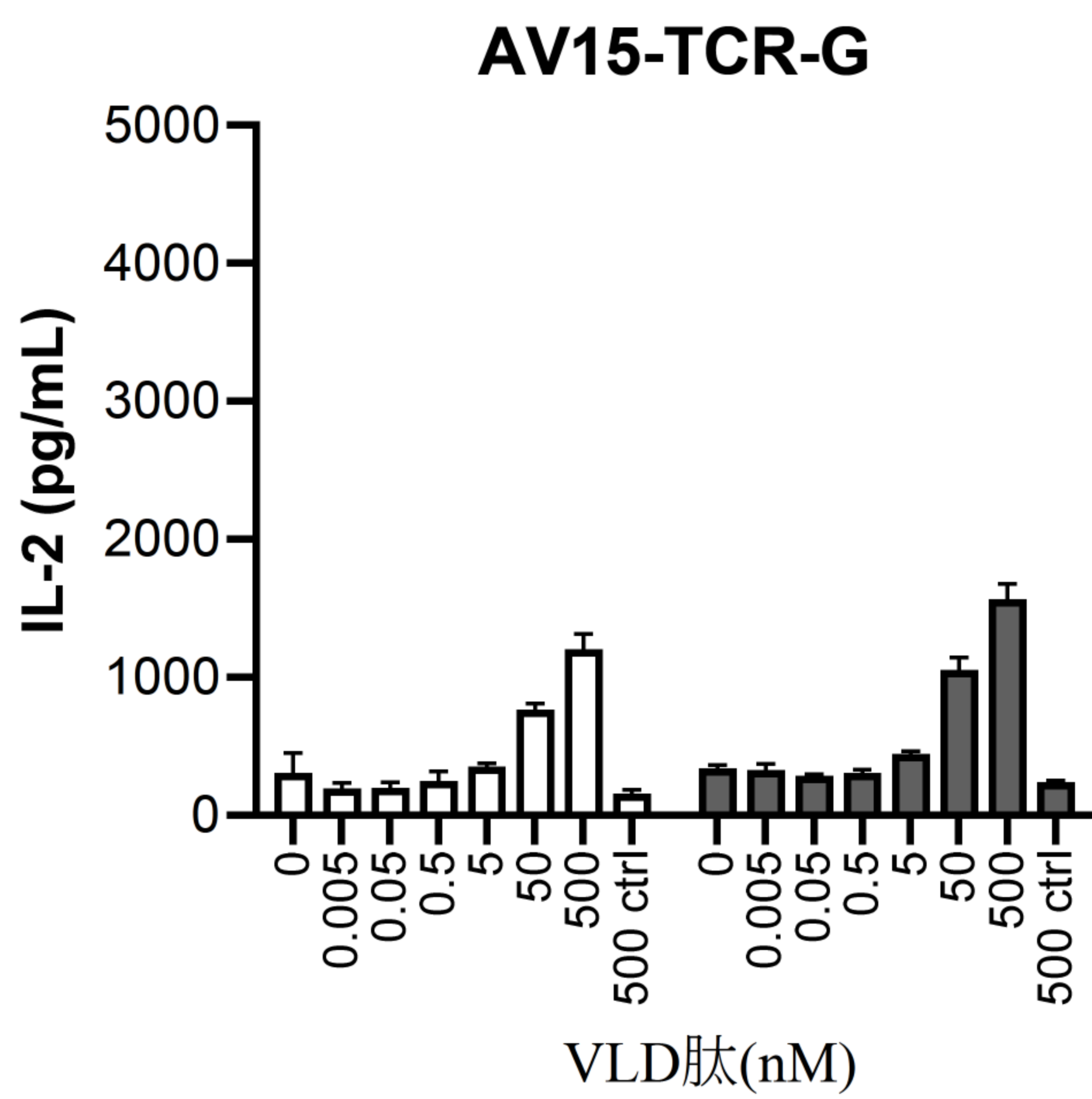
【圖29C】



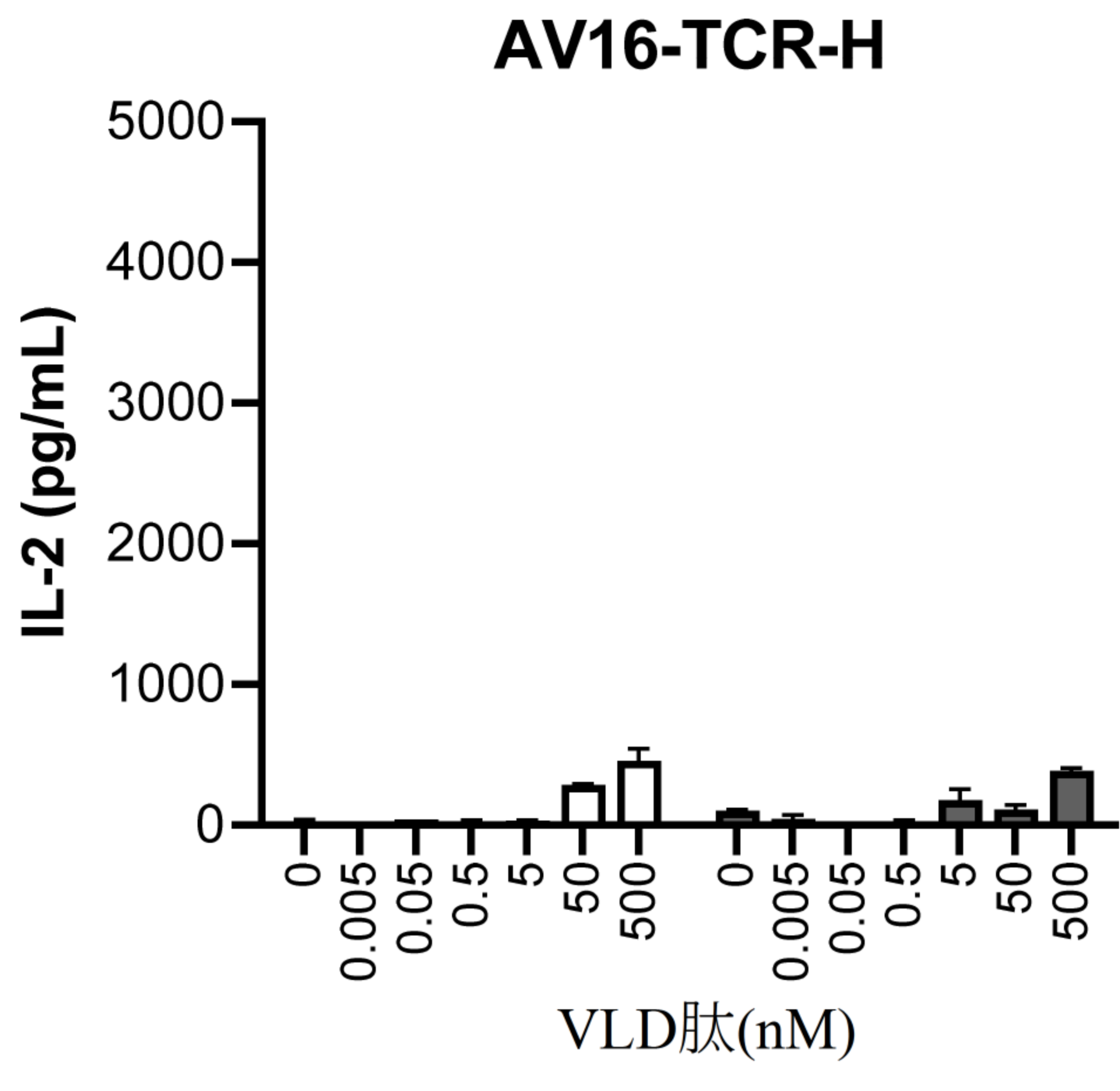
【圖29D】



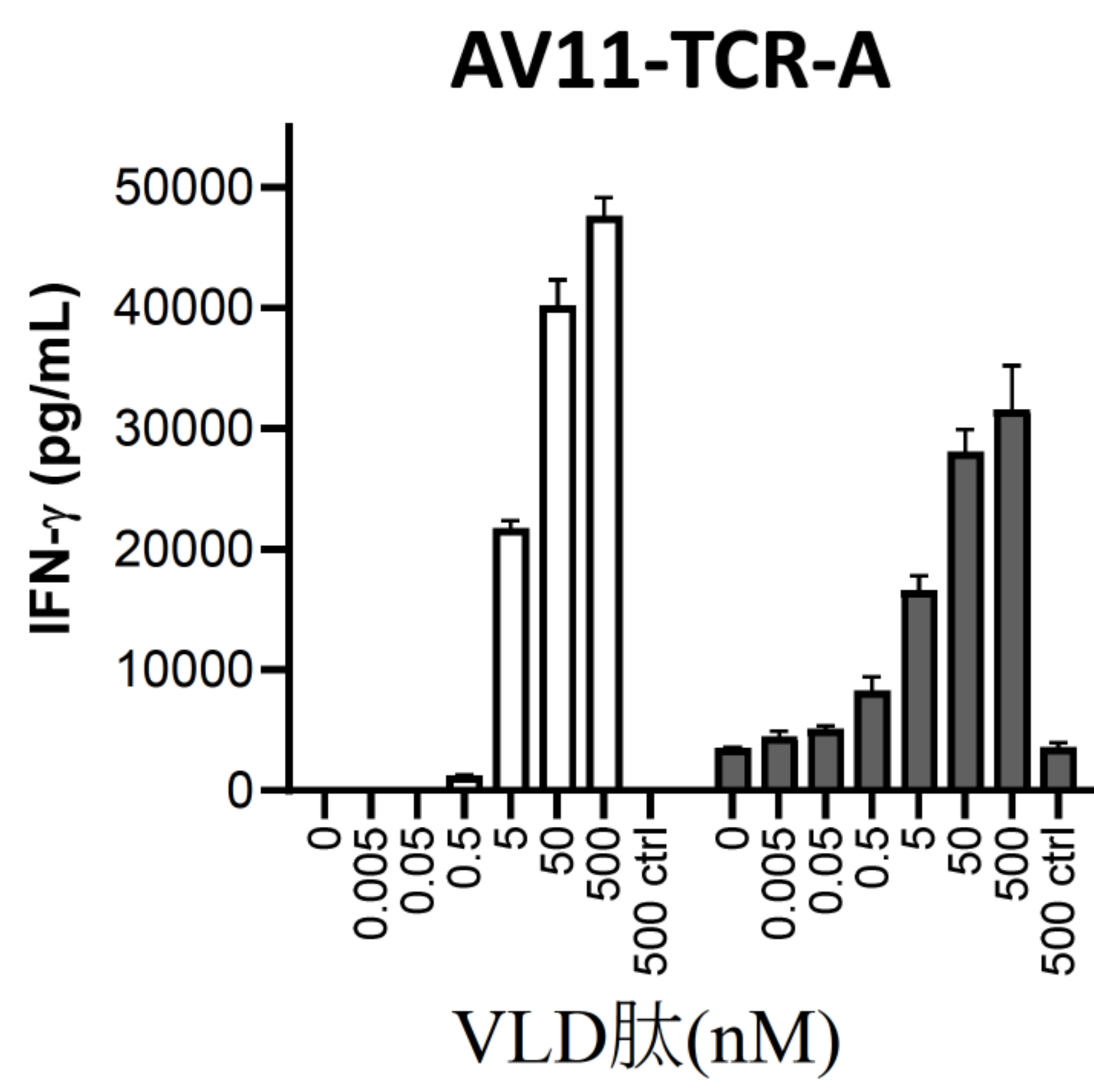
【圖29E】



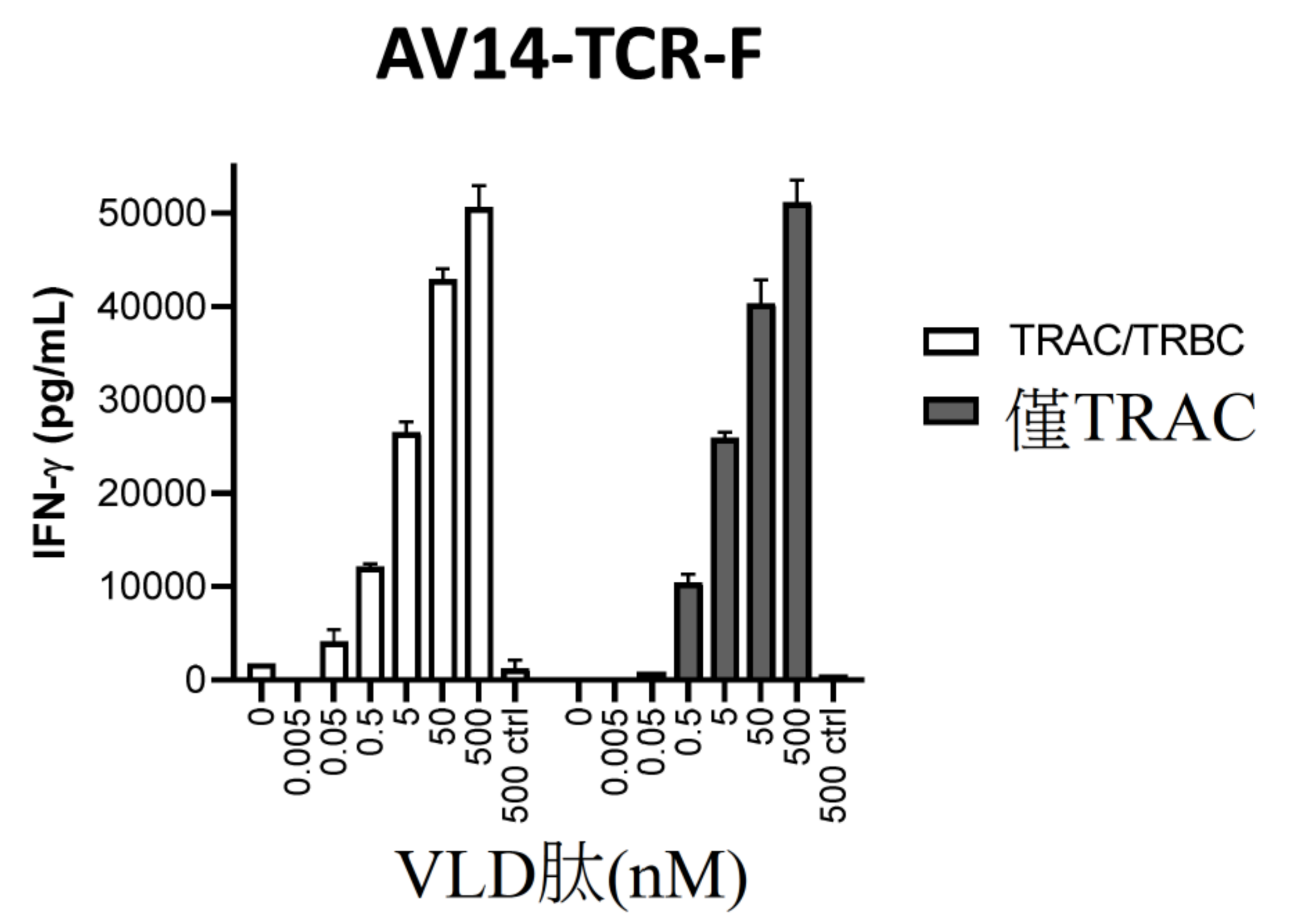
【圖29F】



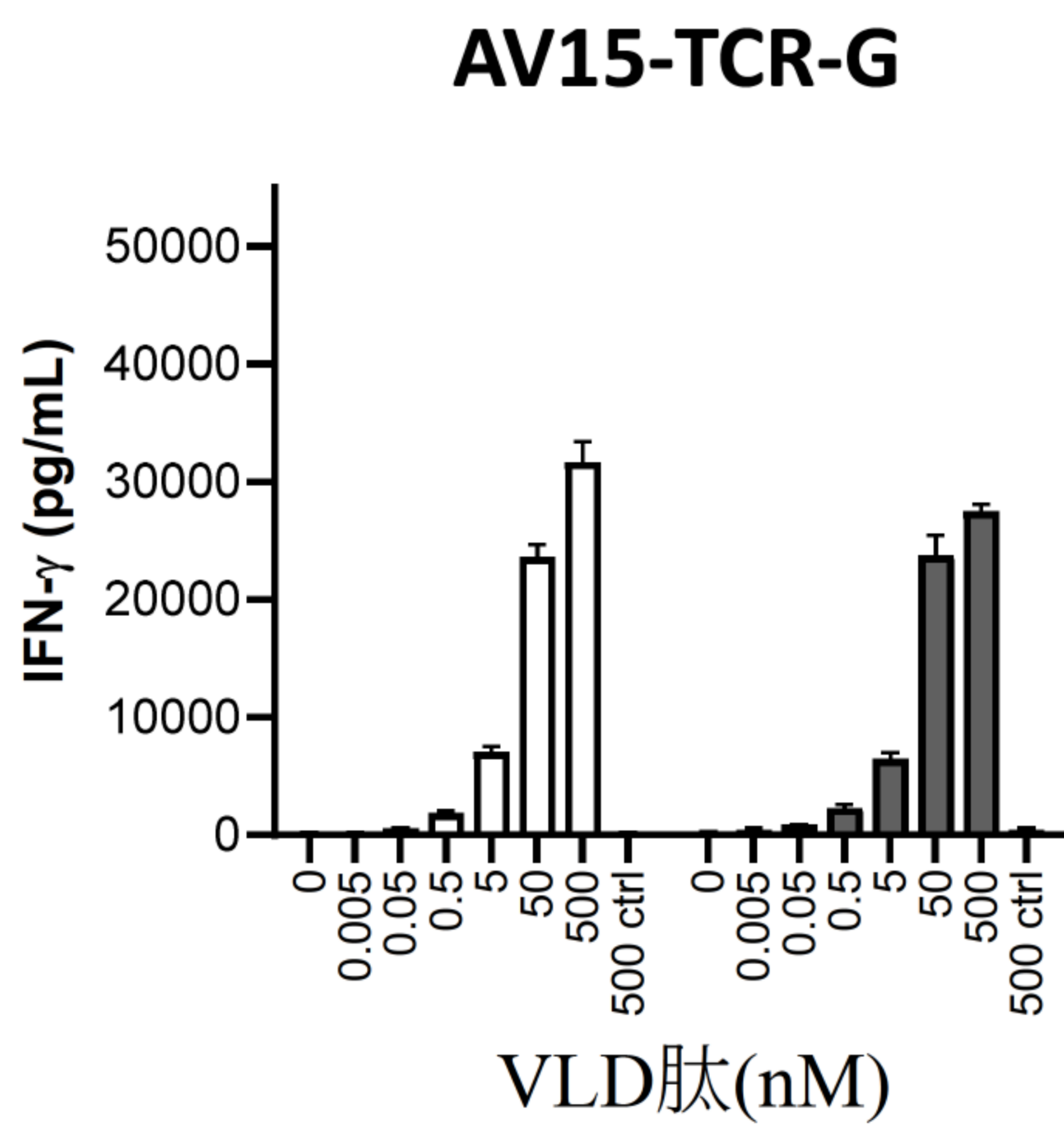
【圖29G】



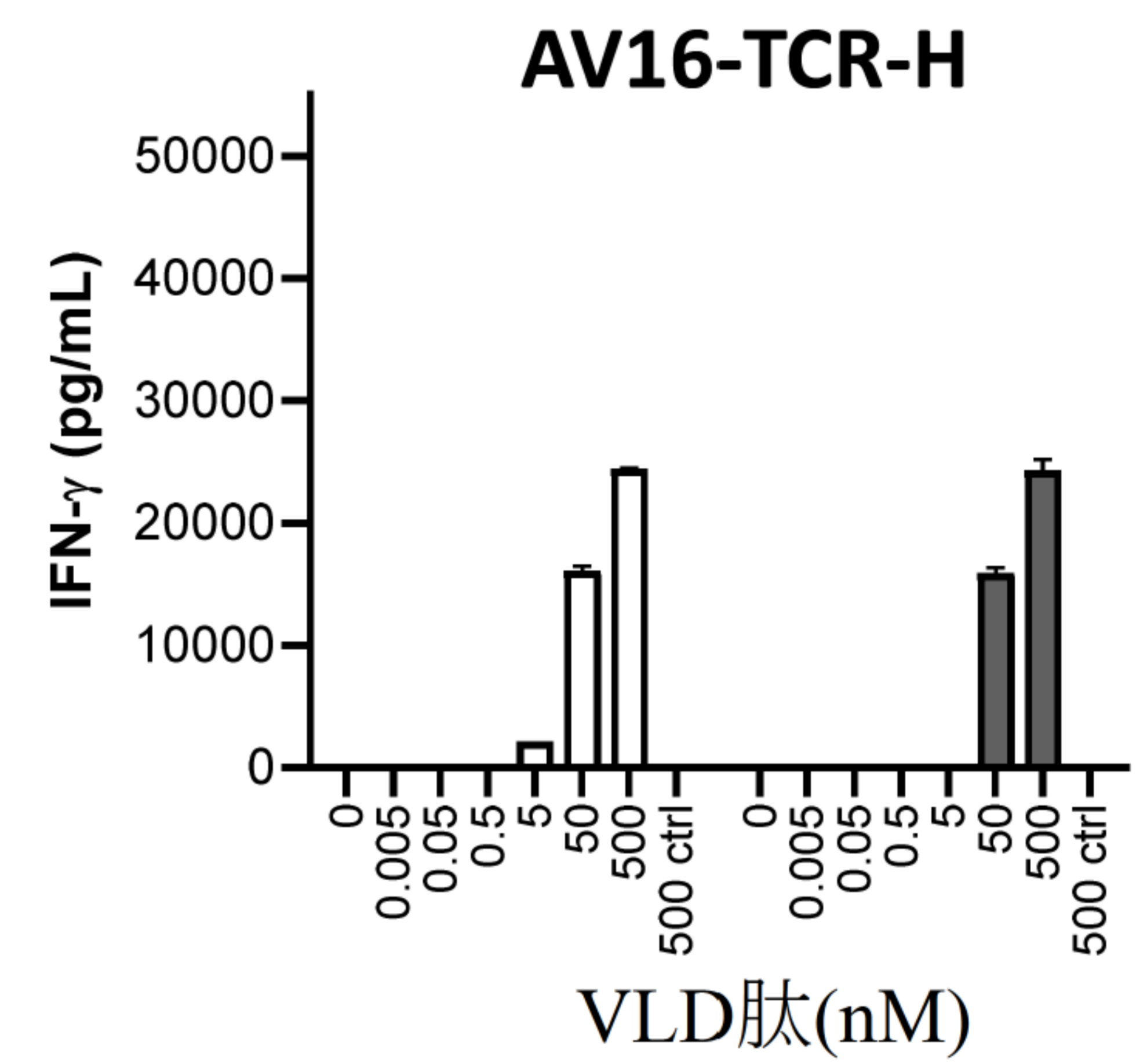
【圖30A】



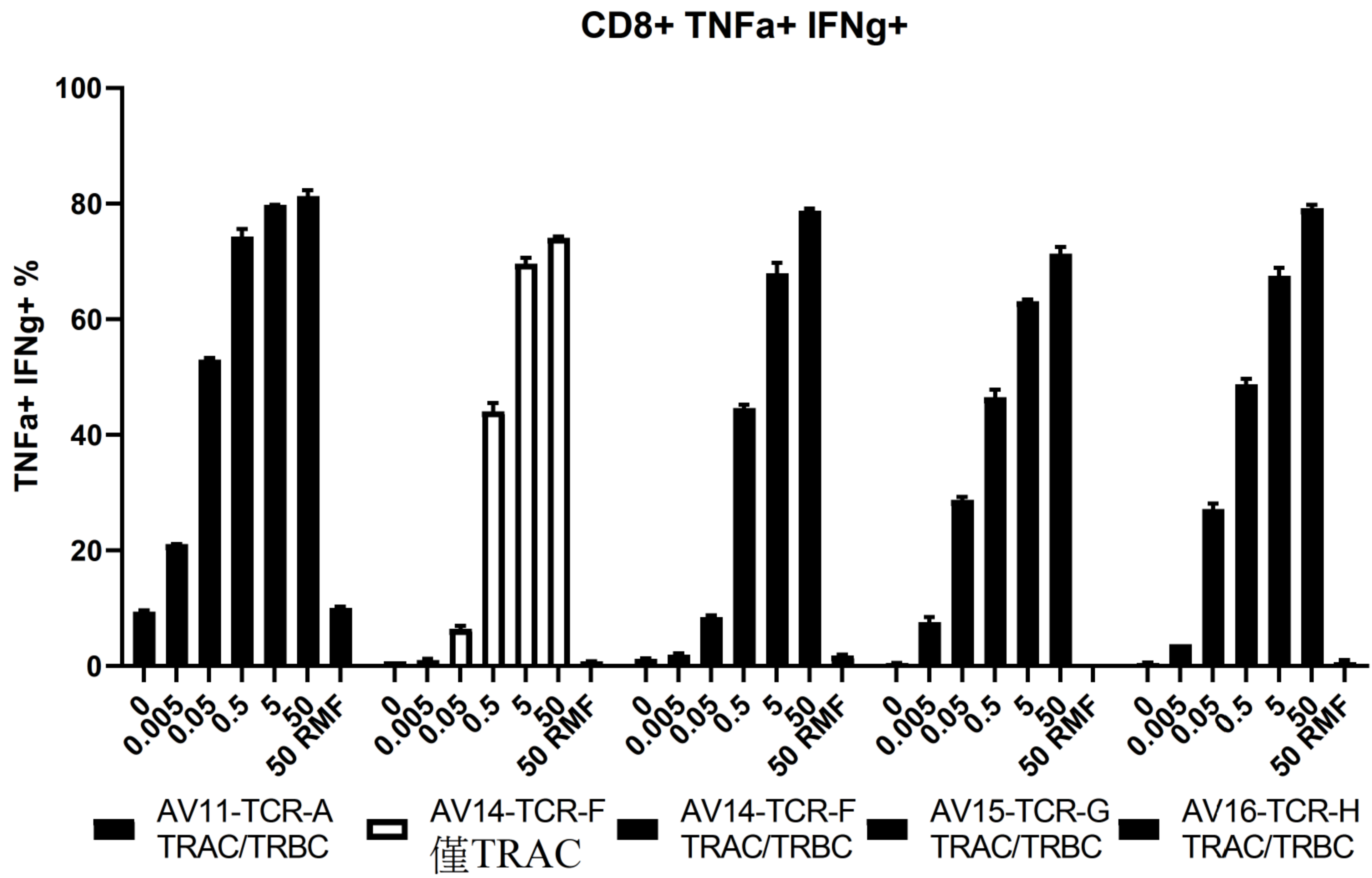
【圖30B】



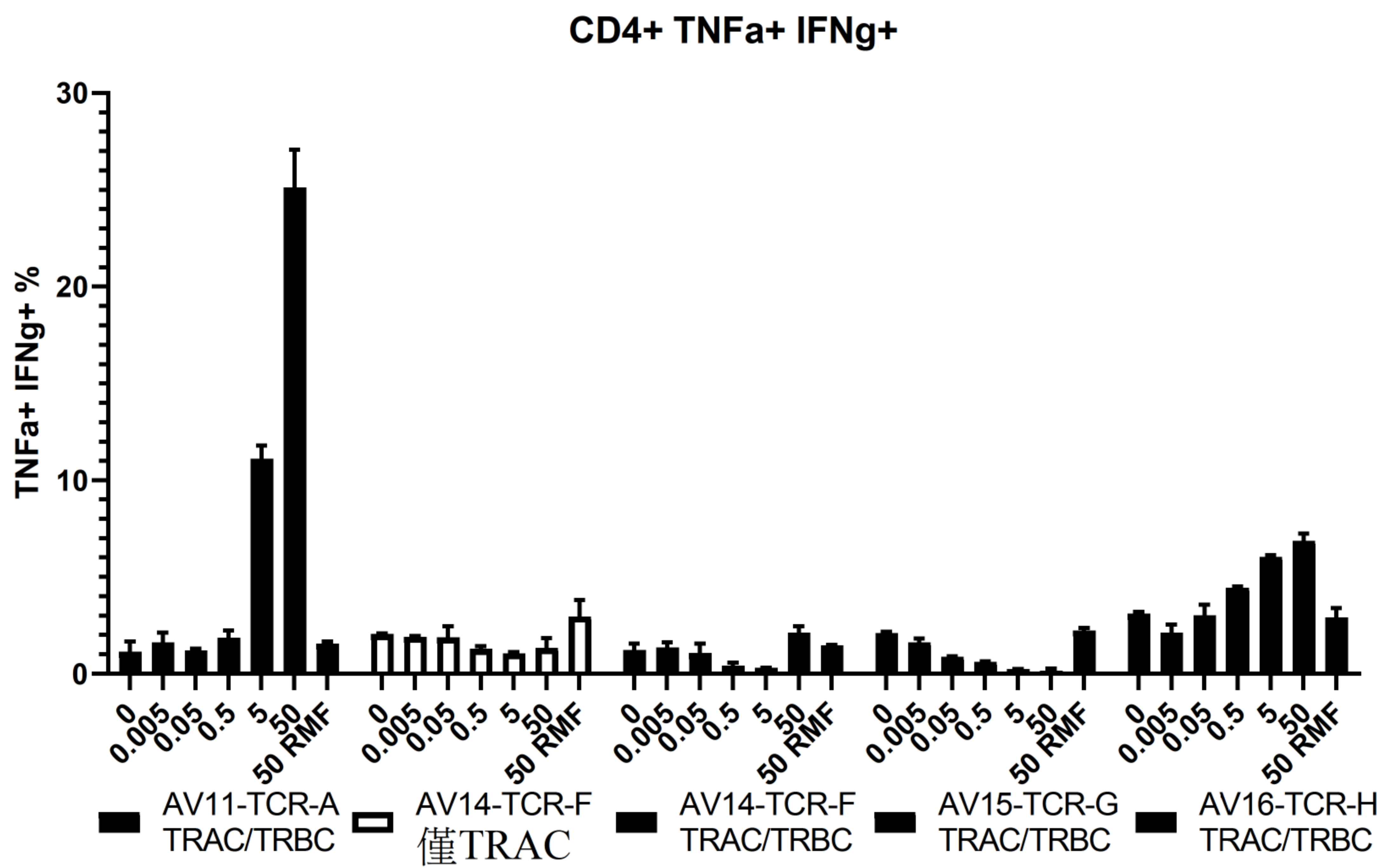
【圖30C】



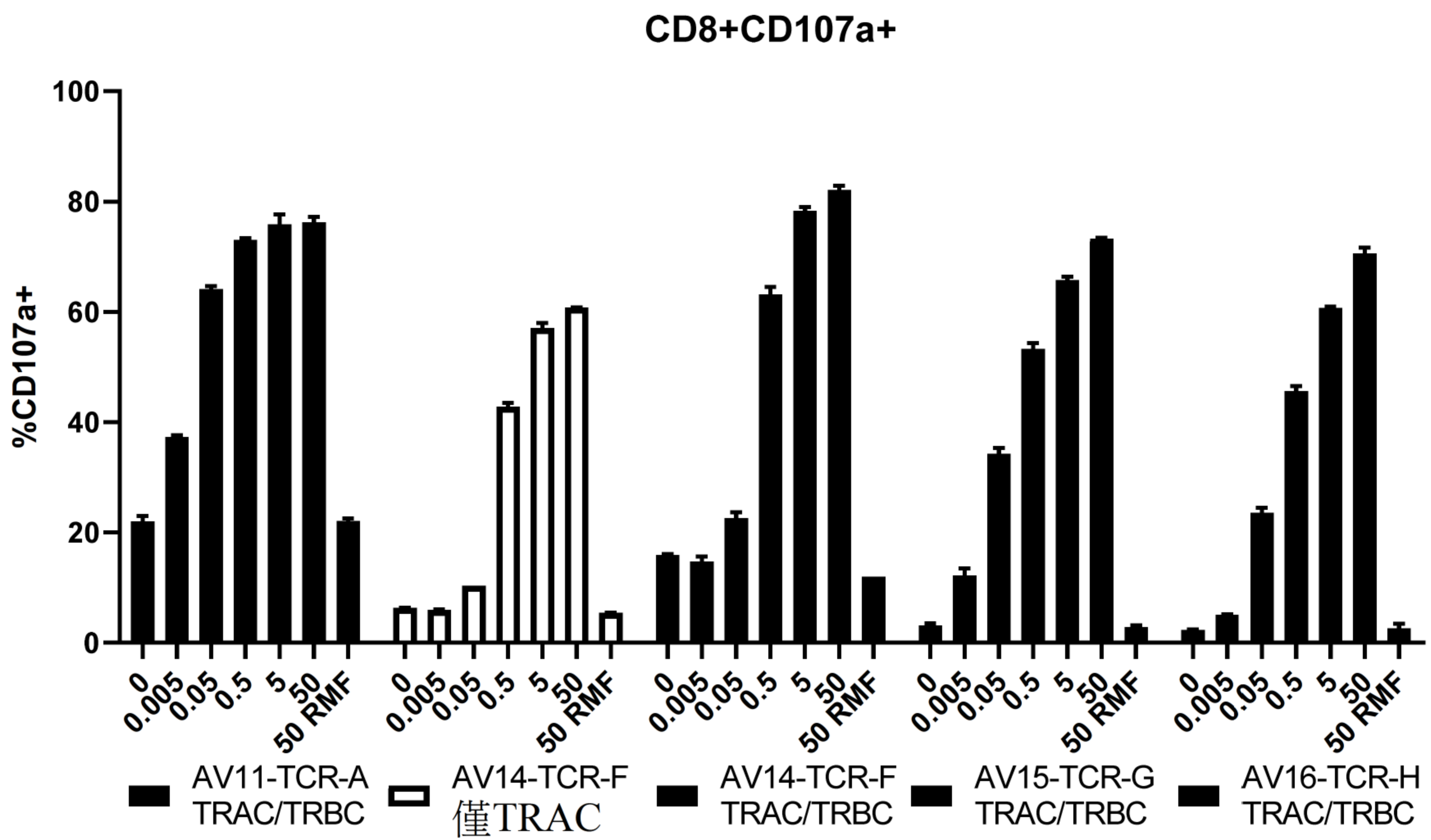
【圖30D】



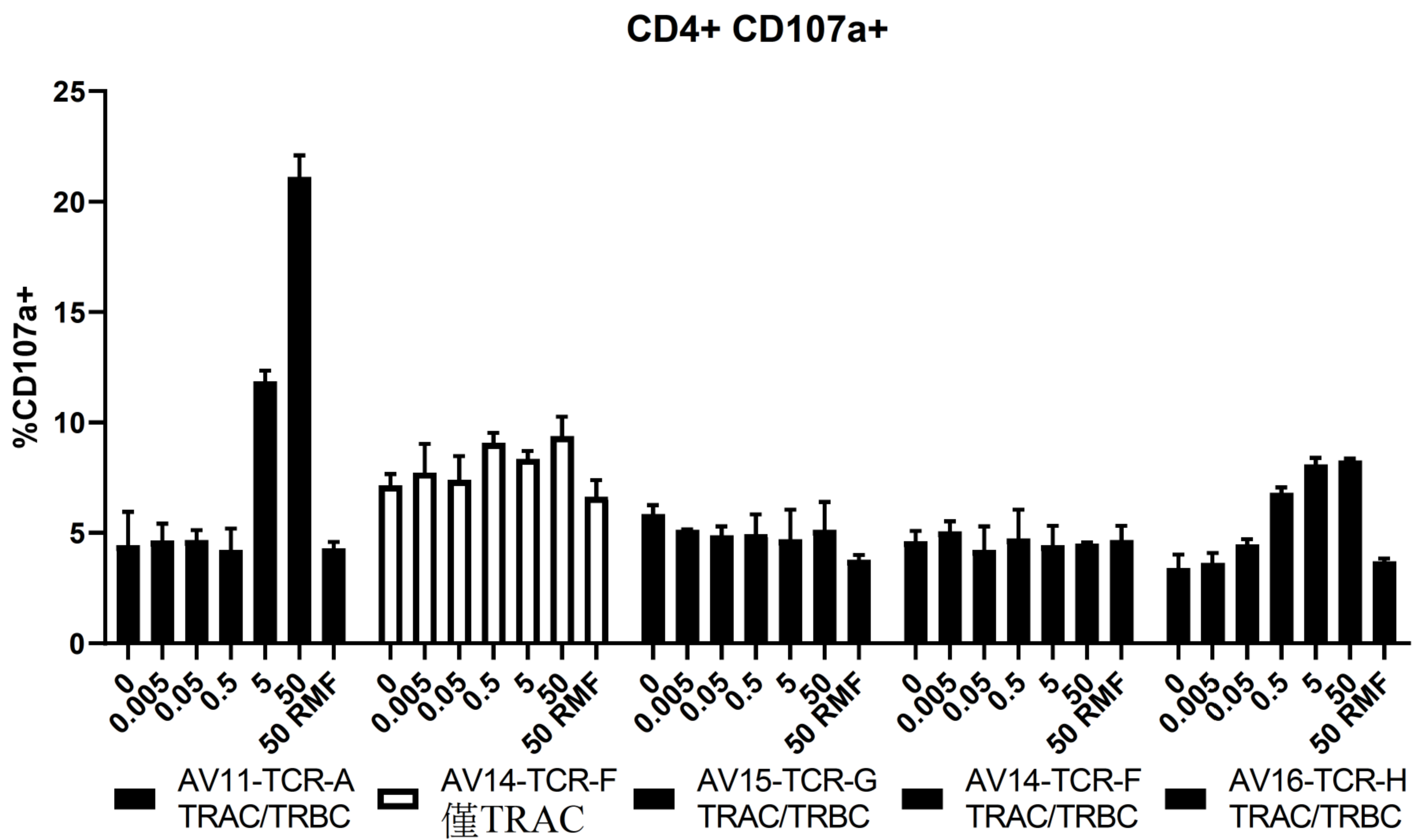
【圖31A】



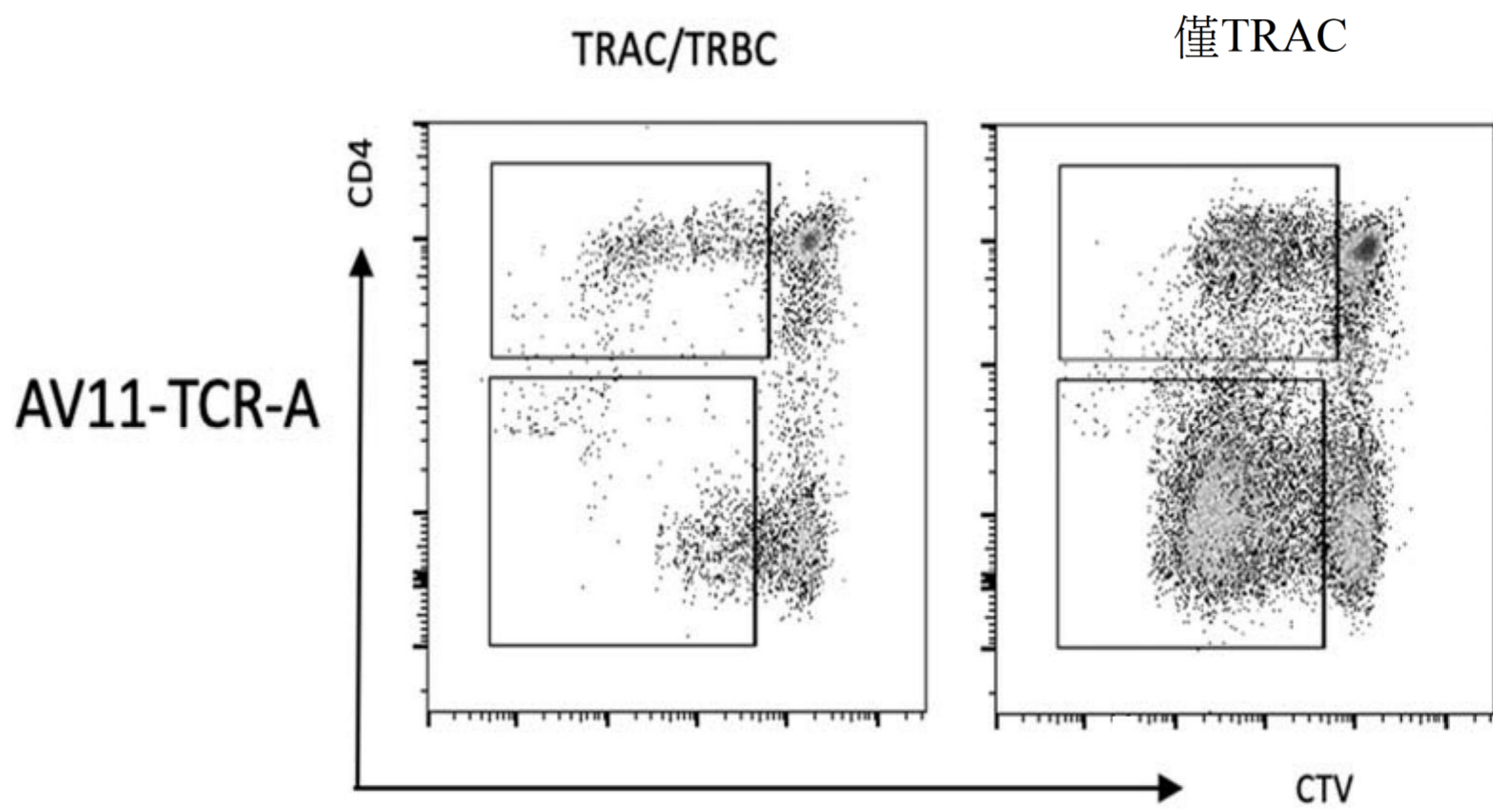
【圖31B】



【圖32A】

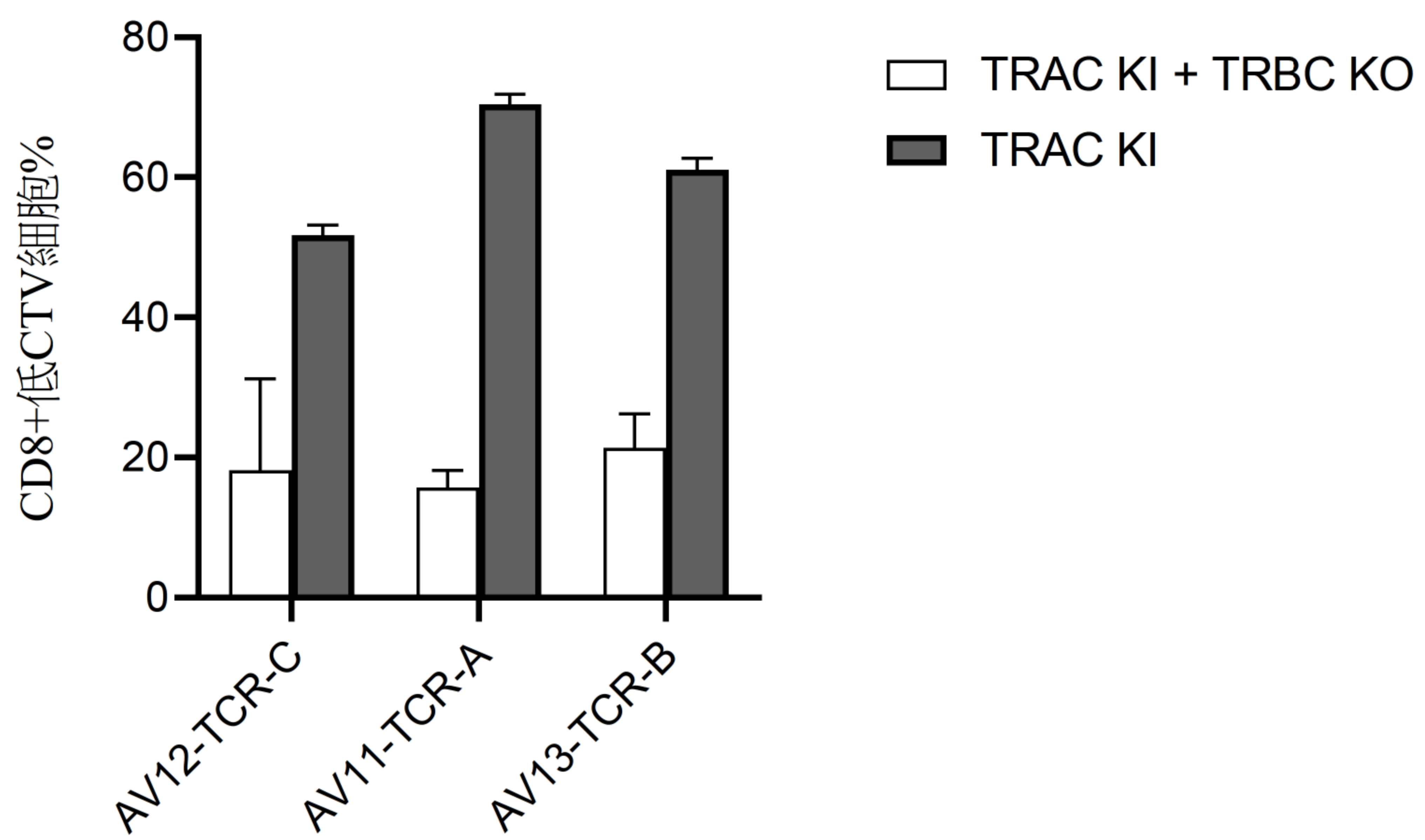


【圖32B】

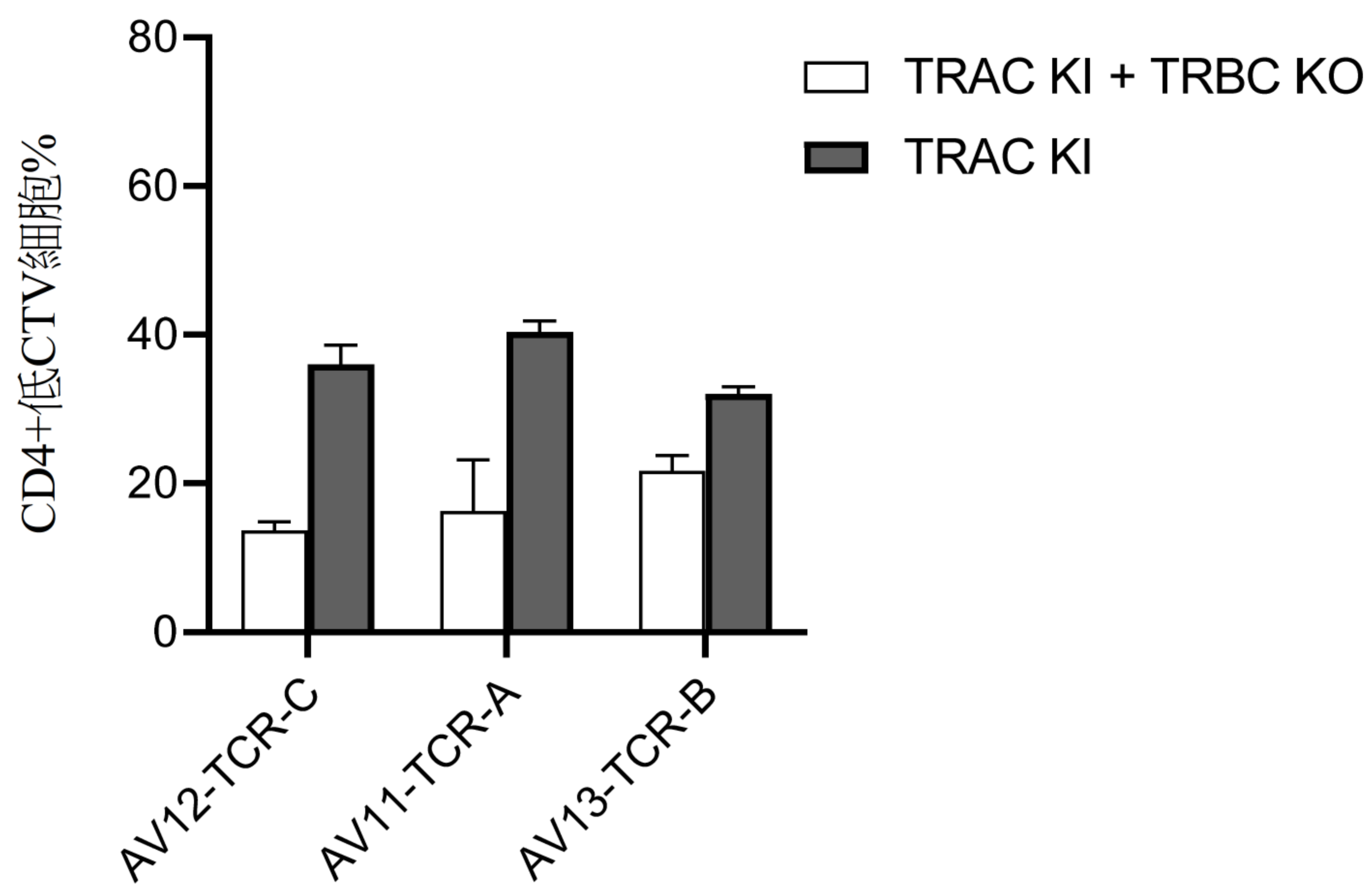


【圖33A】

【圖33B】



【圖33C】



【圖33D】

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

用於免疫療法之組合物及方法

### 【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR IMMUNOTHERAPY

### 【技術領域】

【0001】 本發明係關於編輯，例如改變TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之DNA序列的組合物及方法。

### 【先前技術】

【0002】 CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat，成簇規律間隔短回文重複序列)在細菌中演變為適應性免疫系統以防禦病毒攻擊。在暴露於病毒時，病毒DNA之短區段整合至細菌基因組之CRISPR基因座中。RNA係經包括病毒序列之CRISPR基因座之一部分轉錄。含有與病毒基因組互補之序列的彼RNA介導Cas9蛋白質對病毒基因組中之序列之靶向。Cas9蛋白質裂解且藉此限制病毒標靶。

【0003】 近來，CRISPR/Cas系統已適於在真核細胞中進行基因組編輯。位點特異性單股斷裂(single strand break，SSB)或雙股斷裂(double strand break，DSB)之引入允許經由例如非同源末端接合(non-homologous end-joining，NHEJ)或同源定向修復(homology-directed repair，HDR)進行之目標序列改變。

【0004】 Eyquem等人 (2017) *Nature* 543(7643):113-117報導用CRISPR-Cas9系統將嵌合抗原受體(CAR)靶向TRAC基因之基因座會增強

腫瘤排斥反應。另外，此類靶向TRAC基因座避開補劑CAR信號傳導且在單次或重複暴露於抗原之後建立CAR之有效內化及重新表現，因此延緩效應T細胞分化及衰竭。然而，現有方法可產生小於所需對於既定目標之活性之T細胞(包括(但不限於)產生自TRAC基因座表現CAR之T細胞及可與CAR相互作用且為T細胞提供不合需要之反應性的內源性TRBC基因產物)。因此，需要經改良之用於免疫療法之組合物及方法。

**【0005】** 因此，提供以下實施例。在一些實施例中，本發明提供使用引導RNA與經RNA引導之DNA結合劑(諸如CRISPR/Cas系統)以顯著降低或剔除TRBC及/或TRAC基因之表現，由此顯著減少或去除T細胞受體(亦稱為TCR)之原生 $\alpha$ 及/或 $\beta$ 次單元之產生的組合物及方法。

#### **【發明內容】**

**【0006】** 本文所述之本發明係關於用於經工程改造之T細胞療法(例如免疫腫瘤學及用於降低自體免疫)之組合物及方法，例如在其基因組中之特異性目標序列經修飾之細胞，包括如藉由引入包括靶向該等目標序列之gRNA分子之CRISPR系統來修飾，及製造及使用其之方法。舉例而言，本發明係關於及提供適用於例如T細胞之細胞之基因組編輯及適用於免疫療法的gRNA分子、CRISPR系統、細胞及方法，該等T細胞係例如經工程改造以缺乏內源性T細胞受體表現之T細胞，例如適用於進一步工程改造以插入所關注編碼序列之T細胞，例如經進一步工程改造以表現T細胞受體之T細胞，諸如經修飾或突變型T細胞受體。

**【0007】** 在第一態樣中，本發明提供一種包括tracrRNA及crRNA之gRNA分子，其中該crRNA包括結合於T細胞之目標序列的靶向域。在一實施例中，靶向域與T細胞之目標序列互補。T細胞可為自體或同種異體T

細胞。T細胞可為CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及/或CD8<sup>+</sup> T細胞。

本發明如申請專利範圍中所提供，且下文闡述其他實施例。

**【0008】** 本發明提供一種改變TRBC1及/或TRBC2基因內之DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；或

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0009】** 本發明另外提供一種改變DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 包含關於SEQ ID NO：1-89及179-184之表1及/或3中之任一者中所列舉之基因組座標之15個連續核苷酸±10個核苷酸的序列；

ii. 來自(i)之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自(i)之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0010】** 本發明另外亦提供一種降低TRBC1及/或TRBC2基因之表現之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i) 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；或

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0011】** 本發明另外提供一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞及/或同種異體細胞投與組合物，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i) 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、

95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；或

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0012】** 本發明另外亦提供改變TRAC基因內之DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列；或

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0013】** 本發明另外提供一種降低TRAC基因之表現之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

- i) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；
  - ii) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii) 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv) 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；及
  - v) 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列；或
- (b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況
- (c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0014】** 本發明另外亦提供一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞及/或同種異體細胞投與組合物，其中該組合物包含：

- (a) 包含選自以下之序列的引導RNA：
  - i) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；
  - ii) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii) 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv) 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；及
  - v) 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列；或
- (b) 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

【0015】 本發明另外提供一種改變DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

(a) 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 包含關於SEQ ID NO：90-218之表2及/或3中之任一者中所列舉之基因組座標之15個連續核苷酸±10個核苷酸的序列；

ii. 來自(i)之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自(i)之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

(b) 編碼(a)之引導RNA之核酸；及視情況

(c) 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

【0016】 本發明另外亦提供一種改變TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之DNA序列之方法，其包含向細胞遞送第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

i) 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；及

其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

i. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列。

**【0017】** 本發明另外亦提供一種降低TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現之方法，其包含向細胞遞送第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

i) 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；及

其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

i) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列。

**【0018】** 本發明另外提供一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞或同種異體細胞投與組合物，其中該組合物包含：第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

i) 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；及

其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

i. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列。

**【0019】** 不希望受理論所束縛，在本發明之上下文中，當較大比例之經工程改造/引入之TCR達至細胞表面時，在一些實施例中，使用雙TRAC/TRBC突變體，例如基因剔除突變體為有利的。

**【0020】** 在一些實施例中，經工程改造之細胞中外源性TCR之TRBC基因剔除與TRAC基因嵌入組合有利地使經工程改造之細胞中外源性TCR之活性更大。

**【0021】** 在一些實施例中，經工程改造之細胞中外源性TCR之TRBC基因剔除與TRAC基因嵌入組合有利地使經工程改造之細胞中外源性TCR之選擇性更大。

**【0022】** 另外，在一些實施例中，經工程改造之細胞中外源性TCR之TRBC基因剔除與TRAC基因敲入組合可有利地使細胞死亡更多，例如如藉由卡斯蛋白酶分析(caspase assay)所量測。

**【0023】** 在一些實施例中，經工程改造之細胞中外源性TCR之TRBC基因剔除與TRAC基因嵌入組合有利地例如響應於誘導肽(例如威爾姆斯氏腫瘤基因(WT1)抗原)使IFN- $\gamma$ 分泌更多。

**【0024】** 此外，在一些實施例中，對於TCR之雙TRAC/TRBC基因剔除有利地使例如CD4+細胞中之IFN- $\gamma$ 分泌更多。

**【0025】** 另外，有利的是，在一些實施例中，在經編輯細胞中干擾

素反應(IFN $\gamma$ 及/或TNF $\alpha$ )增加，其中插入之供體構築體之轉錄藉由TRAC之內源性啟動子促進。

【0026】此外，在一些實施例中，對於此等特定TCR之雙TRAC/TRBC基因剔除有利地使CD4+細胞中之IFN- $\gamma$ 分泌更多。不希望受理論束縛，在一些實施例中，在CD4+細胞中極少觀察到此類活性，其通常與HLA I類上所呈現之肽的反應性無緊密關聯。

【0027】另外，在一些實施例中，對於此等特定TCR之雙TRAC/TRBC基因剔除有利地使例如脫粒分析中CD4+細胞中之反應更大。此外，不希望受理論束縛，在一些實施例中，在CD4+細胞中極少觀察到此類活性，其通常與HLA I類上所呈現之肽的反應性無緊密關聯。

【0028】另外，在一些實施例中，例如當在混合之淋巴細胞反應物中測試時，雙TRAC/TRBC基因剔除突變體有利地比TRAC單一基因剔除突變體之同種異體反應性程度更小。

【0029】本發明另外提供一種經由在TRAC基因座之基因座內插入而表現異源免疫受體之方法，其包含向細胞遞送第一引導RNA、第二引導RNA，及經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

i) 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：1、2、3、5、6中任一者之引導序列；及

v) 包含SEQ ID NO：2、3、5、6中任一者之引導序列；及

其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

i) 選自SEQ ID NO：90、95、97、98、185、214、218之引導序列；

ii) 選自SEQ ID NO：90、95、97、98、185、214及218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii) 與選自SEQ ID NO：90、95、97、98、185、214及218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv) 包含SEQ ID NO：90、95、97、185及214中任一者之引導序列；

v) 包含SEQ ID NO：90、95及185中任一者之引導序列；及

vi) 包含SEQ ID NO：90或214之引導序列。

**【0030】** 單裂解及/或編輯事件可使內源性TRAC基因發生「基因剔除」。作為另一優勢，若在編輯過程中引入或提供模板，則可將所關注外源性多肽插入至編輯事件之目標基因座中。此優勢尤其由使用具有以下之引導RNA產生：SEQ ID NO：90、95、97、185、203、204、205、206、210、211及/或214。此等引導RNA亦可與靶向TRBC基因之基因座的gRNA共同引入。

**【0031】** 第一引導RNA可包含SEQ ID NO：2之序列且第二引導RNA包含SEQ ID NO：90之序列。

**【0032】** 第一引導RNA可包含SEQ ID NO：180之序列且第二引導RNA可包含SEQ ID NO：186之序列。

【0033】 第一引導RNA可包含SEQ ID NO：1、2、3、5、6中任一者之序列，且第二引導RNA可包含SEQ ID NO：90之序列。

【0034】 第一引導RNA可包含SEQ ID NO：1、2、3、5、6中任一者之序列，且第二引導RNA可包含SEQ ID NO：214之序列。

【0035】 可基本上同一時間引入或投與第一引導RNA、第二引導RNA，及經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

【0036】 可同時改變TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之DNA序列。

【0037】 可引入或投與經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸作為修飾方法之一部分。

【0038】 該等方法可進一步包含：

(a) 誘導細胞及/或個體中TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之雙股斷裂(DSB)；或

(b) 誘導細胞及/或個體中TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之單股斷裂(SSB)；或

(c) 降低細胞及/或個體中TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現。

【0039】 該等方法可進一步包含引入編碼所關注多肽之核酸序列，視情況其中：

(a) 一或多種所關注多肽包含受體；

(b) 一或多種所關注多肽包含免疫受體；

(c) 一或多種所關注多肽包含T細胞受體，另外視情況，其中T細胞受體識別癌症抗原；

(d) 一或多種所關注多肽包含WT1特異性T細胞受體，其中T細胞受體識別WT1或其片段；

(e) 一或多種所關注多肽包含嵌合抗原受體，另外視情況，其中嵌合抗原受體識別癌症抗原；或

(f) 一或多種所關注多肽包含WT1特異性嵌合抗原受體，其中，嵌合抗原受體識別WT1或其片段。

**【0040】** 該等方法可進一步包含：

a. 引入TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈；

b. 引入一或多種編碼TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈之核酸序列；

c. 引入WT1特異性TCR  $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈；

d. 引入一或多種編碼WT1特異性TCR  $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈之核酸序列；

e. 引入選自以下之第一TCR序列：(i) SEQ ID NO：501或504；(ii) 與SEQ ID NO：501或504至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之胺基酸序列；及(iii) SEQ ID NO：501或504之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或250個胺基酸之連續子序列，

及

引入選自以下之第二TCR序列：(i) SEQ ID NO：502或505；(ii) 與SEQ ID NO：502或505至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之胺基酸序列；及(iii) SEQ ID NO：502或505之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或300個胺基酸之連續子序列，

f. 引入選自以下之第一TCR序列：(i) SEQ ID NO：501或513；(ii)

與SEQ ID NO：510或513至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之胺基酸序列；及(iii) SEQ ID NO：510或513之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或250個胺基酸之連續子序列，

及

引入選自以下之第二TCR序列：(i) SEQ ID NO：511或514；(ii)與SEQ ID NO：511或514至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之胺基酸序列；及(iii) SEQ ID NO：511或514之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或300個胺基酸之連續子序列，

g. 引入包含編碼(e)或(f)之第一TCR序列之序列的核酸序列；

h. 引入包含編碼(e)至(f)之第二TCR序列之序列的核酸序列；

i. 引入包含(g)及(h)之核酸序列之核酸序列；

j. 引入選自SEQ ID NO：500、503、506、509、512、515、518或521或與其至少99%、95%、90%一致之胺基酸序列之多肽，視情況藉由引入編碼其之核酸序列；或

k. 引入選自以下(i)至(viii)或與其至少99%、95%、90%一致之胺基酸序列之TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈多肽：

i) SEQ ID NO：501及SEQ ID NO：502；

ii) SEQ ID NO：504及SEQ ID NO:505；

iii) SEQ ID NO：507及SEQ ID NO:508；

iv) SEQ ID NO：510及SEQ ID NO:511；

v) SEQ ID NO：513及SEQ ID NO:514；

vi) SEQ ID NO : 516及SEQ ID NO:517 ;

vii) SEQ ID NO : 519及SEQ ID NO:520 ;

1. 引入編碼(k)之TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈多肽之核酸序列。

**【0041】** 第一核酸序列可側接與第一目標基因座同源之序列。第二核酸序列可側接與第二目標基因座同源之序列。側接序列之長度可為至少17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35或40個核苷酸。

**【0042】** 第一目標基因座可為TRAC、TRBC1或TRBC2基因，例如TRAC基因。第二目標基因座可為TRAC、TRBC1或TRBC2基因，例如TRBC1或TRBC2基因。

**【0043】** 引入之核酸序列或第一核酸序列及第二核酸序列可構成在無啟動子區的，亦即核酸可為「無啟動子的」。

**【0044】** 引入之核酸序列或第一核酸序列及第二核酸序列可操作地連接於啟動子，視情況其中，啟動子為EF-1 $\alpha$ 啟動子(SEQ ID NO : 603)。

**【0045】** 引入之核酸序列或第一核酸序列及第二核酸序列可經由載體、經由轉染、經由脂質奈米粒子或經由顯微注射引入。

**【0046】** 載體可為病毒載體，另外視情況，其中病毒載體為腺相關病毒載體。

**【0047】** 本發明亦提供一種TCR (諸如WT1特異性TCR)之基因座內插入方法，其包含向細胞遞送用於插入TCR之第一引導RNA，其包含選自以下之引導序列：SEQ ID NO : 90、95、97、98、185、214及218，及視情況(i)經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸；及/或(ii)編碼TCR (諸如WT1特異性TCR)之供體核酸分子。該方

法可進一步包含遞送包含選自SEQ ID NO：1-89之序列的第二引導RNA。該方法可進一步包含遞送包含選自SEQ ID NO：179-184之序列的第二引導RNA。

**【0048】** TCR可為WT1特異性TCR，其包含：

i) 選自SEQ ID NO：500、503、506、509、512、515、518或521或與其至少99%、95%、90%一致之胺基酸序列之多肽；或

ii) 選自以下(i)至(viii)或與其至少99%、95%、90%一致之胺基酸序列之TCR  $\alpha$ 鏈及TCR  $\beta$ 鏈多肽：

i) SEQ ID NO：502及SEQ ID NO:503；

ii) SEQ ID NO：504及SEQ ID NO:505；

iii) SEQ ID NO：507及SEQ ID NO:508；

iv) SEQ ID NO：510及SEQ ID NO:511；

v) SEQ ID NO：513及SEQ ID NO:514；

vi) SEQ ID NO：516及SEQ ID NO:517；

vii) SEQ ID NO：519及SEQ ID NO:520；

viii) SEQ ID NO：522及SEQ ID NO:523。

**【0049】** 本發明亦提供一種組合物，其包含：

a. 引導RNA，其包含

i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；或

ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；或

iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；或

- iv. 包含SEQ ID NO：1-24中任一者之引導序列；或
- v. 包含SEQ ID NO：1-6中任一者之引導序列；及視情況
- b. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0050】** 組合物可用於改變細胞中TRBC1及/或TRBC2基因內之DNA序列。組合物可用於降低細胞中TRBC1及/或TRBC2基因之表現。組合物中之引導RNA可包含選自SEQ ID NO 196-200中任一者之序列。

**【0051】** 本發明亦提供一種組合物，其包含：

- a. 引導RNA，其包含
  - i. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；或
  - ii. 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；或
  - iii. 與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；或
  - iv. 包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者之引導序列；或
  - v. 包含SEQ ID NO：90-95中任一者之引導序列；及視情況
- b. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

**【0052】** 組合物可用於改變細胞中TRAC基因內之DNA序列。組合物可用於降低細胞中TRAC基因之表現。引導RNA可選自SEQ ID NO 185-192及201-212中之任一者。

**【0053】** 本發明亦提供一種藉由本文所述之方法改變之細胞。細胞

可經離體改變。

【0054】 細胞可為T細胞。細胞可為CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及/或CD8<sup>+</sup> T細胞。細胞可為哺乳動物、靈長類動物或人類細胞。

【0055】 細胞可缺乏內源性T細胞受體。細胞可適用於製備表現非內源性T細胞受體之T細胞。細胞因此可用於製備表現CAR之T細胞。

【0056】 如本文所述經改變之細胞可為CD3<sup>-</sup>細胞。在改變之前，細胞可為CD3<sup>+</sup>細胞。

【0057】 細胞可另外包含一或多種編碼所關注多肽之核酸序列，視情況其中：

(a) 一或多種所關注多肽包含受體；

(b) 一或多種所關注多肽包含免疫受體；

(c) 一或多種所關注多肽包含T細胞受體，另外視情況，其中T細胞受體對WT1具有特異性；或

(d) 一或多種所關注多肽包含嵌合抗原受體，另外視情況，其中嵌合抗原受體對WT1具有特異性。

【0058】 細胞可另外包含一或多種編碼外源性T細胞受體之 $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈之核酸序列。細胞可另外包含一或多種編碼外源性T細胞受體之 $\gamma$ 及 $\delta$ 鏈之核酸序列。

【0059】 一或多種編碼本文所述細胞之外源性T細胞受體之 $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈之核酸序列可於基因組之TRAC基因座中。一或多種編碼本文所述細胞之外源性T細胞受體之 $\gamma$ 及 $\delta$ 鏈之核酸序列可於基因組之TRAC基因座中。

【0060】 TCR  $\alpha$ 鏈之序列可選自：(i) SEQ ID NO：501或504；(ii) 與SEQ ID NO：501或504至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或

60%一致之序列；及SEQ ID NO：501或504之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200或250個胺基酸之連續子序列；及

TCR  $\beta$ 鏈之序列可選自：(i) SEQ ID NO：502或505；(ii)與SEQ ID NO：502或505至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之序列；及SEQ ID NO：502或505之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或300個胺基酸之連續子序列。

**【0061】** 細胞之TCR  $\alpha$ 鏈可由根據SEQ ID NO：500、501、503及504中任一者之核酸序列編碼，且 $\beta$  TCR鏈根據SEQ ID NO：500、502、503及505中之任一者編碼。

**【0062】** TCR  $\alpha$ 鏈之序列可選自：(i) SEQ ID NO：513；(ii)與SEQ ID NO：513至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之序列；及SEQ ID NO：513之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、500、600、700或800個胺基酸之連續子序列；及

其中TCR  $\beta$ 鏈之序列係選自：(i) SEQ ID NO:514；(ii)與SEQ ID NO：514至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之序列；及SEQ ID NO：514之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、500、600、700或800個胺基酸之連續子序列。

**【0063】**  $\alpha$  TCR鏈可為SEQ ID NO：513且 $\beta$  TCR鏈可為SEQ ID NO：514。

**【0064】** 本文所揭示之細胞之一或多種基因可由內源性啟動子表現。

【0065】 本文所揭示之細胞之一或多種基因可由異源啟動子表現，視情況其中異源啟動子為EF-1 $\alpha$ 啟動子。

【0066】 經改變之細胞可包含編碼外源性T細胞受體之 $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈之基因及/或編碼外源性T細胞受體之 $\gamma$ 及 $\delta$ 鏈之基因。適合之 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 及 $\delta$ 鏈在所屬技術領域中已知。參見例如WO2018/197492。

【0067】 外源性T細胞受體之 $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈可於基因組之TRAC基因座中。外源性T細胞受體之 $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈提供於轉錄物內，藉由P2A或其他裂解序列隔開。

【0068】 本發明亦提供一種包含本文所揭示者之細胞群體，其中經改變之群體之大於約50%、大於約55%、大於約60%、大於約65%、大於約70%、大於約75%、大於約80%、大於約85%、大於約90%、大於約95%、大於約98%或大於約99%為CD3<sup>+</sup>細胞。

【0069】 本發明亦提供一種包含本文所揭示者之細胞群體，其中群體之大於約50%、大於約55%、大於約60%、大於約65%、大於約70%、大於約75%、大於約80%、大於約85%、大於約90%、大於約95%、大於約98%或大於約99%缺乏內源性T細胞受體。

【0070】 本發明亦提供一種包含本文所揭示者之細胞群體，其中在群體中TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現相對於未經改變之相同細胞群體已降低至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約98%或至少約99%。

【0071】 表現降低可對於TRBC1基因。表現降低可對於TRBC2基因。表現降低可對於TRAC基因。

【0072】 細胞群體之10%與100%之間，例如群體之30%與99%之間可在TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中具有插入或缺失。

【0073】 此外，群體之30%與35%之間、35%與40%之間、40%與45%之間、45%與50%之間、50%與55%之間、55%與60%之間、60%與65%之間、65%與70%之間、70%與75%之間、75%與80%之間、80%與85%之間、85%與90%之間、90%與95%之間，或95%與99%之間可在TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中具有插入或缺失。

【0074】 插入或缺失或插入可於TRBC1基因中。插入或缺失或插入可於TRBC2基因中。插入或缺失或插入可於TRAC基因中。

【0075】 本文所述之方法或供使用之組合物可讓TRBC1及/或TRBC2基因發生編輯。本文所述之方法或供使用之組合物可讓TRAC基因發生編輯。本文所述之方法或供使用之組合物可讓TRBC基因及TRAC基因發生編輯。

【0076】 編輯可計算為經編輯之群體之百分比(編輯百分比或插入或缺失百分比)。編輯百分比可在群體之30%與35%、35%與40%、40%與45%、45%與50%、50%與55%、55%與60%、60%與65%、65%與70%、70%與75%、75%與80%、80%與85%、85%與90%之間、90%與95%或95%與99%之間。

【0077】 本文所述之組合物可包含sgRNA，其包含：

- (e) SEQ ID NO：179-184及196-200中之任一者；或
- (f) 選自SEQ ID NO：1-89中任一者之引導序列；或
- (g) 選自SEQ ID NO：1-24之引導序列；或
- (h) 選自SEQ ID NO：1-6之引導序列。

**【0078】** 本文所述之組合物可包含sgRNA，其包含：

(i) SEQ ID NO：186-192及201-212中之任一者；或

(j) 選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218中任一者之引導序列；

或

(k) 選自SEQ ID NO：90-113及213-218之引導序列；或

(l) 選自SEQ ID NO：90-95之引導序列。

**【0079】** 目標序列可於TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子1、2、3或4中。目標序列可於人類TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中。

**【0080】** 目標序列可於TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子1中。目標序列可於TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子2中。目標序列可於TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子3中。目標序列可於TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子4中。

**【0081】** 目標序列可與TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之正股中之目標序列互補。目標序列可與TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之負股中之目標序列互補。

**【0082】** 第一引導序列可與TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之正股中之第一目標序列互補，且其中該組合物進一步包含第二引導序列，其與TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之負股中之第二目標序列互補。

**【0083】** 引導RNA可包含選自SEQ ID NO 1-178中任一者之引導序列，且進一步包含SEQ ID NO：400之核苷酸序列，其中SEQ ID NO：400之核苷酸位於引導序列之3'端之後。

**【0084】** 引導RNA可包含選自SEQ ID NO 1-178中任一者之引導序列且進一步包含SEQ ID NO：401之核苷酸序列，其中SEQ ID NO：401

之核苷酸位於引導序列之3'端之後。

**【0085】** 引導RNA可根據SEQ ID NO：300之模式修飾，其中N集體為SEQ ID NO 1-89之引導序列中之任一者。SEQ ID NO：300中各N可為任何天然或非天然核苷酸，其中N形成引導序列，且引導序列使Cas9靶向TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因。

**【0086】** 第一引導RNA可包含SEQ ID NO：2之序列且第二引導RNA可包含SEQ ID NO：90之序列。

**【0087】** 前述方法中之任一者可進一步包含：

(a) 引入包含選自以下之核酸序列的第一核酸序列：(i) SEQ ID NO：250；(ii)與SEQ ID NO：250至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之核酸序列；及(iii) SEQ ID NO：250之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、500、600、700或800個核苷酸之連續子序列，

及

引入包含選自以下之核酸序列的第二核酸序列：(i) SEQ ID NO：252；(ii)與SEQ ID NO：252至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之核酸序列；及(iii) SEQ ID NO：252之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、500、600、700、800或900個核苷酸之連續子序列，

(b) 引入包含選自以下之核酸序列的第一核酸序列：(i) SEQ ID NO：513；(ii)與SEQ ID NO：513至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之核酸序列；及(iii) SEQ ID NO：513之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、

500、600、700或800個核苷酸之連續子序列，

及

引入包含選自以下之核酸序列的第二核酸序列：(i) SEQ ID NO：514；(ii)與SEQ ID NO：514至少99%、95%、90%、85%、80%、70%或60%一致之核酸序列；及(iii) SEQ ID NO：514之至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、500、600、700、800或900個核苷酸之連續子序列，

(c) 引入包含(a)之第一核酸序列及(a)之第二核酸序列的核酸序列；

或

(d) 引入包含(b)之第一核酸序列及(b)之第二核酸序列的核酸序列。

**【0088】** sgRNA可包含與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列。

**【0089】** 引導RNA可以化學方式合成。引導RNA可包含於RNP中。模板核酸可包含於病毒載體中。模板核酸可包含於非病毒遞送構築體中。適合之病毒載體在所屬技術領域中已知，例如反轉錄病毒、腺病毒、慢病毒、腺相關病毒及其雜合體。病毒載體可為慢病毒(LV)載體或腺相關病毒(AAV)載體。

**【0090】** 引導RNA可視情況包含以下修飾中之一或多者：

- i) 2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾之核苷酸。
- ii) 核苷酸之間的硫代磷酸酯(PS)鍵。
- iii) 2'-氟(2'-F)修飾之核苷酸。
- iv) 引導RNA之5'端之前五個核苷酸中之一或多者處之修飾。

- v) 引導RNA之3'端之後五個核苷酸中之一或多者處之修飾。
- vi) 引導RNA之5'端處之前四個核苷酸之間的PS鍵。
- vii) 引導RNA之3'端處之後四個核苷酸之間的PS鍵。
- viii) 引導RNA之5'端之前三個核苷酸處之2'-O-Me修飾之核苷酸。
- ix) 引導RNA之3'端之後三個核苷酸處之2'-O-Me修飾之核苷酸。

【0091】 引導RNA可包含具有如上文所闡述之修飾的SEQ ID NO：300之核苷酸。

【0092】 組合物可進一步包含醫藥學上可接受之賦形劑。

【0093】 LNP可包含生物可降解之可電離脂質，例如可電離脂質為十八-9,12-二烯酸(9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-(((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯，亦稱為(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯酸3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-(((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯。

【0094】 LNP可包含中性脂質，例如中性脂質為DSPC。

【0095】 LNP可包含輔助脂質，例如輔助脂質為膽固醇。

【0096】 LNP可包含隱形脂質，例如隱形脂質為PEG2k-DMG。

【0097】 組合物可進一步包含經RNA引導之DNA結合劑。引導RNA及經RNA引導之DNA結合劑組合物可包含於核糖核蛋白(RNP)中。

【0098】 組合物可包含經RNA引導之DNA結合劑，例如Cas9，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之mRNA，例如經RNA引導之DNA結合劑可由Cas9編碼或為Cas9蛋白質。

【0099】 組合物可為醫藥調配物且進一步包含醫藥學上可接受之載劑。

【0100】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞用於製備藥劑之用途。

【0101】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞用於治療癌症之用途。

【0102】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞用於個體之免疫療法之用途。

【0103】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞用於治療過度表現威爾姆斯氏腫瘤抗原(WT1)之腫瘤之用途。

【0104】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療疾病或病症。

【0105】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於免疫療法中。

【0106】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療癌症。

【0107】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療過度表現威爾姆斯氏腫瘤抗原(WT1)之腫瘤。

【0108】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療人類或動物之方法，該方法包含投與如本文所述之組合物、調配物、群體或細胞。

【0109】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療人類或動物之癌症之方法，該方法包含投與如本文所述之組合物、調配物、群體或細胞。

【0110】 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，

其係用於人類或動物之免疫治療方法，該方法包含投與如本文所述之組合物、調配物、群體或細胞。

**【0111】** 本發明亦提供本文所述之組合物、調配物、群體或細胞，其係用於治療人類或動物之過度表現威爾姆斯氏腫瘤抗原(WT1)之腫瘤之方法，該方法包含投與如本文所述之組合物、調配物、群體或細胞。

**【0112】** 引導RNA可具有選自SEQ ID NO：1-89中之任一者之序列。

**【0113】** 引導RNA可具有選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218中任一者之序列。

**【0114】** 亦揭示其中引導序列係選自在改變之產物中分別產生頻率為20%或更大、30%或更大、40%或更大、或50%或更大之插入或缺失的引導序列群組之實施例。

**【0115】** 亦揭示其中引導序列係選自在改變之產物中分別產生頻率為20%或更大、30%或更大、40%或更大、或50%或更大之供體核酸分子插入的引導序列群組之實施例。

**【0116】** 亦揭示任一前述實施例之組合物、調配物、群體或細胞之用途，其係用於製備用於治療個體之藥劑。個體可為人類或動物(例如人類；食蟹獼猴)。在一些實施例中，個體為人類。

**【0117】** 亦揭示前述組合物或調配物中之任一者，其係用於治療或用於修飾TRBC1、TRBC2及TRAC基因中之任何一或多者(例如在其中形成插入或缺失或在其中形成閱讀框轉移或無意義突變)。

**【0118】** 在前述細胞態樣及實施例中之任一者中，已改變包括與第一gRNA分子之靶向域互補之目標序列之基因及視情況選用之包括與第二

gRNA分子之靶向域互補之目標序列之基因及/或包括與第三gRNA分子之靶向域互補之目標序列之基因，以使得降低或去除包括與第一gRNA分子之靶向域互補之目標序列的基因及視情況選用之包括與第二gRNA分子之靶向域互補之目標序列的基因之功能產物、及/或包括與第三gRNA分子之靶向域互補之目標序列的基因之功能產物之表現。

**【0119】** 在另一態樣中，本發明提供一種提供個體之免疫治療方法，該方法包括向個體投與有效量之如本文所述之細胞，例如前述細胞態樣及實施例中任一者之細胞。

**【0120】** 在該等方法之實施例中，該方法包括在向個體投與有效量之如本文所述細胞，例如前述細胞態樣及實施例中任一者之細胞之前，投與淋巴球耗乏劑或免疫抑制劑。在另一態樣中，本發明提供一種製備細胞(例如細胞群體)之方法。

**【0121】** 免疫療法為藉由活化或抑止免疫反應進行之疾病治療。經設計以引發或擴增免疫反應之免疫療法歸類為活化免疫療法。已表明基於細胞之免疫療法對於治療一些癌症有效。諸如淋巴球、巨噬細胞、樹突狀細胞、自然殺手細胞(NK細胞)及/或細胞毒性T淋巴球(CTL)之免疫效應細胞可經計劃化以響應於腫瘤細胞之表面上所表現之異常抗原起作用。因此，癌症免疫療法允許免疫系統之組分破壞腫瘤或其他癌細胞。

**【0122】** 在另一態樣中，本發明提供一種製備用於免疫療法之細胞(例如細胞群體)之方法，該方法包括：**(a)**藉由降低或去除T細胞受體(TCR)之一或多個或所有組分之表現，例如藉由向該等細胞中引入一gRNA分子(如本文所述)或如本文所揭示之多於一個gRNA分子來修飾細胞；及**(b)**使該等細胞擴增。本發明細胞適用於例如藉由引入編碼介導

TCR/CD3 鏈信號傳導之多肽之異源序列而進一步工程改造。在一些實施例中，多肽為野生型或變異型TCR。本發明細胞亦可適用於藉由引入編碼替代抗原結合部分之異源序列，例如藉由引入編碼替代(非內源性)T細胞受體(例如經工程改造以靶向特異性蛋白質之嵌合抗原受體(CAR))之異源序列而進一步工程改造。CAR亦稱為嵌合免疫受體、嵌合T細胞受體或人造T細胞受體)。

【0123】 在另一態樣中，本發明提供一種治療有需要個體之方法，其包括投與藉由本文所述之細胞製備方法，例如前述細胞製備方法之態樣及實施例中任一者之方法所製備之細胞(例如細胞群體)。

#### 【圖式簡單說明】

【0124】 圖1顯示HEK-Cas9細胞中之TRAC編輯程度。

【0125】 圖2顯示人類CD3<sup>+</sup> T細胞中之TRAC編輯程度。

【0126】 圖3顯示人類CD3<sup>+</sup> T細胞中TRAC編輯後之TCR表現量。

【0127】 圖4A-B顯示HEK-Cas9細胞中之TRBC編輯程度。圖4A顯示TRBC1中之編輯且圖4B顯示TRBC2中之編輯。

【0128】 圖5顯示人類CD3<sup>+</sup> T細胞中之TRBC編輯程度。

【0129】 圖6顯示人類CD3<sup>+</sup> T細胞中TRBC編輯後之TCR表現量。

【0130】 圖7A-B顯示TRBC、TRAC及對照引導(SEQ ID NO: 193及194)之生物化學脫靶分析(潛在脫靶編輯部位之量測)。

【0131】 圖8A-D表明產生具有經TCR編輯T細胞之細胞的T細胞受體之基因剔除及TCR構築體之插入。圖8A顯示T細胞受體基因剔除之效率。圖8B顯示TCR構築體之慢病毒轉導之效率。圖8C顯示經編輯T細胞中TCR插入之表現。圖8D顯示經TCR編輯T細胞之表現型。

【0132】 圖9A-D顯示插入TCR之T細胞殺死初級AML母細胞之能力。圖9A至9C顯示由獲自3個攜帶HLA-A\*02:01對偶基因之不同患者之初級AML母細胞獲得之結果。圖9D顯示使用對照樣品：不攜帶特異性HLA等位基因之初級母細胞得到之結果。

【0133】 圖10表明藉由使用多個雙引導RNA同時編輯TRAC及TRBC基因座獲得之編輯頻率。

【0134】 圖11A-D顯示使用用於組合編輯之靶向TRAC及TRBC之crRNA之結果。圖11A顯示T細胞受體基因剔除之效率。圖11B顯示細胞中HD1-TCR構築體之慢病毒轉導。圖11C顯示經編輯T細胞中TCR插入之表現。圖11D顯示經TCR編輯T細胞之表現型。

【0135】 圖12A-B表明藉由使用多個單引導RNA同時編輯TRAC及TRBC基因座獲得之編輯頻率。圖12A顯示TRAC及TRBC基因座編輯之後CD3<sup>-</sup> T細胞之表現型百分比。圖11B顯示人類CD3<sup>-</sup> T細胞中TRAC及TRBC基因座中之插入或缺失形成之表現型百分比。

【0136】 圖13A-B顯示採用雙RNA引導及AAV載體(AV9)由間隙式插入模板在TRAC基因座之GFP插入程度(圖13A)，及採用此等雙RNA引導及AAV載體之TRAC基因剔除程度，其為CD3<sup>-</sup>的(圖13B)。間隙式插入模板(或簡稱為間隙式模板)包含側接「間隙」，亦即對應目標序列中不存在於間隙式插入模板中之區域的兩個序列。間隙式插入模板與靶向裂解用間隙內之位點的引導物相容，且適用於定量比較此類引導物，而不考慮此類引導是否靶向完全相同裂解位點，其限制條件為其皆靶向間隙內之裂解位點。

【0137】 圖14A-14B顯示用sgRNA及間隙式模板AV9在TRAC基因

座之GFP插入程度(圖14A)，及用此等sgRNA及間隙式模板AV9工程改造之細胞的百分比，其為表現型CD3<sup>-</sup>的(圖14B)。

【0138】 圖15A-B比較用於TCR插入之不同啟動子及反向末端重複序列(ITR)長度，如在FACS分析期間藉由陽性四聚體染色(圖15A)及平均螢光強度(MFI)(圖15B)所量測。

【0139】 圖16A-C顯示由藉由插入方案在TRAC基因座經無啟動子GFP構築體之AAV插入而工程改造之細胞中之內源性TRAC啟動子所驅動之GFP表現量。圖16A顯示模擬轉染對照，圖16B顯示RNP，且圖16C顯示RNP + AV10 - EGFP。X軸：GFP表現；Y軸：CD3e表現；如藉由FACS所量測。

【0140】 圖17A-C顯示有及無啟動子序列(PL - 無啟動子；EF1a - 啟動子EF1 $\alpha$ 或EF-1 $\alpha$ )存在下TRAC基因座之TCR構築體模板之插入效率。

【0141】 圖18A-B在有及無啟動子序列包含於轉型構築體中下使用兩種不同TCR量測插入轉型體中之脫粒。

【0142】 圖19A-B在有及無啟動子序列包含於轉型構築體中下使用兩種不同TCR量測插入轉型體中之干擾素 $\gamma$ 表現。

【0143】 圖20A-B顯示表面存在兩種TCR構築體，一者具有Cys修飾且一者不具有Cys修飾。

【0144】 圖21A-D量測插入之構築體之TCR鏈與內源性TCR鏈之間的錯配程度，如藉由流式細胞測量術所量測。圖21A及圖21B之FACS資料描述表現轉殖基因或錯配TCR之經工程改造細胞之級分，且圖20A及圖20B之經工程改造細胞以及圖21A及圖21B之經工程改造細胞中之TCR表

現強度分別以MFI圖示於圖21C及圖21D中。

【0145】 圖22量測CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>細胞中插入之構築體之TCR鏈與內源性TCR鏈之間的錯配程度，如藉由流式細胞測量術所量測。

【0146】 圖23顯示四種不同形式之TCR在有及無TRBC基因剔除下之VLD (威爾姆斯氏腫瘤抗原)四聚體染色，指示經WT1-TCR工程改造之CD8<sup>+</sup>細胞之錯配程度。

【0147】 圖24顯示四種不同TCR在有及無TRBC基因剔除下之VLD (威爾姆斯氏腫瘤抗原)四聚體染色，指示經WT1-TCR工程改造之CD4<sup>+</sup>細胞之錯配程度。

【0148】 圖25顯示有四種TCR構築體插入於TRAC基因座中以及TRBC基因剔除之CD8<sup>+</sup>細胞中之TCR表現強度，如藉由四聚體染色之MFI所量測。

【0149】 圖26顯示有四種TCR構築體插入於TRAC基因座中以及TRBC基因剔除之CD4<sup>+</sup>細胞中之TCR表現強度，如藉由四聚體染色之MFI所量測。

【0150】 圖27A-C顯示含有插入之轉殖基因TCR (AV11-TCR-A、AV13-TCR-B、AV12-TCR-C)的T細胞之細胞毒性，該插入之轉殖基因TCR亦為TRAC/TRBC雙基因剔除或TRAC單基因剔除。細胞毒性藉由在6小時之後響應於卡斯蛋白酶3/7凋亡細胞量測凋亡細胞之螢光來量測。

【0151】 圖28A-D顯示含有插入之轉殖基因TCR (AV11-TCR-A、AV14-TCR-F、AV15-TCR-G、AV16-TCR-H)的T細胞之細胞毒性，該插入之轉殖基因TCR亦為TRAC/TRBC雙基因剔除或TRAC單基因剔除。細胞毒性藉由在6小時之後響應於卡斯蛋白酶3/7凋亡細胞量測凋亡細胞之螢

光來量測。

【0152】 圖29A-G顯示含有插入之轉殖基因TCR (AV11-TCR-A、AV13-TCR-B、AV12-TCR-C、AV14-TCR-F、AV15-TCR-G、AV16-TCR-H)之T細胞之肽特異性IL-2分泌水準，該插入之轉殖基因TCR亦為TRAC/TRBC雙基因剔除或TRAC單基因剔除；如藉由ELISA所量測。

【0153】 圖30A-D顯示含有插入之轉殖基因TCR (AV11-TCR-A、AV14-TCR-F、AV15-TCR-G、AV16-TCR-H)之T細胞之肽特異性IFN- $\gamma$ 分泌水準，該插入之轉殖基因TCR亦為TRAC/TRBC雙基因剔除或TRAC單基因剔除；如藉由ELISA所量測。

【0154】 圖31A-B顯示含有插入之轉殖基因物(AV11-TCR-A、AV14-TCR-F、AV15-TCR-G、AV16-TCR-H)之CD4<sup>+</sup>及CD8<sup>+</sup> T細胞之肽特異性IFN- $\gamma$ 染色水準，該插入之轉殖基因物亦為TRAC/TRBC雙基因剔除或TRAC單基因剔除。

【0155】 圖32A-B顯示CD107a脫粒分析之結果，表明TRAC基因座中具有轉殖基因TCR之CD4<sup>+</sup>及CD8<sup>+</sup>細胞之同種異體反應性程度，其中原生TRAC發生基因剔除且有或無TRBC基因剔除存在。(AV11-TCR-A、AV14-TCR-F、AV15-TCR-G、AV16-TCR-H)。圖32A顯示CD8<sup>+</sup> T細胞中CD107a<sup>+</sup>染色細胞之百分比。圖31B顯示CD4<sup>+</sup> T細胞中CD107a<sup>+</sup>染色細胞百分比。

【0156】 圖33A-D顯示混合淋巴細胞反應之結果，表明TRAC基因座中具有轉殖基因TCR之CD4<sup>+</sup>及CD8<sup>+</sup>細胞之同種異體反應性程度，其中原生TRAC發生基因剔除且有或無TRBC基因剔除存在。CTV，CellTrace 紫(ThermoFisher)。

**【實施方式】**

**【0157】** 本申請案主張2018年10月16所申請之美國臨時專利申請案第62/746,522號及2018年10月17日申請之62/747,037之優先權，其以引用的方式併入本文中。

**【0158】** 本申請案含有序列表，該序列表已以ASCII格式以電子方式提交且以全文引用的方式併入本文中。於2019年10月14產生之ASCII複本命名為Sequence\_Listing.txt且大小係272千位元組。

**【0159】** 現將詳細參考本發明之某些實施例，其實例在附圖中加以說明。儘管本教示內容係與多個實施例結合描述，但並不意欲使本教示內容限制於彼等實施例。相反，如熟習此項技術者將瞭解，本教示內容涵蓋多種替代方案、修改及等效物。

**【0160】** 在詳細描述本教示內容之前，應瞭解，本發明不限於特定組合物或方法步驟，因而可加以改變。應注意，除非上下文另外明確指示，否則如本說明書及隨附申請專利範圍中所用，單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個參考物。因此，舉例而言，提及「結合物(a conjugate)」包括複數個結合物且提及「細胞(a cell)」包括複數個細胞及其類似物。

**【0161】** 數值範圍包括界定該範圍之數字。考慮到有效數位及與量測相關之誤差，所量測及可量測值應理解為大致的。此外，「包含(comprise/comprises/comprising)」、「含有(contain/contains/containing)」及「包括(include/includes/including)」之使用並不意欲為限制性的。應瞭解，前述一般描述與詳細描述僅為例示性及解釋性的且並不限制教示內容。

【0162】 除非說明書中具體指出，否則本說明書中敘述「包含」各種組分之實施例亦設想為「由所述組分組成」或「基本上由所述組分組成」；本說明書中敘述「由各種組分組成」之實施例亦設想為「包含」所述組分或「基本上由所述組分組成」；且本說明書中敘述「基本上由各種組分組成」之實施例亦設想為「由所述組分組成」或「包含」所述組分(此互換性並不適用於此等術語在申請專利範圍中之使用)。除非上下文另外明確指示，否則術語「或(or)」以包括性意義使用，亦即等於「及/或(and/or)」。術語「約(about)」在清單之前使用時修飾該清單之各成員。

【0163】 本文所用之章節標題僅出於組織目的而不應被視為以任何方式限制所需主題。在以引用之方式併入之任何材料與本說明書中所定義之任何術語或本說明書之任何其他表述內容相矛盾之情況下，以本說明書為準。

## I. 定義

【0164】 除非另外說明，否則如本文所用之以下術語及片語意欲具有以下含義：

【0165】 「聚核苷酸」及「核酸」在本文中用以指包含含氮雜環鹼基或鹼基類似物沿主鏈連接在一起之核苷或核苷類似物的多聚化合物，其包括習知RNA、DNA、混合RNA-DNA及為其類似物之聚合物。核酸「主鏈」可由多個鍵聯組成，其包括糖-磷酸二酯鍵聯、肽-核酸鍵聯(「肽核酸」或PNA；PCT第WO 95/32305號)、硫代磷酸酯鍵聯、甲基膦酸酯鍵聯或其組合中之一或多者。核酸之糖部分可為核糖、去氧核糖或具有取代，例如2'甲氧基或2'鹵基取代之類似化合物。含氮鹼基可為習知鹼基(A、G、C、T、U)；其類似物(例如經修飾之尿苷，諸如5-甲氧基尿

苷、假尿苷或N1-甲基假尿苷或其他)；肌核苷；嘌呤或嘧啶之衍生物(例如N<sup>4</sup>-甲基脫氧鳥苷、去氮或氮雜嘌呤、去氮或氮雜嘧啶、在5或6位具有取代基之嘧啶鹼基(例如5-甲基胞嘧啶)、在2、6或8位具有取代基之嘌呤鹼基、2-胺基-6-甲胺基嘌呤、O<sup>6</sup>-甲基鳥嘌呤、4-硫基-嘧啶、4-胺基-嘧啶、4-二甲基胍-嘧啶及O<sup>4</sup>-烷基-嘧啶；美國專利第5,378,825號及PCT第WO 93/13121號)。對於一般論述，參見*The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams等人編，第11版，1992)。核酸可包括一或多個「無鹼基」殘基，其中主鏈不包括針對聚合物位置之含氮鹼基(美國專利第5,585,481號)。核酸僅可包含習知RNA或DNA糖、鹼基及鍵聯，或可包括習知組分與取代基(例如具有2'甲氧基取代基之習知核苷或含有習知核苷與一或多個核苷類似物之聚合物)。核酸包括「鎖定核酸」(LNA)、含有一或多種LNA核苷酸單體之類似物，該等單體具有模擬糖構形之鎖定於RNA中的雙環呋喃糖單元，其會增強對互補RNA及DNA序列之雜合親和性)Vester及Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41)。RNA及DNA具有不同糖部分且不同之處可為在RNA中存在尿嘧啶或其類似物及在DNA中存在胸腺嘧啶或其類似物。

**【0166】** 「引導RNA」、「gRNA」及簡稱「引導物」在本文中互換用以指crRNA (亦稱為CRISPR RNA)或crRNA與trRNA之組合(亦稱為tracrRNA)。crRNA及trRNA可以單一RNA分子(單引導RNA，sgRNA)或以兩個個別RNA分子(雙引導RNA，dgRNA)形式締合。「引導RNA」或「gRNA」係指各類型。trRNA可為天然存在之序列或與天然存在之序列相比具有修飾或變化之trRNA序列。

**【0167】** 如本文所用，「引導序列」係指引導RNA內與目標序列互

補且用以藉由經RNA引導之DNA結合劑將引導RNA導引至目標序列以供結合或修飾(例如裂解)的序列。「引導序列」亦可稱為「靶向序列」或「間隔序列」。引導序列之長度可為20個鹼基對，例如在釀膿鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*) (亦即Spy Cas9)及相關Cas9同源物/直系同源物之情況下。較短或較長序列亦可用作引導物，例如長度為15、16、17、18、19、21、22、23、24或25個核苷酸。舉例而言，在一些實施例中，引導序列包含選自SEQ ID NO：1-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸。在一些實施例中，目標序列係於例如基因中或染色體上，且與引導序列互補。在一些實施例中，引導序列與其相應目標序列之間的互補性或一致性之程度可為約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。舉例而言，在一些實施例中，引導序列包含與選自SEQ ID NO：1-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸具有約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之序列。在一些實施例中，引導序列與目標區域可為100%互補或一致的。在其他實施例中，引導序列及目標區域可含有至少一個錯配。舉例而言，引導序列及目標序列可含有1、2、3或4個錯配，其中目標序列之總長度為至少17、18、19、20個或更多個鹼基對。在一些實施例中，引導序列及目標區域可含有1至4個錯配，其中引導序列包含至少17、18、19、20個或更多個核苷酸。在一些實施例中，引導序列及目標區域可含有1、2、3或4個錯配，其中引導序列包含20個核苷酸。

**【0168】** 經RNA引導之DNA結合劑之目標序列包括基因組DNA之正及負股(亦即既定序列及序列之反向互補序列)，此係因為經RNA引導之DNA結合劑之核酸受質為雙股核酸。因此，在引導序列稱為「與目標序

列互補」之情況下，應瞭解，引導序列可引導引導RNA以結合至目標序列之有義股或反義股(例如反向互補序列)。因此，在一些實施例中，在引導序列結合目標序列之反向互補序列之情況下，引導序列與目標序列(例如不包括PAM之目標序列)之某些核苷酸一致，但其中在引導序列中改用U取代T。

**【0169】** 如本文所用，「經RNA引導之DNA結合劑」意謂具有RNA及DNA結合活性之多肽或多肽複合物，或此類複合物之DNA結合次單元，其中DNA結合活性具有序列特異性且視RNA之序列而定。例示性經RNA引導之DNA結合劑包括Cas裂解酶/切口酶及其不活化形式(「dCas DNA結合劑」)。如本文所用，「Cas核酸酶」涵蓋Cas裂解酶、Cas切口酶及dCas DNA結合劑。在一些實施例中，Cas裂解酶或Cas切口酶涵蓋經修飾以允許例如經由與FokI域融合而進行DNA裂解之dCas DNA結合劑。Cas裂解酶/切口酶及dCas DNA結合劑包括III型CRISPR系統之Csm或Cmr複合物、其Cas10、Csm1或Cmr2次單元、I型CRISPR系統之級聯複合物、其Cas3次單元及2類Cas核酸酶。如本文所用，「第2類Cas核酸酶」為具有經RNA引導之DNA結合活性的單鏈多肽。第2類Cas核酸酶包括第2類Cas裂解酶/切口酶(例如H840A、D10A或N863A變異體)，其進一步具有經RNA引導之DNA裂解酶或切口酶活性，及第2類dCas DNA結合劑，其中裂解酶/切口酶活性未活化。第2類Cas核酸酶包括例如Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、HF Cas9 (例如N497A、R661A、Q695A、Q926A變異體)、HypaCas9 (例如N692A、M694A、Q695A、H698A變異體)、eSPCas9(1.0) (例如K810A、K1003A、R1060A變異體)及eSPCas9(1.1) (例如K848A、K1003A、R1060A變異體)蛋白質及其變體。Cpf1蛋白質

(Zetsche等人, *Cell*, 163 : 1-13 (2015))與Cas9同源且含有RuvC樣核酸酶域。Zetsche之Cpf1序列以全文引用之方式併入。參見例如Zetsche, 表S1及表S3。參見例如Makarova等人, *Nat Rev Microbiol*, 13(11) : 722-36 (2015) ; Shmakov等人, *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015)。

**【0170】** 如本文所用,「核糖核蛋白」(RNP)或「RNP複合物」係指引導RNA以及經RNA引導之DNA結合劑,諸如Cas核酸酶,例如Cas裂解酶、切口酶或dCas DNA結合劑(例如Cas9)。在一些實施例中,引導RNA將經RNA引導之DNA結合劑,諸如Cas9導引至目標序列,且該引導RNA與目標序列雜合且該結合劑結合於目標序列;在結合劑為裂解酶或切口酶之情況下,結合之後可進行裂解或切口。

**【0171】** 如本文所用,若第一序列與第二序列之比對表明整個第二序列之X%或更多之位置與第一序列匹配,則第一序列視為「包含與第二序列具有至少X%一致性之序列」。舉例而言,序列AAGA包含與序列AAG具有100%一致性之序列,原因為由於第二序列之全部三個位置均存在匹配,因此比對將得到100%一致性。RNA與DNA之間的差異(一般而言,尿苷交換為胸苷或反之亦然)及核苷類似物(諸如經修飾之尿苷)的存在不會造成聚核苷酸之間一致性或互補性的差異,只要相關核苷酸(諸如胸苷、尿苷或經修飾之尿苷)具有相同補體(例如對於胸苷、尿苷或經修飾之尿苷全體而言,為腺苷;另一實例為胞嘧啶及5-甲基胞嘧啶,兩者具有鳥苷或經修飾之鳥苷作為補體)。因此,舉例而言,序列5'-AXG (其中X為任何經修飾之尿苷,諸如假尿苷、N1-甲基假尿苷或5-甲氧基尿苷)視為與AUG具有100%一致性,因為兩者與同一序列(5'-CAU)完全互補。例示性比對算法為此項技術中熟知的史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)及尼德

曼-翁施(Needleman-Wunsch)算法。熟習此項技術者將理解何種演算法選擇及參數設置適合於待對準之給定序列對；對於具有一般類似長度及針對胺基酸之>50%預期一致性或針對核苷酸之>75%預期一致性的序列而言，由EBI於www.ebi.ac.uk網站伺服器提供尼德曼-翁施演算法介面之具有默認設置的尼德曼-翁施演算法通常為合適的。

**【0172】** 「mRNA」在本文中用於指包含可轉譯成多肽之開放閱讀框架(亦即可充當用於藉由核糖體及胺基醯化tRNA進行之轉譯之受質)之聚核苷酸。mRNA可包含磷酸酯-糖主鏈，其包括核糖殘基或其類似物，例如2'-甲氧基核糖殘基。在一些實施例中，mRNA磷酸酯-糖主鏈之糖基本上由核糖殘基、2'-甲氧基核糖殘基或其組合組成。

**【0173】** 適用於本文所述之引導RNA組合物及方法中之例示性引導序列示於表1、2及3中及整個申請案中。

**【0174】** 如本文所用，「插入或缺失」係指由多種核苷酸組成之插入或缺失突變，該等核苷酸在目標核酸中之雙股斷裂(DSB)位點進行插入或缺失。

**【0175】** 如本文所用，「阻斷基因表現」係指特定基因產物(例如蛋白質、mRNA或兩者)之表現降低。蛋白質之阻斷基因表現可藉由偵測來自所關注組織或細胞群體之蛋白質之總細胞量來量測。用於量測將mRNA阻斷基因表現的方法為已知的，且包括對自所關注之組織或細胞群體分離之mRNA進行定序。流式細胞測量術分析為用於量測蛋白質表現之阻斷基因表現的已知方法。在一些實施例中，「阻斷基因表現」可指一些特定基因產物之表現缺失，例如經轉錄之mRNA之量下降或由細胞群體表現之蛋白質之量下降。在一些實施例中，「阻斷基因表現」可指一些特定基因產

物之表現缺失，例如細胞表面之TRAC或TRBC基因產物之表現缺失。

【0176】如本文所用，「基因剔除」係指細胞中之特定蛋白質之表現缺失。基因剔除可偵測細胞、組織或細胞群體中蛋白質之總細胞量來量測。在一些實施例中，本發明之方法將一或多個細胞(例如細胞群體中)中之TRBC1、TRBC2及/或TRAC「基因剔除」。在一些實施例中，基因剔除為細胞中之T細胞受體(例如TRBC1、TRBC2及/或TRAC)之蛋白質組分之表現完全缺失，而非形成突變型T細胞受體蛋白。

【0177】如本文所用，「TRBC1」及「TRBC2」係指編碼T細胞受體 $\beta$ -鏈之兩種同源基因，其為TRBC1或TRBC2基因之基因產物。

【0178】「TRBC」在本文中用以指TRBC1及TRBC2。

【0179】人類野生型TRBC1序列可以NCBI基因ID：28639；Ensembl：ENSG00000211751獲得。T細胞受體 $\beta$ 恆定區、V\_segment轉譯產物、BV05S1J2.2、TCRBC1及TCRB為TRBC1之基因同義詞。

【0180】人類野生型TRBC2序列可以NCBI基因ID：28638；Ensembl：ENSG00000211772獲得。T細胞受體 $\beta$ 恆定區、V\_segment轉譯產物及TCRBC2為TRBC2之基因同義詞。

【0181】人類野生型TRAC序列可以NCBI基因ID：28755；Ensembl：ENSG00000277734獲得。T細胞受體 $\alpha$ 恆定區、TCRA、IMD7、TRCA及TRA為TRAC之基因同義詞。

【0182】威爾姆斯氏腫瘤蛋白質(有時亦稱為威爾姆斯氏腫瘤抗原)為由*WT1*基因編碼之蛋白質。人類野生型*WT1*序列可以NCBI基因ID：7490；Ensembl：ENSG00000184937獲得。GUD、AWT1、WAGR、WT33、NPHS4及WIT-2為WT1之基因同義詞。已報導威爾姆斯氏腫瘤蛋

白質表現於多種癌症中，包括實體腫瘤(包括(但不限於)威爾姆斯氏腫瘤)及血液癌症，以及腫瘤血管內皮細胞及造血祖細胞中。

**【0183】** 如本文所用，「目標序列」係指目標基因中與gRNA之引導序列互補的核酸序列。目標序列與引導序列之相互作用引導經RNA引導之DNA結合劑結合，且在目標序列內潛在地切口或裂解(視試劑活性而定)。

**【0184】** 如本文所用，「治療」係指投與或施用用於個體之疾病或病症的治療劑，且包括抑制疾病、遏制其顯現、減輕疾病之一或多種症狀、治癒疾病或預防疾病之一或多種症狀復發。

**【0185】** 術語「約」或「大致」意謂如由一般熟習此項技術者所測定之特定值之可接受誤差，其部分取決於如何量測或測定該值。

## II. 組合物

### A. 包含引導RNA (gRNA)之組合物

**【0186】** 本文提供適用於例如使用引導RNA與經RNA引導之DNA結合劑(例如CRISPR/Cas系統)在TRBC及/或TRAC基因內改變DNA序列，例如誘導單股斷裂(SSB)或雙股斷裂(DSB)之組合物。在一些實施例中，組合物適用於改變TRAC及/或TRBC序列且進一步插入TCR基因。

**【0187】** 在一些實施例中，相比於對照，例如TRAC及/或TRBC不改變之對照，改變TRAC及/或TRBC序列及進一步插入TCR基因宜減少TRAC及/或TRBC之錯配。舉例而言，改變TRBC序列(例如基因剔除TRBC)及進一步插入TCR基因宜減少插入之TCR與原生TRBC之間的錯配。或者，改變TRAC序列(例如基因剔除TRAC)及進一步插入TCR基因宜減少插入之TCR與原生TRAC之間的錯配。靶向TRBC基因之引導序列

以SEQ ID NO：1-89顯示於表1中。靶向TRAC基因之引導序列以SEQ ID NO：90-178、185及213-218顯示於表2中。

【0188】 在一些實施例中，引導RNA序列與根據來自人類參考基因組hg38座標之下表中所示之對應基因組區域互補。其他實施例之引導序列可與接近表1、2及/或3中之任一者中所列舉之基因組座標之序列互補。舉例而言，其他實施例之引導序列可與包含表1、2及/或3中之任一者中所列舉之基因組座標之15個連續核苷酸±10個核苷酸之序列互補。

【0189】 表1及表2中以SEQ ID NO：1-89、90-178、185及213-218所示之引導序列中之各者可進一步包含另外核苷酸以形成crRNA，例如在引導序列之3'端之後具有以下例示性核苷酸序列：在5'至3'位向之GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO：400)。在sgRNA之情況下，引導序列可進一步包含另外核苷酸以形成sgRNA，例如在引導序列之3'端之後具有以下例示性核苷酸序列：5'至3'位向之GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO：401)。引導序列可進一步包含另外核苷酸以形成sgRNA，例如在引導序列之3'端之後包含以下例示性核苷酸序列：5'至3'位向之GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO：402)。

【0190】 表1：TRBC靶向及對照引導序列及染色體座標

SEQ ID NO:	引導序列	基因組座標(hg38)
1	GGCUCUCGGAGAAUGACGAG	chr7:142791996-142792016
2	GGCCUCGGCGCUGACGAUCU	chr7:142792047-142792067
3	AUGACGAGUGGACCCAGGAU	chr7:142792008-142792028
4	AGAAGGUGGCCGAGACCCUC	chr7:142791931-142791951
5	UGAGGGUCUCGGCCACCUUC	chr7:142791930-142791950
6	AGAGAUCUCCACACCCAAA	chr7:142791748-142791768
7	UGGCUCAAACACAGCGACCU	chr7:142791720-142791740
8	GGCGCUGACGAUCUGGGUGA	chr7:142792041-142792061
9	UGGCAGACAGGACCCCUUGC	chr7:142802114-142802134
10	UGACGAGUGGACCCAGGAUA	chr7:142792009-142792029
11†	AGACAGGACCCCUUGCUGGU	chr7:142792697-142792717
12	UUGACAGCGGAAGUGGUUGC	chr7:142791963-142791983
13	CGUAGAACUGGACUUGACAG	chr7:142791976-142791996
14	CGCUGUCAAGUCCAGUUCUA	chr7:142791974-142791994
15	ACUGGACUUGACAGCGGAAG	chr7:142791970-142791990
16	GUUGCGGGGGUUCUGCCAGA	chr7:142791948-142791968
17	CUGCCUGAGCAGCCGCCUGA	chr7:142791913-142791933
18	GACAGCGGAAGUGGUUGC	chr7:142791961-142791981
19	CCACUCACCUGCUCUACCCC	chr7:142792068-142792088
20	GCUGUCAAGUCCAGUUCUAC	chr7:142791975-142791995
21	ACACUGGUGUGCCUGGCCAC	chr7:142791773-142791793
22	AGACCCUCAGGCGGCUGCUC	chr7:142791919-142791939
23	AUGGGAAGGAGGUGCACAGU	chr7:142791834-142791854
24	AGGGCGGGCUGCUCCUUGAG	chr7:142791878-142791898
25	UCCCUAGCAAGAUCUCAUAG	chr7:142802141-142802161
26†	GGUGCACAGUGGGGUCAGCA	chr7:142791844-142791864
27	CCAGCUCAGCUCCACGUGGU	chr7:142801154-142801174
28	CCGCAACCACUCCGCUGUC	chr7:142791961-142791981
29	GUCCACUCGUCAUUCUCCGA	chr7:142792001-142792021
30	GCCCGUAGAACUGGACUUGA	chr7:142791979-142791999
31	UCACCCAGAUCGUCAGCGCC	chr7:142792041-142792061
32	GGGUCCACUCGUCAUUCUCC	chr7:142792003-142792023
33	UCCAGUUCUACGGGCUCUCG	chr7:142791984-142792004
34	CGGAGAAUGACGAGUGGACC	chr7:142792002-142792022
35	ACCACUCCGCUGUCAAGUC	chr7:142791966-142791986
36	AAUGACGAGUGGACCCAGGA	chr7:142792007-142792027

SEQ ID NO:	引導序列	基因組座標(hg38)
37	ACGGGCUCUCGGAGAAUGAC	chr7:142791993-142792013
38	GACUCCAGAUACUGCCUGAG	chr7:142791902-142791922
39	CGCUGUGUUUGAGCCAUCAG	chr7:142791724-142791744
40	AGAACUGGACUUGACAGCGG	chr7:142791973-142791993
41	GAGACCCUCAGGCGGCUGCU	chr7:142791920-142791940
42	CGUCAUUCUCCGAGAGCCCG	chr7:142791994-142792014
43	CAGCCCGCCCUCAAUGACUC	chr7:142791887-142791907
44	GGCUGCUCAGGCAGUAUCUG	chr7:142791907-142791927
45	AGUGGUUGCGGGGGUUCUGC	chr7:142791952-142791972
46	GGUCGCUGUGUUUGAGCCAU	chr7:142791721-142791741
47	GAUCUCAUAGAGGAUGGUGG	chr7:142792718-142792738
48	UGUUUGAGCCAUCAGAAGCA	chr7:142791729-142791749
49	UACUGCCUGAGCAGCCGCCU	chr7:142791911-142791931
50	ACCCGCAGCCCUCAAGGAG	chr7:142791867-142791887
51	AGGCAGUAUCUGGAGUCAUU	chr7:142791899-142791919
52	UGUGUUUGAGCCAUCAGAAG	chr7:142791727-142791747
53	GGUUGCGGGGGUUCUGCCAG	chr7:142791949-142791969
54	GGGUCUCGGCCACCUUCUGG	chr7:142791933-142791953
55	CAGAAGGUGGCCGAGACCCU	chr7:142791932-142791952
56	CGCCGAGGCCUGGGGUAGAG	chr7:142792057-142792077
57	GGUUCUGCCAGAAGGUGGCC	chr7:142791940-142791960
58	CAGAGAUCUCCACACCCAA	chr7:142791747-142791767
59	UUGAGGGCGGGCUGCUCCUU	chr7:142791881-142791901
60	AAGCCUGUGGCCAGGCACAC	chr7:142791779-142791799
61	CAGCGCCGAGGCCUGGGGUA	chr7:142792054-142792074
62	CCCACUCACCUGCUCUACCC	chr7:142792069-142792089
63	UGUCUGCCACCAUCCUCUAU	chr7:142792712-142792732
64	UGCUCUGAUGGCUCAACA	chr7:142791729-142791749
65	UUCCCAUUCACCCACCAGCU	chr7:142791821-142791841
66	GUCAGCGCCGAGGCCUGGGG	chr7:142792052-142792072
67	CCCUCAGGCGGCUGCUCAGG	chr7:142791916-142791936
68	AAUGACUCCAGAUACUGCCU	chr7:142791899-142791919
69	CACACUGGUGUGCCUGGCCA	chr7:142791772-142791792
70	UCAUAGAGGAUGGUGGCAGA	chr7:142792714-142792734
71	CACCCAGAUCGUCAGCGCCG	chr7:142792042-142792062
72	UGACAGCGGAAGUGGUUGCG	chr7:142791962-142791982
73	UCUCCGAGAGCCCGUAGAAC	chr7:142791988-142792008

SEQ ID NO:	引導序列	基因組座標(hg38)
74	AGUCCAGUUCUACGGGCUCU	chr7:142791982-142792002
75	AUCGUCAGCGCCGAGGCCUG	chr7:142792049-142792069
76	AAGGAGGUGCACAGUGGGGU	chr7:142791839-142791859
77	UAUCUGGAGUCAUUGAGGGC	chr7:142791893-142791913
78	GCGGGGGUUCUGCCAGAAGG	chr7:142791945-142791965
79	CUUGACAGCGGAAGUGGUUG	chr7:142791964-142791984
80	GUGUGGCCUUUUGGGUGUGG	chr7:142791757-142791777
81	GAUCGUCAGCGCCGAGGCCU	chr7:142792048-142792068
82	UGUGGCCAGGCACACCAGUG	chr7:142791774-142791794
83	AGGCCUCGGCGCUGACGAUC	chr7:142792048-142792068
84	GUGAAUGGGAAGGAGGUGCA	chr7:142791830-142791850
85	GCGGCUCGUCAGGCAGUAUC	chr7:142791909-142791929
86	ACUGCCUGAGCAGCCGCCUG	chr7:142791912-142791932
87	AAAGGCCACACUGGUGUGCC	chr7:142791766-142791786
88	UGAGGGCGGGCUGCUCCUUG	chr7:142791880-142791900
89	GAGCAGCCGCCUGAGGGUCU	chr7:142791919-142791939

此等引導序列中之各者通常靶向TRBC1與TRBC2基因，但具有以下例外，其如下標記：

† SEQ ID NO：11及26尤其靶向TRBC1。

【0191】表2：TRAC靶向及對照引導序列及染色體座標

SEQ ID NO:	引導序列	基因組座標(hg38)
90	CUCUCAGCUGGUACACGGCA	chr14:22547524-22547544
91	UUCGGAACCCAAUCACUGAC	chr14:22550581-22550601
92	UAAACCCGGCCACUUUCAGG	chr14:22550608-22550628
93	GAUUAAACCCGGCCACUUUC	chr14:22550611-22550631
94	CGUCAUGAGCAGAUUAAACC	chr14:22550622-22550642
95	AGAGUCUCUCAGCUGGUACA	chr14:22547529-22547549
96	ACACGGCAGGGUCAGGGUUC	chr14:22547512-22547532
97	UCUCUCAGCUGGUACACGGC	chr14:22547525-22547545
98	UGGAUUUAGAGUCUCUCAGC	chr14:22547536-22547556
99	GAGAAUCAAAAUCGGUGAAU	chr14:22547575-22547595
100	ACAAAACUGUGCUAGACAUG	chr14:22547640-22547660
101	UGUGCUAGACAUGAGGUCUA	chr14:22547647-22547667
102	GCACCAAAGCUGCCCUUACC	chr14:22547777-22547797
103	AAGUUCCUGUGAUGUCAAGC	chr14:22549638-22549658

SEQ ID NO:	引導序列	基因組座標(hg38)
104	CUCGACCAGCUUGACAUCAC	chr14:22549646-22549666
105	AUCCUCCUCCUGAAAGUGGC	chr14:22550600-22550620
106	ACCCGGCCACUUUCAGGAGG	chr14:22550605-22550625
107	UUAUCUGCUCAUGACGCUG	chr14:22550625-22550645
108	ACACGGAUGAACAAUAAGGC	chr14:22539116-22539136
109	ACUUACACGGAUGAACAAUA	chr14:22539120-22539140
110	GCUGGUACACGGCAGGGUCA	chr14:22547518-22547538
111	GGAAGCUACAUAACCUACAUI	chr14:22539082-22539102
112	UCCUCACUGUGUGCAUCAGG	chr14:22539061-22539081
113	CUGGUUCCUCUCCAAAUGU	chr14:22539097-22539117
114	AAAGUCAGAUUUGUUGCUC	chr14:22547697-22547717
115	UUCAAAACCUGUCAGUGAUU	chr14:22550571-22550591
116	UGCUCAUGACGCUGCGGCUG	chr14:22550631-22550651
117	UCAAGGCCCCUCACCUCAGC	chr14:22550658-22550678
118	GGCGUUUGCACAUGCAAAGU	chr14:22547712-22547732
119	GACCACAGCCGCAGCGUCAU	chr14:22550636-22550656
120	AUGACGCUGCGGCUGUGGUC	chr14:22550636-22550656
121	AUUCGGAACCCAAUCACUGA	chr14:22550582-22550602
122	AACCCGGCCACUUUCAGGAG	chr14:22550606-22550626
123	UUAACCCGGCCACUUUCAG	chr14:22550609-22550629
124	AGAUUUGUUGCUCAGGCCA	chr14:22547691-22547711
125	UGAGAAUCAAAAUCGGUGAA	chr14:22547576-22547596
126	GAUGUCAAGCUGGUCGAGAA	chr14:22549648-22549668
127	GUUUCAAAGCUUUUCUCGAC	chr14:22549660-22549680
128	UGAAGGCGUUUGCACAUGCA	chr14:22547716-22547736
129	ACCCUGACCCUGCCGUGUAC	chr14:22547514-22547534
130	AGCUUCAAGGCCCCUCACCU	chr14:22550662-22550682
131	GUUCCGAAUCCUCCUCCUGA	chr14:22550593-22550613
132	AGAUUAAACCCGGCCACUUU	chr14:22550612-22550632
133	CCUGCCGUGUACCAGCUGA	chr14:22547521-22547541
134	UCACUGGAUUUAGAGUCUCU	chr14:22547540-22547560
135	UACUUACACGGAUGAACAAU	chr14:22539121-22539141
136	UAUCACAGACAAAACUGUGC	chr14:22547632-22547652
137	CCACAGCACUGUUGCUCUUG	chr14:22547674-22547694
138	CCUGUGAUGUCAAGCUGGUC	chr14:22549643-22549663
139	ACAUGAGGUCUAUGGACUUC	chr14:22547655-22547675
140	ACUGUUGCUCUUGAAGUCCA	chr14:22547667-22547687

SEQ ID NO:	引導序列	基因組座標(hg38)
141	AGCUACAUAACCUACAUUUGG	chr14:22539085-22539105
142	UAGAAAGUUCUGUGAUGUC	chr14:22549634-22549654
143	UCACUGUGUGCAUCAGGAGG	chr14:22539064-22539084
144	GACAAAACUGUGCUAGACAU	chr14:22547639-22547659
145	CUUCAACAACAGCAUUAUUC	chr14:22547731-22547751
146	CAACAACAGCAUUAUUCAG	chr14:22547734-22547754
147	UCUCAAAACAAAUGUGUCACA	chr14:22547591-22547611
148	AUGAGGUCUAUGGACUUCAA	chr14:22547657-22547677
149	GACCCUGCCGUGUACCAGCU	chr14:22547519-22547539
150	CCCCUGUCUUACCUGUUUCA	chr14:22549674-22549694
151	AGCAACAGUGCUGUGGCCUG	chr14:22547678-22547698
152	CUACAUAACCUACAUUUGGAA	chr14:22539087-22539107
153	ACUUUGUGACACAUUUGUUU	chr14:22547595-22547615
154	AUCACAGACAAAACUGUGCU	chr14:22547633-22547653
155	UUCAACAACAGCAUUAUUC	chr14:22547732-22547752
156	CAUGAGGUCUAUGGACUUCA	chr14:22547656-22547676
157	GCUACAUAACCUACAUUUGGA	chr14:22539086-22539106
158	CUCUUGUCCACAGAUAUCC	chr14:22547491-22547511
159	GAUUCUGAUGUGUAUAUCAC	chr14:22547618-22547638
160	CUGUGAUGUCAAGCUGGUCG	chr14:22549644-22549664
161	CCUGCCGUGUACCAGCUGAG	chr14:22547522-22547542
162	ACAUACCUACAUUUGGAAGA	chr14:22539089-22539109
163	CCUCACUGUGUGCAUCAGGA	chr14:22539062-22539082
164	ACAAAUGUGUCACAAAGUAA	chr14:22547597-22547617
165	GAGCAACAGUGCUGUGGCCU	chr14:22547677-22547697
166	UCGACCAGCUUGACAUCACA	chr14:22549645-22549665
167	AUUAAACCCGGCCACUUUCA	chr14:22550610-22550630
168	CACGGCAGGGUCAGGGUUCU	chr14:22547511-22547531
169	AAACCCGGCCACUUUCAGGA	chr14:22550607-22550627
170	CAAGGCCCCUCACCUCAGCU	chr14:22550657-22550677
171	CCCGGCCACUUUCAGGAGGA	chr14:22550604-22550624
172	CAUUUCUAUAAUACUUACAC	chr14:22539132-22539152
173	ACAGCCGCAGCGUCAUGAGC	chr14:22550632-22550652
174	AUCAAAAUCGGUGAAUAGGC	chr14:22547571-22547591
175	GCGUUUGCACAUGCAAAGUC	chr14:22547711-22547731
176	CUGUUGCUCUUGAAGUCCA	chr14:22547666-22547686
177	AAAUCGGUGAAUAGGCAGAC	chr14:22547567-22547587

SEQ ID NO:	引導序列	基因組座標(hg38)
178	UUGUCUGUGAUUAUACACAUC	chr14:22547624-22547644
185	UCAGGGUUCUGGAUAUCUGU	chr14:22547501-22547521
213	AGCUGGUACACGGCAGGGUC	chr14:22547519-22547539
214	UAGGCAGACAGACUUGUCAC	chr14:22547556-22547576
215	UCUGUGGGACAAGAGGAUCA	chr14:22547486-22547506
216	AUCUGUGGGACAAGAGGAUC	chr14:22547487-22547507
217	CUGGAUAUCUGUGGGACAAG	chr14:22547493-22547513
218	GUCAGGGUUCUGGAUAUCUG	chr14:22547502-22547522

【0192】 表3：sgRNA序列、命名法及組分子序列

SEQ ID NO:	sgRNA序列	基因組座標(hg38)
179	GGCUCUCGGAGAAUGACGAGGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791996-142792016
180	GGCCUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142792047-142792067
181	AUGACGAGUGGACCCAGGAUGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142792008-142792028
182	AGAAGGUGGCCGAGACCCUCGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791931-142791951
183	UGAGGGUCUCGGCCACCUUCGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791930-142791950
184	AGAGAUCUCCCACACCCAAAGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791748-142791768
186	CUCUCAGCUGGUACACGGCAGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG	chr14:22547529-22547549

SEQ ID NO:	sgRNA序列	基因組座標(hg38)
	GCACCGAGUCGGUGCUUUU	
187	UUCGGAACCCAAUCACUGACGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22550611-22550631
188	UAAACCCGGCCACUUCAGGGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22547501-22547521
189	GAUUAACCCGGCCACUUCGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22550608-22550628
190	CGUCAUGAGCAGAUUAAACCGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22547529-22547549
191	AGAGUCUCUCAGCUGGUACAGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22547524-22547544
192	UCAGGGUUCUGGAUAUCUGUGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22550622-22550642
193	mG*mA*mG*UCCGAGCAGAAGAAGAAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr2:72933852-72933872
194	mG*mA*mC*CCCCUCCACCCCGCCUCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:43770821-43770841
195	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU	chr14:22550581-22550601

SEQ ID NO:	sgRNA序列	基因組座標(hg38)
	AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC ACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	
196	GGCUCUCGGAGAAUGACGAGGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791996-142792016
197	GGCCUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142792047-142792067
198	AUGACGAGUGGACCCAGGAUGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142792008-142792028
199	UGAGGGUCUCGGCCACCUUCGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791930-142791950
200	AGAGAUCUCCCACACCCAAAGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791748-142791768
201	mA*mC*mA*CGGCAGGGUCAGGGUUCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547512-22547532
202	mA*mG*mC*UGGUACACGGCAGGGUUCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547519-22547539
203	mC*mU*mC*UCAGCUGGUACACGGCAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm	chr14:22547524-22547544

SEQ ID NO:	sgRNA序列	基因組座標(hg38)
	GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
204	mU*mC*mU*CUCAGCUGGUACACGGCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547525-22547545
205	mU*mG*mG*AUUUAGAGUCUCUCAGCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547536-22547556
206	mU*mA*mG*GCAGACAGACUUGUCACGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547556-22547576
207	mU*mC*mU*GUGGGACAAGAGGAUCAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547486-22547506
208	mA*mU*mC*UGUGGGACAAGAGGAUCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547487-22547507
209	mC*mU*mG*GAUAUCUGUGGGACAAGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547493-22547513

SEQ ID NO:	sgRNA序列	基因組座標(hg38)
210	mG*mU*mC*AGGGUUCUGGAUAUCUGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547502-22547522
211	mU*mC*mA*GGGUUCUGGAUAUCUGUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547501-22547521
212	UAGGCAGACAGACUUGUCACGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22547556-22547576

\* = PS鍵聯；m = 2'-O-Me核苷酸；N = 任何天然或非天然核苷酸

【0193】 在一些實施例中，本發明提供一種包含一或多種引導RNA (gRNA)之組合物，該或該等引導RNA包含將經RNA引導之DNA結合劑(其可為核酸酶(例如Cas核酸酶，諸如Cas9))引導至TRBC1、TRBC2及/或TRAC中之目標DNA序列之引導序列。gRNA可包含表1或2中所示之引導序列。在一些實施例中，gRNA包含以下序列：  
(N)<sub>x</sub>GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC  
GUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGC (SEQ ID  
NO: 403)，其中「N」可為任何天然或非天然核苷酸，且其中全部N包含如本文所述之TRBC或TRAC引導序列。gRNA可包含有包含表1至3中所示之引導序列的crRNA。gRNA可包含有包含表1及2中所示之引導序列之17、18、19或20個連續核苷酸之crRNA。在一些實施例中，gRNA包含有包含與表1及2中所示之引導序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸具

有約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之序列的crRNA。在一些實施例中，gRNA包含有包含與表1及2中所示之引導序列具有約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之序列的crRNA。gRNA可進一步包含trRNA。在本文所述之各實施例中，crRNA及trRNA可締合為單一RNA (sgRNA) 或可於個別RNA (dgRNA)上。在sgRNA之情形下，crRNA及trRNA組分可例如經由磷酸二酯鍵或其他共價鍵共價連接。

**【0194】** 在本文所述之各實施例中，引導RNA可包含呈「雙引導RNA」或「dgRNA」形式之兩個RNA分子。dgRNA包含有包含crRNA之第一RNA分子，該crRNA包含例如表1及2中所示之引導序列，及包含trRNA之第二RNA分子。第一及第二RNA分子可非共價連接，但可經由crRNA與trRNA之各部分之間的鹼基配對形成RNA雙螺旋體。

**【0195】** 在本文所述之各實施例中，引導RNA可包含呈「單引導RNA」或「sgRNA」形式之單一RNA分子。sgRNA可包含與trRNA共價連接之crRNA (或其部分)，該crRNA包含表1及2中所示之引導序列。sgRNA可包含表1及2中所示之引導序列之17、18、19或20個連續核苷酸。在一些實施例中，crRNA及trRNA經由連接子共價連接。在一些實施例中，sgRNA經由crRNA與trRNA之各部分之間的鹼基配對形成莖環結構。在一些實施例中，crRNA及trRNA經由一或多個不為磷酸二酯鍵之鍵共價連接。

**【0196】** 在一些實施例中，trRNA可包含來源於天然產生之CRISPR/Cas系統的trRNA序列之全部或一部分。在一些實施例中，trRNA包含經截短或經修飾之野生型trRNA。trRNA之長度視所用

CRISPR/Cas系統而定。在一些實施例中，trRNA包含或由以下組成：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個或多於100個核苷酸。在一些實施例中，trRNA可包含某些二級結構，諸如一或多種髮夾結構或莖環結構或一或多種隆突結構。

**【0197】** 在一些實施例中，本發明提供一種包含一或多種引導RNA之組合物，該或該等引導RNA包含SEQ ID NO：1-89及90-178中任一者之引導序列。

**【0198】** 在一些實施例中，本發明提供一種包含一或多種sgRNA之組合物，該或該等sgRNA包含SEQ ID NO：179-184中之任一者。

**【0199】** 在一個態樣中，本發明提供一種包含gRNA之組合物，該gRNA包含與SEQ ID NO：1-89、90-178、185及213-218之核酸中之任一者至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列。

**【0200】** 在其他實施例中，組合物包含至少一種，例如至少兩種gRNA，該或該等gRNA包含選自SEQ ID NO：1-89、90-178、185及213-218之引導序列中之任何兩者或更多者之引導序列。在一些實施例中，組合物包含至少兩種gRNA，其各自包含與SEQ ID NO：1-89、90-178、185及213-218之核酸中之任一者至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列。

**【0201】** 本發明之引導RNA組合物經設計以識別(例如雜合至)TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中之目標序列。舉例而言，TRBC1、TRBC2及/或TRAC目標序列可藉由包含引導RNA之提供之Cas

裂解酶識別且裂解。在一些實施例中，諸如Cas裂解酶之經RNA引導之DNA結合劑可藉由引導RNA引導至TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之目標序列，其中引導RNA之引導序列與目標序列雜合，且諸如Cas裂解酶之經RNA引導之DNA結合劑裂解目標序列。

**【0202】** 在一些實施例中，一或多種引導RNA之選擇基於TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之目標序列而確定。

**【0203】** 不受任何特定理論束縛，基因之某些區中之突變(例如由由於核酸酶介導之DSB而發生之插入或缺失所產生之框移突變)可能要比基因之其他區中之突變更不可容許，因此DSB之位置在可引起之蛋白質阻斷基因表現的量或類型方面為重要因素。在一些實施例中，使用與TRBC1、TRBC2及/或TRAC內之目標序列互補或具有互補性的gRNA來將經RNA引導之DNA結合劑引導至適當TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中之特定位置。在一些實施例中，gRNA經設計以具有與TRBC1及/或TRBC2之外顯子1、外顯子2、外顯子3或外顯子4中之目標序列及/或TRAC之外顯子1、外顯子2、外顯子3或外顯子4中之目標序列互補或具有互補性的引導序列。

**【0204】** 在一些實施例中，引導序列與人類TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中所存在之目標序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致。在一些實施例中，目標序列可與引導RNA之引導序列互補。在一些實施例中，引導RNA之引導序列與其相應目標序列之間的互補性或一致性之程度可為至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些實施例中，gRNA之目標序列及引導序列可為100%互補或一致的。在其他實施例中，gRNA之目

標序列及引導序列可含有至少一個錯配。舉例而言，gRNA之目標序列及引導序列可含有1、2、3或4個錯配，其中引導序列之總長度為20。在一些實施例中，gRNA之目標序列及引導序列可含有1至4個錯配，其中引導序列為約20個核苷酸。

【0205】 在一些實施例中，本文所揭示之組合物或調配物包含mRNA，其包含編碼經RNA引導之DNA結合劑，諸如如本文所述之Cas核酸酶之開放閱讀框架(ORF)。在一些實施例中，提供、使用或投與mRNA，其包含編碼經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas核酸酶之ORF。

### **B. 經修飾之gRNA及mRNA**

【0206】 在一些實施例中，gRNA經化學修飾。在一些實施例中，gRNA包含一或多個經修飾核苷或核苷酸且可稱為「經修飾之」gRNA或「經化學修飾之」gRNA，用於描述替代或外加典型A、G、C及U殘基使用之一或多種非天然及/或天然產生之組分或組態之存在。在一些實施例中，經修飾之gRNA係藉由非典型核苷或核苷酸合成，此處稱為「經修飾」。經修飾之核苷及核苷酸可包括以下中之一或多者：(i)磷酸二酯主鏈鍵聯中之非鍵聯磷酸氧中之一者或兩者及/或鍵聯磷酸氧中之一或多者之改變，例如置換(例示性主鏈修飾)；(ii)核糖成分，例如核糖上之2'羥基之改變，例如置換(例示性糖修飾)；(iii)用「去磷酸」連接子批量置換磷酸酯部分(例示性主鏈修飾)；(iv)天然產生之核鹼基之修飾或置換，包括用非典型核鹼基(例示性鹼基修飾)；(v)核糖-磷酸酯主鏈之置換或修飾(例示性主鏈修飾)；(vi)寡核苷酸之3'端或5'端之修飾，例如末端磷酸酯基之移除、修飾或置換或部分、帽或連接子之結合(此類3'或5'帽修飾可包含糖及/或主鏈修飾)；及(vii)糖之修飾或置換(例示性糖修飾)。

**【0207】** 可組合化學修飾，諸如上文所列之彼等修飾以提供經修飾之gRNA及/或mRNA，其包含可具有二、三、四個或更多個修飾之核苷及核苷酸(統稱為「殘基」)。舉例而言，經修飾之殘基可具有經修飾之糖及經修飾之核鹼基。在一些實施例中，gRNA之各鹼基經修飾，例如所有鹼基具有經修飾之磷酸酯基，諸如硫代磷酸酯基。在某些實施例中，gRNA分子之所有或基本上所有磷酸酯基經硫代磷酸酯基置換。在一些實施例中，經修飾之gRNA在RNA之5'端處或附近包含至少一個經修飾之殘基。在一些實施例中，經修飾之gRNA在RNA之3'端處或附近包含至少一個經修飾之殘基。

**【0208】** 在一些實施例中，gRNA包含一、二、三個或更多個經修飾之殘基。在一些實施例中，經修飾之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%)之位置為經修飾之核苷或核苷酸。

**【0209】** 未經修飾之核酸可易於藉由例如細胞內核酸酶或見於血清中之彼等核酸酶降解。舉例而言，核酸酶可水解核酸磷酸二酯鍵。因此，在一個態樣中，本文所述之gRNA可含有一或多個經修飾之核苷或核苷酸，例如以引入針對胞內核酸酶或基於血清之核酸酶之穩定性。在一些實施例中，本文所述之經修飾之gRNA分子在活體內及離體引入至細胞群體中時可展現降低之先天性免疫反應。術語「先天性免疫反應」包括針對外源性核酸(包括單股核酸)之細胞反應，其涉及誘導細胞介素(尤其干擾素)表現及釋放，及細胞死亡。

【0210】 在主鏈修飾之一些實施例中，經修飾之殘基之磷酸酯基可藉由用不同取代基置換一或多個氧而經修飾。另外，經修飾之殘基，例如存在於經修飾之核酸中之經修飾之殘基可包括用如本文所述之經修飾之磷酸酯基批量置換未經修飾之磷酸酯部分。在一些實施例中，磷酸酯主鏈之主鏈修飾可包括產生不帶電連接子或具有不對稱電荷分佈之帶電連接子的改變。

【0211】 經修飾之磷酸酯基之實例包括硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼烷磷酸酯、硼烷磷酸酯、氫膦酸酯、胺基磷酸酯、膦酸烷酯及烷基磷酸三酯或膦酸芳酯及芳基磷酸三酯。未經修飾之磷酸酯基中之磷原子為非對掌性的。然而，用以上原子或原子組中之一者置換非橋聯氧中之一者可使得磷原子為對掌性的。立體對稱磷原子可具有「R」組態(本文中為Rp)或「S」組態(本文中為Sp)。主鏈亦可藉由用氮(橋聯胺基磷酸酯)、硫(橋聯硫代磷酸酯)及碳(橋聯亞甲基膦酸酯)替換橋聯氧(亦即連接磷酸酯與核苷之氧)而加以修飾。置換可發生在任一連接氧或兩個連接氧處。

【0212】 磷酸酯基可在某些主鏈修飾中經不含磷之連接基團置換。在一些實施例中，帶電磷酸酯基可經中性部分置換。可置換磷酸酯基之部分之實例可包括(但不限於)例如膦酸甲酯、羥胺基、矽氧烷、碳酸酯、羧甲基、胺基甲酸酯、醯胺、硫醚、環氧乙烷連接子、磺酸酯、磺醯胺、硫代甲縮醛、甲縮醛、胍、亞甲基亞胺基、亞甲基甲基亞胺基、亞甲基胍、亞甲基二甲基胍及亞甲氧基甲基亞胺基。

【0213】 亦可構築可模擬核酸之骨架，其中磷酸酯連接子及核糖經耐核酸酶性核苷或核苷酸替代物置換。此類修飾可包含主鏈及糖修飾。在一些實施例中，核鹼基可藉由替代主鏈繫栓。實例可包括(但不限於)N-嗎

啉基、環丁基、吡咯啉及肽核酸(PNA)核苷替代物。

【0214】 經修飾之核苷及經修飾之核苷酸可包括一或多個針對糖基之修飾，亦即糖修飾。舉例而言，2'羥基(OH)可經修飾，例如經多個不同「氧基」或「去氧」取代基置換。在一些實施例中，針對2'羥基之修飾可增強核酸之穩定性，此係因為羥基可不再經去質子化以形成2'-烷氧離子。

【0215】 2'羥基修飾之實例可包括烷氧基或芳氧基(OR，其中「R」可為例如烷基、環烷基、芳基、芳烷基、雜芳基或糖)；聚乙二醇(PEG)， $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ ，其中R可為例如H或視情況經取代之烷基，且n可為0至20之整數(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及4至20)。在一些實施例中，2'羥基修飾可為2'-O-Me。在一些實施例中，2'羥基修飾可為2'-氟修飾，其用氟置換2'羥基。在一些實施例中，2'羥基修飾可包括「鎖定」核酸(LNA)，其中2'羥基可例如藉由C<sub>1-6</sub>伸烷基或C<sub>1-6</sub>伸雜烷基橋鍵連接至同一核糖之4'碳，其中例示性橋鍵可包括亞甲基、丙烯、醚或胺基橋鍵；O-胺基(其中胺基可為例如NH<sub>2</sub>；烷胺基、二烷胺基、雜環基、芳胺基、二芳胺基、雜芳胺基或二雜芳胺基、乙二胺或聚胺基)及胺基烷氧基、 $O(CH_2)_n$ -胺基，(其中胺基可為例如NH<sub>2</sub>；烷胺基、二烷胺基、雜環基、芳胺基、二芳胺基、雜芳胺基或二雜芳胺基、乙二胺或聚胺基)。在一些實施例中，2'羥基修飾可包括「未鎖定」核酸(UNA)，其中核糖環缺乏C2'-C3'鍵。在一些實施例中，2'羥基修飾可包括甲氧基乙基(MOE)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>，例如PEG衍生物)。

【0216】 「去氧」2'修飾可包括氫(亦即去氧核糖，例如在部分

dsRNA之突出部分)；鹵基(例如溴、氯、氟或碘基)；胺基(其中胺基可為例如NH<sub>2</sub>；烷胺基、二烷基胺基、雜環基、芳胺基、二芳胺基、雜芳胺基、二雜芳胺基或胺基酸)；NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-胺基(其中胺基可例如如本文所述)、-NHC(O)R (其中R可為例如烷基、環烷基、芳基、芳烷基、雜芳基或糖)、氰基；巰基；烷基-硫基-烷基；硫烷氧基；及烷基、環烷基、芳基、烯基及炔基，其可視情況經例如如本文所述之胺基取代。

**【0217】** 糖修飾可包含亦可含有一或多個碳之糖基，其具有與核糖中之對應碳相反的立體化學組態。因此，經修飾之核酸可包括含有例如作為糖之阿拉伯糖之核苷酸。經修飾之核酸亦可包括無鹼基糖。此等無鹼基糖亦可進一步在成分糖原子中之一或多者處經修飾。經修飾之核酸亦可包括一或多種呈L形式之糖，例如L-核昔。

**【0218】** 可併入至經修飾之核酸中之本文所述之經修飾之核昔及經修飾之核苷酸可包括經修飾之核鹼基，亦稱為核鹼基。核鹼基之實例包括(但不限於)腺嘌呤(A)、鳥嘌呤(G)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U))。此等核鹼基可經修飾或完全置換以得到可併入至經修飾之核酸中之經修飾之殘基。核苷酸之核鹼基可獨立地選自嘌呤、嘧啶、嘌呤類似物或嘧啶類似物。在一些實施例中，核鹼基可包括例如天然產生之鹼基衍生物及合成鹼基衍生物。

**【0219】** 在採用雙引導RNA之實施例中，crRNA及tracr RNA中之各者可含有修飾。此類修飾可於crRNA及/或tracr RNA之一或兩個末端。在包含sgRNA之實施例中，sgRNA之一或兩個末端之一或多個殘基可經化學修飾，及/或內部核昔可經修飾，及/或整個sgRNA可經化學修飾。某

些實施例包含5'端修飾。某些實施例包含3'端修飾。某些實施例包含5'端修飾及3'端修飾。

【0220】 在一些實施例中，本文所揭示之引導RNA包含2017年12月8日申請之標題為「Chemically Modified Guide RNAs」之WO2018/107028 A1中所揭示之修飾模式中之一者，其內容以全文引用的方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之引導RNA包含US20170114334中所揭示之結構/修飾模式中之一者，其內容以全文引用的方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之引導RNA包含WO2017/136794中所揭示之結構/修飾模式中之一者，其內容以全文引用的方式併入本文中。

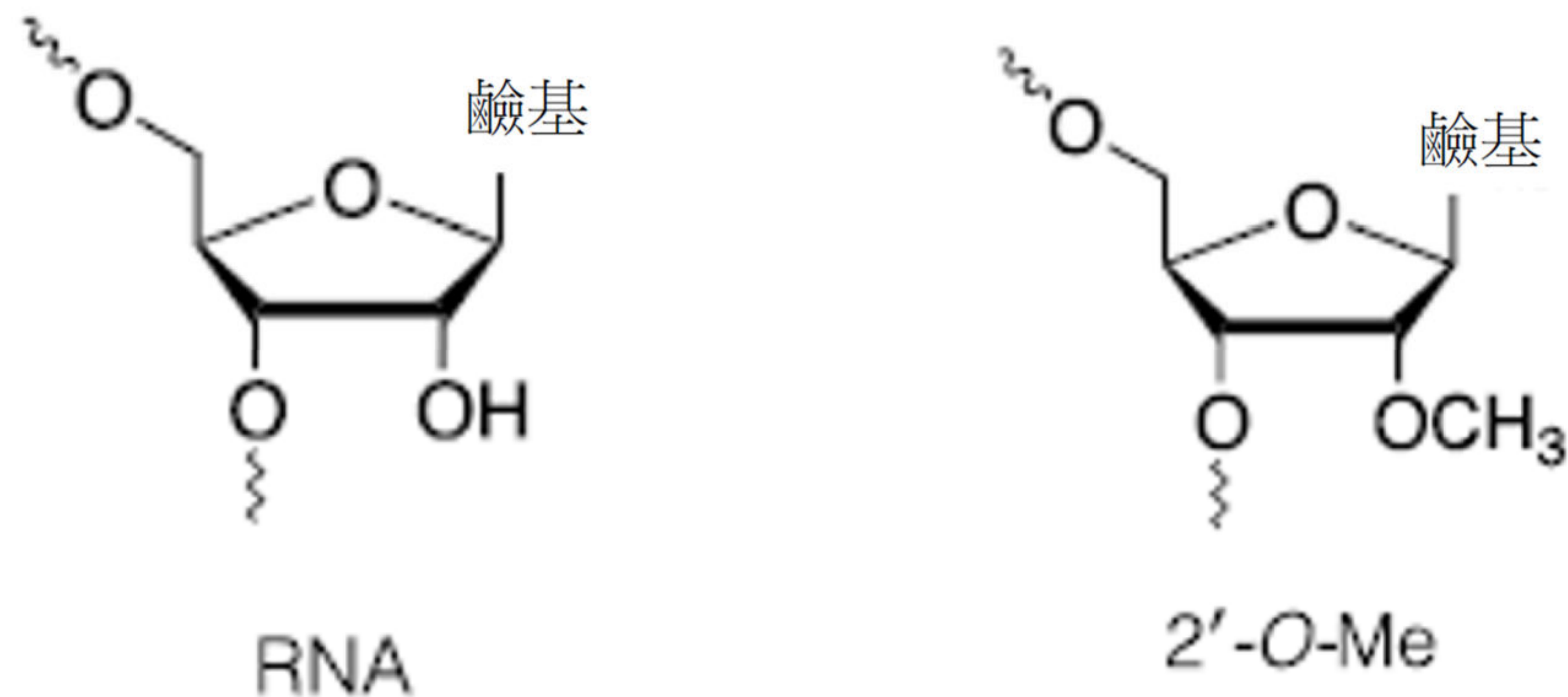
【0221】 在一些實施例中，sgRNA包含本文中所示之修飾模式中之一者，其中N為任何天然或非天然核苷酸，且其中全部N均包含如本文表1至3中所述之TRBC1、TRBC2及/或TRAC引導序列。在一些實施例中，經修飾之sgRNA包含以下序列：  
mN\*mN\*mN\*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAm  
GmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA  
mAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmG  
mUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU (SEQ ID NO: 300)，其中  
「N」可為任何天然或非天然核苷酸，且其中全部N均包含如表1及2中所述或如本文所述之TRBC1、TRBC2及/或TRAC引導序列。舉例而言，本文涵蓋SEQ ID NO: 300，其中N經本文表1及2中所揭示之引導序列(SEQ ID NO: 1-89、90-178、185及213-218)中之任一者置換。

【0222】 下文所述修飾中之任一者可存在於本文所述之gRNA及

mRNA中。

【0223】術語「mA」、「mC」、「mU」或「mG」可用於指示2'-O-Me修飾之核苷酸。

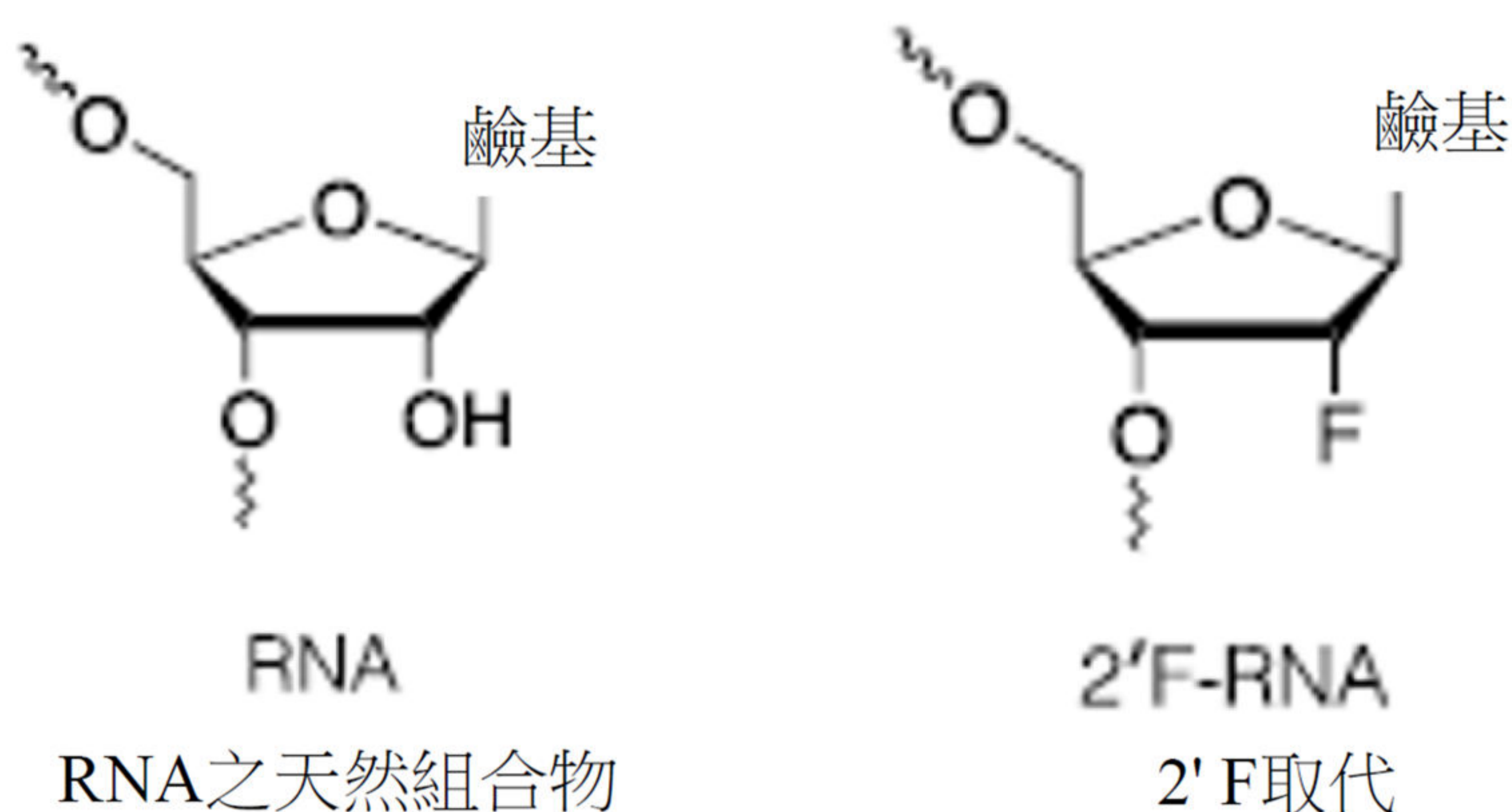
【0224】2'-O-甲基之修飾可如下描繪：



【0225】已顯示影響核苷酸糖環之另一化學修飾為鹵素取代。舉例而言，核苷酸糖環上之2'-氟基(2'-F)取代可增加寡核苷酸結合親和力及核酸酶穩定性。

【0226】在本申請案中，術語「fA」、「fC」、「fU」或「fG」可用於指示經2'-F取代之核苷酸。

【0227】2'-F之取代可如下描繪：

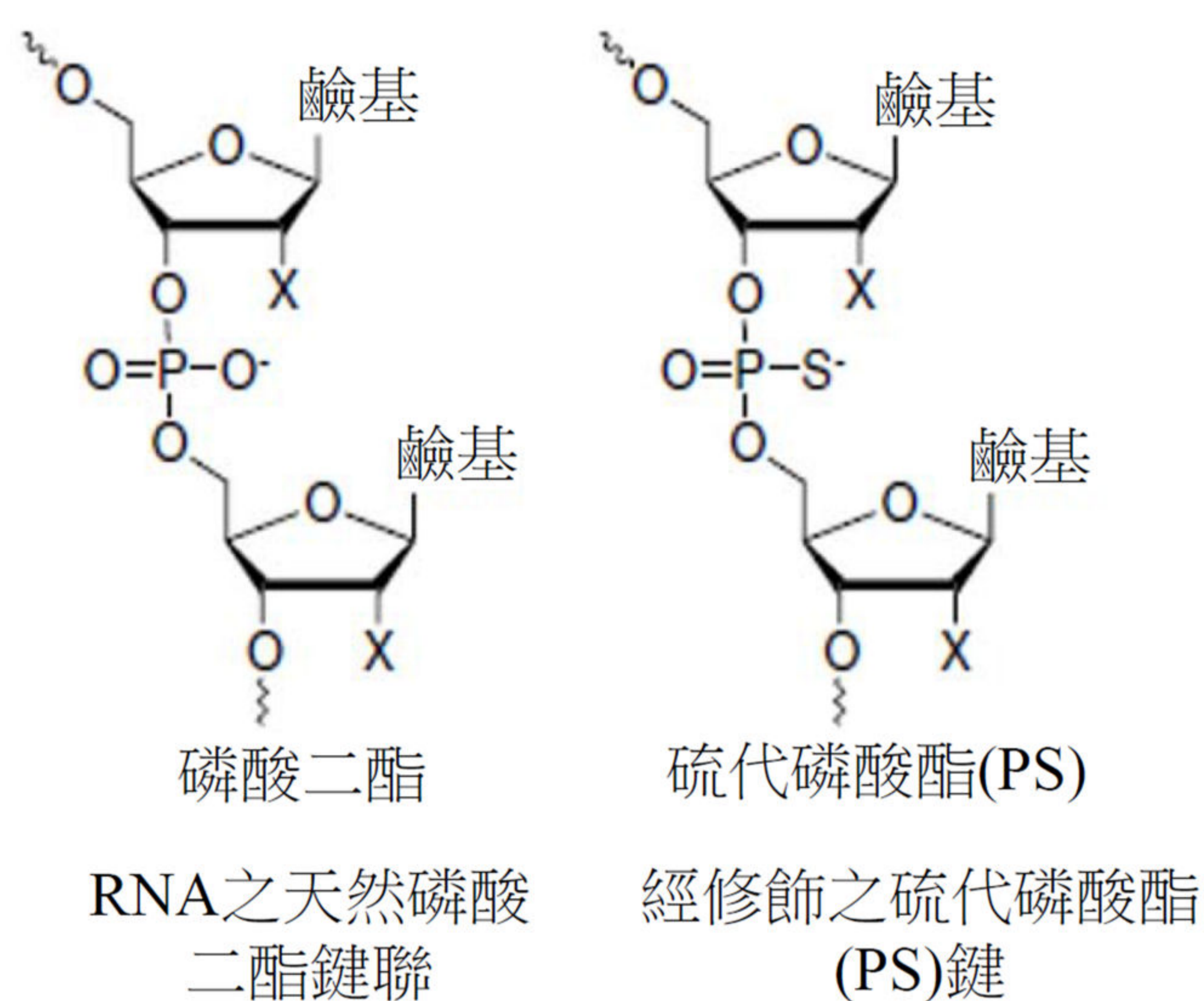


【0228】硫代磷酸酯(PS)鍵聯或鍵係指硫取代磷酸二酯鍵聯，例如核苷酸鹼基之間的鍵中之一個非橋聯磷酸酯氧的鍵。當硫代磷酸酯用於產生寡核苷酸時，經修飾之寡核苷酸亦可稱為S-寡核苷酸。

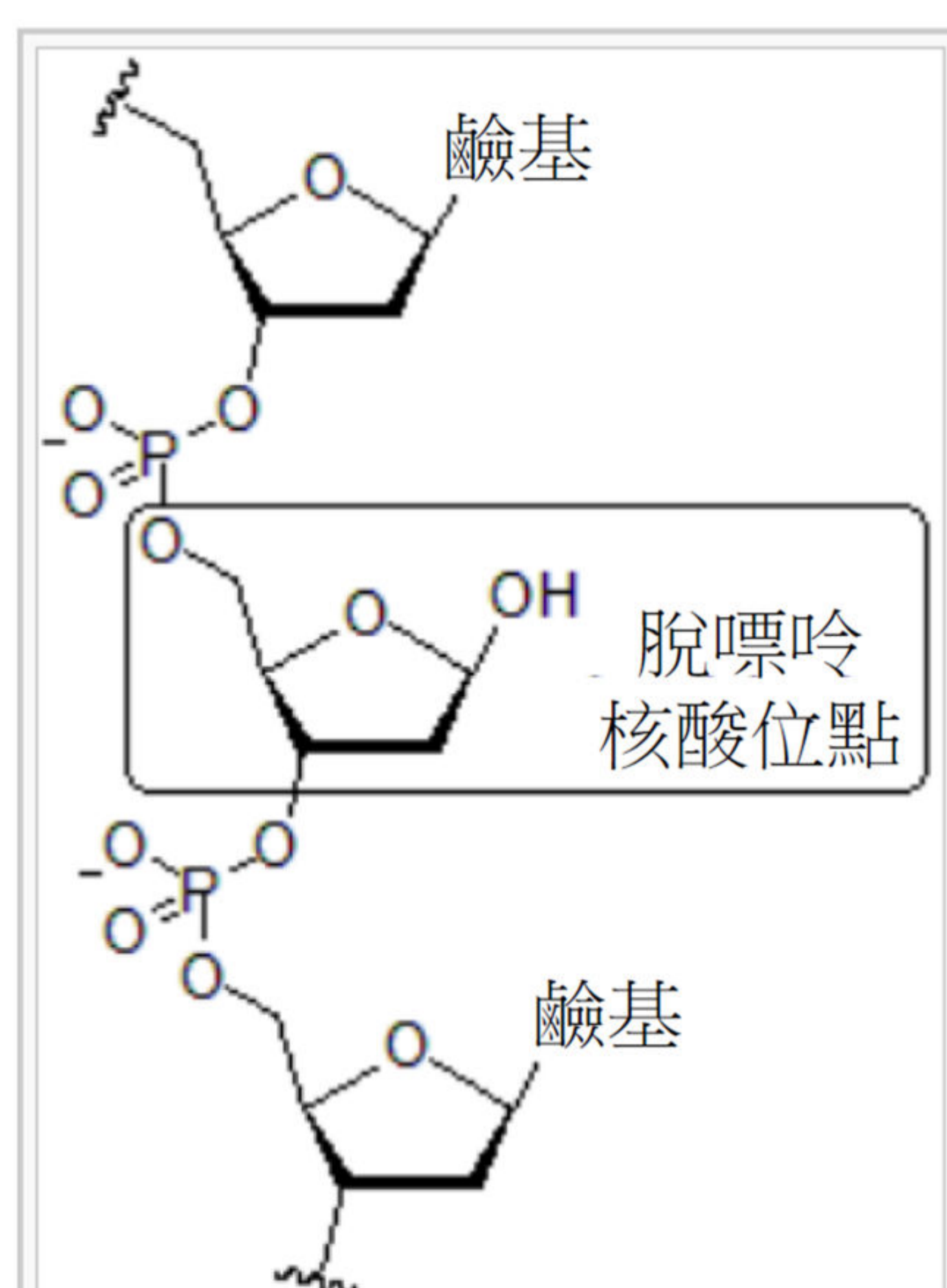
【0229】 「\*」可用於描述PS修飾。在本申請案中，術語A\*、C\*、U\*或G\*可用於指示經PS鍵連接至後續(例如3')核苷酸之核苷酸。

【0230】 在本申請案中，術語「mA\*」、「mC\*」、「mU\*」或「mG\*」可用於指示已經2'-O-Me取代且經PS鍵連接至下一個(例如3')核苷酸之核苷酸。

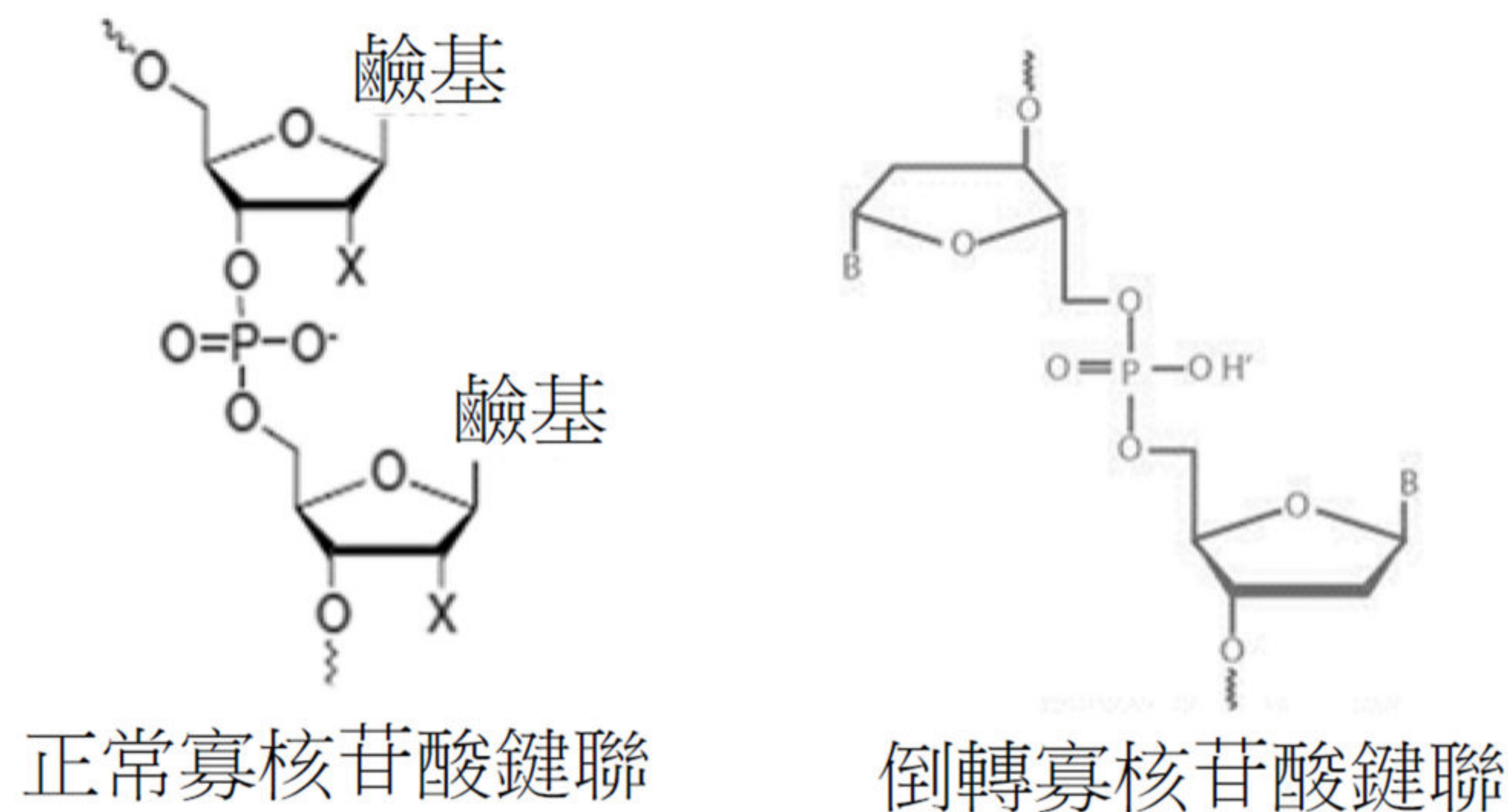
【0231】 下圖顯示將S-取代為非橋聯磷酸酯氧，產生PS鍵來替代磷酸二酯鍵：



【0232】 無鹼基核苷酸係指缺乏含氮鹼基之彼等核苷酸。下圖描述具有缺乏鹼基之無鹼基(亦稱為無嘌呤核酸)位點的寡核苷酸：



【0233】 倒轉鹼基係指具有自正常5'至3'鍵聯倒轉之鍵聯(亦即5'至5'鍵聯或3'至3'鍵聯)之彼等鹼基。舉例而言：



【0234】 無鹼基核苷酸可附接有倒轉鍵聯。舉例而言，無鹼基核苷酸可經由5'至5'鍵聯連接至末端5'核苷酸，或無鹼基核苷酸可經由3'至3'鍵聯連接至末端3'核苷酸。末端5'或3'核苷酸之倒轉無鹼基核苷酸亦可稱為倒轉無鹼基端帽。

【0235】 在一些實施例中，對5'末端之前三、四或五個核苷酸中之一或多者及3'末端之最後三、四或五個核苷酸中之一或多者進行修飾。在一些實施例中，修飾為2'-O-Me、2'-F、倒轉無鹼基核苷酸、PS鍵或此項技術中熟知之其他核苷酸修飾以增加穩定性及/或效能。

【0236】 在一些實施例中，5'末端處之前四個核苷酸，及3'末端處之最後四個核苷酸與硫代磷酸酯(PS)鍵連接。

【0237】 在一些實施例中，5'末端處之前三個核苷酸及3'末端處之最後三個核苷酸包含2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾之核苷酸。在一些實施例中，5'末端處之前三個核苷酸及3'末端處之最後三個核苷酸包含2'-氟(2'-F)修飾之核苷酸。在一些實施例中，5'末端之前三個核苷酸及3'末端之最後三個核苷酸包含倒轉無鹼基核苷酸。

【0238】 在一些實施例中，引導RNA包含經修飾之sgRNA。在一些實施例中，sgRNA包含以SEQ ID NO：401所示之修飾模式，其中N為任

何天然或非天然核苷酸，且其中全部N均包含將核酸酶引導至例如如表1及2中所示之TRBC1、TRBC2及/或TRAC中之目標序列中的引導序列。

**【0239】** 在一些實施例中，引導RNA包含SEQ ID NO：179-184中之任一者中所示之sgRNA。在一些實施例中，引導RNA包含有包含SEQ ID NO：1-178引導序列及SEQ ID NO：401核苷酸中任一者的sgRNA，其中SEQ ID NO：401核苷酸係於引導序列之3'端上，且其中sgRNA可如本文所示經修飾或為SEQ ID NO：300。

**【0240】** 如上文所指出，在一些實施例中，本文所揭示之組合物或調配物包含mRNA，其包含編碼經RNA引導之DNA結合劑，諸如如本文所述之Cas核酸酶之開放閱讀框架(ORF)。在一些實施例中，提供、使用或投與mRNA，其包含編碼經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas核酸酶之ORF。在一些實施例中，編碼經RNA引導之DNA核酸酶之ORF為「經修飾之經RNA引導之DNA結合劑ORF」或簡稱為「經修飾之ORF」，其以簡寫用於指示ORF經修飾。

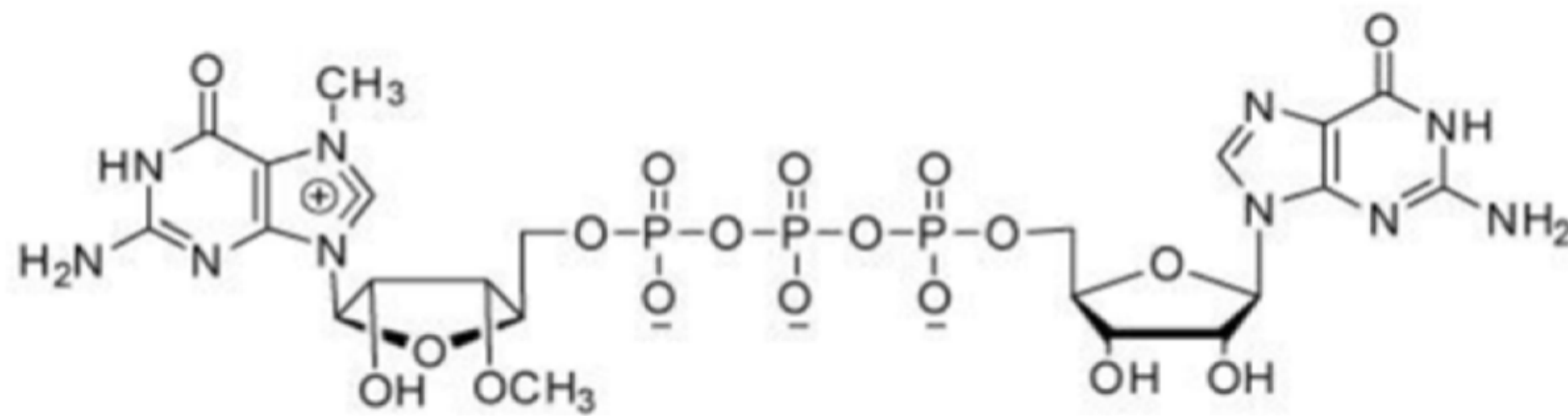
**【0241】** 在一些實施例中，經修飾之ORF可包含至少在一個、複數個或所有尿苷位置包含經修飾之尿苷。在一些實施例中，經修飾之尿苷為在5位，例如用鹵素、甲基或乙基修飾之尿苷。在一些具體實例中，經修飾之尿苷為在1位，例如用鹵素、甲基或乙基修飾之假尿苷。經修飾之尿苷可為例如假尿苷、N1-甲基假尿苷、5-甲氧基尿苷、5-碘尿苷或其組合。在一些實施例中，經修飾之尿苷為5-甲氧基尿苷。在一些實施例中，經修飾之尿苷為5-碘尿苷。在一些實施例中，經修飾之尿苷為假尿苷。在一些實施例中，經修飾之尿苷為N1-甲基-假尿苷。在一些實施例中，經修飾之尿苷為假尿苷及N1-甲基-假尿苷之組合。在一些實施例中，經修飾之

尿苷為假尿苷及5-甲氧基尿苷之組合。在一些實施例中，經修飾之尿苷為N1-甲基假尿苷及5-甲氧基尿苷之組合。在一些實施例中，經修飾之尿苷為5-碘尿苷及N1-甲基-假尿苷之組合。在一些具體實例中，經修飾之尿苷為假尿苷及5-碘尿苷之組合。在一些實施例中，經修飾之尿苷為5-碘尿苷及5-甲氧基尿苷之組合。

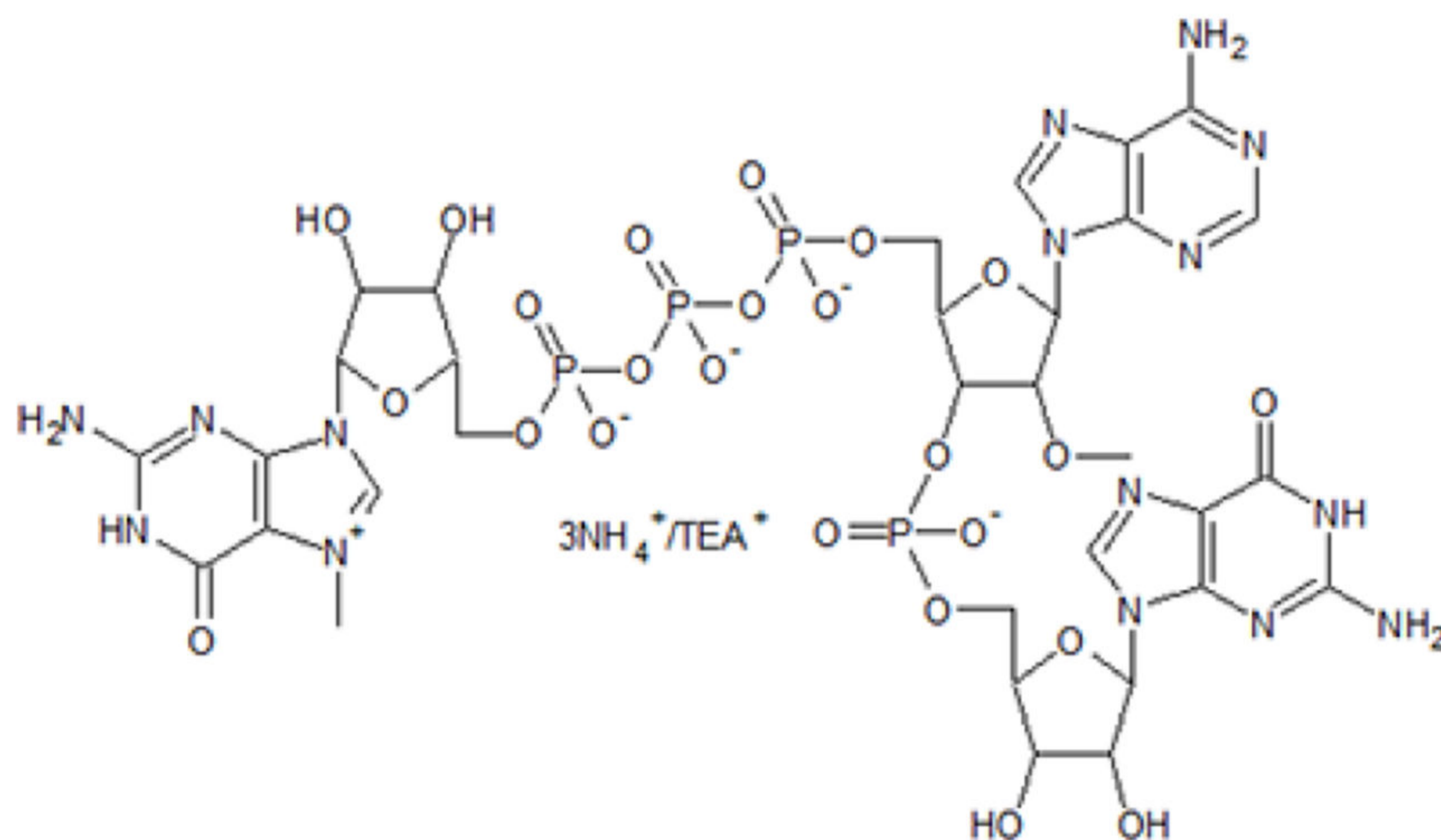
【0242】 在一些實施例中，本文所揭示之mRNA包含5'帽，諸如Cap0、Cap1或Cap2。5'帽通常為經由5'-三磷酸連接至mRNA之5'至3'鏈之第一核苷酸之5'位的7-甲基鳥嘌呤核糖核苷酸(其可進一步修飾，如下文例如相對於ARCA所論述)，亦即第一帽近端核苷酸。在Cap0中，mRNA之第一與第二帽近端核苷酸之核糖包含2'-羥基。在Cap1中，mRNA之第一及第二轉錄核苷酸之核糖分別包含2'-甲氧基及2'-羥基。在Cap2中，mRNA之第一與第二帽近端核苷酸之核糖包含2'-甲氧基。參見例如Katibah等人 (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33):12025-30；Abbas等人 (2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114(11):E2106-E2115。大多數內源性高等真核生物mRNA，包括哺乳動物mRNA (諸如人類mRNA)包含Cap1或Cap2。由於根據諸如IFIT-1及IFIT-5之先天性免疫系統之組分辨識為「非自體」，故Cap0及與Cap1及Cap2不同之其他帽結構在諸如人類之哺乳動物中可具免疫原性，此可致使包括第I型干擾素之細胞介素量升高。先天免疫系統之組分，諸如IFIT-1及IFIT-5亦可與eIF4E競爭以結合具有除Cap1或Cap2外之帽的mRNA，此可能會抑制mRNA之轉譯。

【0243】 帽可以共轉錄方式包括在內。舉例而言，ARCA (抗反向帽類似物；Thermo Fisher Scientific目錄號AM8045)為包含連接至鳥嘌呤核糖核苷酸之5'位的7-甲基鳥嘌呤3'-甲氧基-5'-三磷酸的帽類似物，其可

在一開始時活體外併入轉錄物中。ARCA產生Cap0帽，其中第一個帽近端核苷酸之2'位為羥基。參見例如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結構展示如下。



【0244】 CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG；TriLink Biotechnologies目錄號N-7113)或CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG；TriLink Biotechnologies目錄號N-7133) 可用於以共轉錄方式提供Cap1結構。CleanCap™ AG及CleanCap™ GG 之3'-O-甲基化形式亦可分別以目錄號N-7413及N-7433購自TriLink Biotechnologies。CleanCap™ AG結構顯示如下。



【0245】 或者，可以轉錄後方式將帽添加至RNA。舉例而言，牛痘病毒加帽酶可為市售的(New England Biolabs目錄號M2080S)，且具有由其D1次單位提供之RNA三磷酸酶及鳥苷醯基轉移酶活性及由其D12次單

位提供之鳥嘌呤甲基轉移酶。因此，在S-腺苷甲硫胺酸及GTP存在下，可將7-甲基鳥嘌呤添加至RNA，以產生Cap0。參見例如Guo, P.及Moss, B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4023-4027；Mao, X.及Shuman, S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 24472-24479。

【0246】 在一些實施例中，mRNA進一步包含聚腺苷酸化(poly-A)尾。在一些實施例中，poly-A尾包含至少20、30、40、50、60、70、80、90或100個腺嘌呤，視情況多至300個腺嘌呤。在一些實施例中，poly-A尾包含95、96、97、98、99或100個腺嘌呤核苷酸。

### C. 核糖核蛋白複合物

【0247】 在一些實施例中，涵蓋一種組合物，其包含一或多種gRNA，包含表1及2之一或多種引導序列或表3之一或多種sgRNA，及經RNA引導之DNA結合劑，例如核酸酶，諸如Cas核酸酶，諸如Cas9。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑，例如Cas9，具有裂解酶活性，其亦可稱為雙股核酸內切酶活性。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑包含Cas9核酸酶。Cas9核酸酶之實例包括釀膿鏈球菌(*S. pyogenes*)、金黃色葡萄球菌(*S. aureus*)及其他原核生物(參見例如下一段落中之清單)之第II型CRISPR系統者及其經修飾(例如經工程改造或突變型)形式。參見例如US2016/0312198 A1；US 2016/0312199 A1。Cas核酸酶之其他實例包括第III型CRISPR系統之Csm或Cmr複合物或其Cas10、Csm1或Cmr2次單元；及第I型CRISPR系統之級聯複合物，或其Cas3次單元。在一些實施例中，Cas核酸酶可來自第IIA型、第IIB型或第IIC型系統。對於不同CRISPR系統及Cas核酸酶之論述，參見例如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)。

【0248】可衍生Cas核酸酶之非限制性例示性物種包括釀膿鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*)、嗜熱鏈球菌(*Streptococcus thermophilus*)、鏈球菌屬、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、無害李氏菌(*Listeria innocua*)、加氏乳桿菌(*Lactobacillus gasseri*)、新兇手弗朗西斯氏菌(*Francisella novicida*)、產琥珀酸沃廉菌(*Wolinella succinogenes*)、華德薩特菌(*Sutterella wadsworthensis*)、伽馬變形菌(*Gammaproteobacterium*)、奈瑟氏腦膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、空腸彎曲桿菌(*Campylobacter jejuni*)、多殺巴斯德菌(*Pasteurella multocida*)、產琥珀酸纖維桿菌(*Fibrobacter succinogene*)、深紅紅螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)、達松維爾擬諾卡氏菌(*Nocardiopsis dassonvillei*)、始旋鏈黴菌(*Streptomyces pristinaespiralis*)、產綠色鏈黴菌(*Streptomyces viridochromogenes*)、產綠色鏈黴菌、粉紅鏈孢囊菌(*Streptosporangium roseum*)、粉紅鏈孢囊菌、嗜酸熱脂環桿菌(*Alicyclobacillus acidocaldarius*)、假蕈狀芽孢桿菌(*Bacillus pseudomycooides*)、砷還原芽孢桿菌(*Bacillus selenitireducens*)、西伯利亞微小桿菌(*Exiguobacterium sibiricum*)、戴白氏乳桿菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、唾液乳桿菌(*Lactobacillus salivarius*)、布氏乳桿菌(*Lactobacillus buchneri*)、齒垢密螺旋體(*Treponema denticola*)、海洋微顫菌(*Microscilla marina*)、伯克霍爾德氏細菌(*Burkholderiales bacterium*)、食萘單胞菌(*Polaromonas naphthalenivorans*)、單胞菌屬(*Polaromonas sp.*)、瓦氏鱷球藻(*Crocospaera watsonii*)、鱷球藻屬、銅

綠微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、聚球藻屬(*Synechococcus sp.*)、阿拉伯糖醋桿菌(*Acetohalobium arabaticum*)、根制氨菌(*Ammonifex degensii*)、熱解纖維素菌(*Caldicelulosiruptor becscii*)、金礦菌(*Candidatus Desulforudis*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、艱難梭菌(*Clostridium difficile*)、大芬戈爾德菌(*Finegoldia magna*)、嗜熱鹽鹼厭氧菌(*Natranaerobius thermophilus*)、熱丙酸消化腸狀菌(*Pelotomaculum thermopropionicum*)、嗜酸性喜溫硫桿菌(*Acidithiobacillus caldus*)、嗜酸氧化亞鐵硫桿菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、酒色異著色菌(*Allochromatium vinosum*)、海桿菌屬、嗜鹽亞硝化球菌(*Nitrosococcus halophilus*)、瓦氏亞硝化球菌(*Nitrosococcus watsoni*)、遊海假交替單胞菌(*Pseudoalteromonas haloplanktis*)、消旋纖維線桿菌(*Ktedonobacter racemifer*)、甲烷鹽菌(*Methanohalobium evestigatum*)、變異念珠藻(*Anabaena variabilis*)、泡沫節球藻(*Nodularia spumigena*)、念珠藻屬(*Nostoc sp.*)、極大節旋藻(*Arthrospira maxima*)、鈍頂節旋藻(*Arthrospira platensis*)、節旋藻屬、螺旋藻屬(*Lyngbya sp.*)、原型微鞘藻(*Microcoleus chthonoplastes*)、顫藻屬(*Oscillatoria sp.*)、運動石袍菌(*Petrotoga mobilis*)、非洲高熱桿菌(*Thermosiphon africanus*)、巴氏鏈球菌(*Streptococcus pasteurianus*)、灰色奈瑟球菌(*Neisseria cinerea*)、紅嘴鷗彎曲桿菌(*Campylobacter lari*)、食清潔劑細小棒菌(*Parvibaculum lavamentivorans*)、白喉棒狀桿菌(*Corynebacterium diphtheria*)、胺基酸球菌屬(*Acidaminococcus sp.*)、毛螺科菌(*Lachnospiraceae bacterium*)ND2006及海洋無核氯菌(*Acaryochloris marina*)。

【0249】 在一些實施例中，Cas核酸酶為來自釀膿鏈球菌之Cas9核酸酶。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自嗜熱鏈球菌之Cas9核酸酶。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自奈瑟氏腦膜炎菌之Cas9核酸酶。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自金黃色葡萄球菌之Cas9核酸酶。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自新兇手弗朗西斯氏菌之Cpf1核酸酶。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自胺基酸球菌屬之Cpf1核酸酶。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自毛螺科菌ND2006之Cpf1核酸酶。在其他實施例中，Cas核酸酶為來自以下之Cpf1核酸酶：土拉熱弗朗西絲菌(*Francisella tularensis*)、毛螺科菌、瘤胃溶纖維丁酸弧菌(*Butyrivibrio proteoclasticus*)、佩氏細菌(*Peregrinibacteria bacterium*)、帕庫氏菌(*Parcubacteria bacterium*)、史密斯氏菌(*Smithella*)、胺基酸球菌屬、白蟻甲烷支原體菌候選種(*Candidatus Methanoplasma termitum*)、挑剔真桿菌(*Eubacterium eligens*)、牛眼莫拉菌(*Moraxella bovoculi*)、稻田鉤端螺旋體(*Leptospira inadai*)、狗口腔卟啉單胞菌(*Porphyromonas crevioricanis*)、解糖腺普雷沃菌(*Prevotella disiens*)或獼猴卟啉單胞菌(*Porphyromonas macacae*)。在某些實施例中，Cas核酸酶為來自胺基酸球菌屬或毛螺菌科之Cpf1核酸酶。

【0250】 在一些實施例中，gRNA連同經RNA引導之DNA結合劑一起稱為核糖核蛋白複合物(RNP)。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑為Cas核酸酶。在一些實施例中，gRNA連同Cas核酸酶一起稱為Cas RNP。在一些實施例中，RNP包含第I型、第II型或第III型組分。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自第II型CRISPR/Cas系統之Cas9蛋白質。在一些具體實例中，gRNA連同Cas9一起稱為Cas9 RNP。

【0251】 野生型Cas9具有兩個核酸酶域：RuvC及HNH。RuvC域裂解非目標DNA股，且HNH域裂解目標DNA股。在一些實施例中，Cas9蛋白質包含多於一個RuvC域及/或多於一個HNH域。在一些實施例中，Cas9蛋白質為野生型Cas9。在組合物、用途及方法實施例中之各者中，Cas誘導目標DNA中之雙股斷裂。

【0252】 在一些實施例中，使用嵌合Cas核酸酶，其中該蛋白質之一個域或區經不同蛋白質之一部分置換。在一些實施例中，Cas核酸酶域可經來自諸如Fok1之不同核酸酶的域置換。在一些實施例中，Cas核酸酶可為經修飾之核酸酶。

【0253】 在其他實施例中，Cas核酸酶可來自第I型CRISPR/Cas系統。在一些實施例中，Cas核酸酶可為第I型CRISPR/Cas系統之級聯複合物之組分。在一些實施例中，Cas核酸酶可為Cas3蛋白質。在一些實施例中，Cas核酸酶來自第III型CRISPR/Cas系統。在一些實施例中，Cas核酸酶可具有RNA裂解活性。

【0254】 在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑具有單股切口酶活性，亦即可切割一個DNA股以產生單股斷裂，亦稱為「切口」。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑包含Cas切口酶。切口酶為在dsDNA中產生切口，亦即切割一個股但不切割DNA雙螺旋之另一股的酶。在一些實施例中，Cas切口酶為其中例如藉由催化域之一或多種改變(例如點突變)，使核酸內切酶活性位點不活化的Cas核酸酶之形式(例如上文所論述之Cas核酸酶)。參見例如關於Cas切口酶及例示性催化域改變之論述之美國專利第8,889,356號。在一些實施例中，Cas切口酶，諸如Cas9切口酶具有不活化之RuvC或HNH域。

【0255】 在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑經修飾而僅含有一個功能核酸酶域。舉例而言，藥劑蛋白質可經修飾以使得核酸酶域中之一者經突變或完全或部分缺失以降低其核酸裂解活性。在一些實施例中，使用具有活性降低之RuvC域之切口酶。在一些實施例中，使用具有非活性RuvC域之切口酶。在一些實施例中，使用具有活性降低之HNH域之切口酶。在一些實施例中，使用具有非活性HNH域之切口酶。

【0256】 在一些實施例中，Cas蛋白質核酸酶域中之保守胺基酸經取代以降低或改變核酸酶活性。在一些實施例中，Cas核酸酶可在RuvC或類RuvC核酸酶域中包含胺基酸取代。RuvC或類RuvC核酸酶域中之例示性胺基酸取代包括D10A (基於釀膿鏈球菌Cas9蛋白質)。參見例如Zetsche等人 (2015) *Cell* Oct 22:163(3): 759-771。在一些實施例中，Cas核酸酶可包含HNH或類HNH核酸酶域中之胺基酸取代。HNH或類HNH核酸酶域中之例示性胺基酸取代包括E762A、H840A、N863A、H983A及D986A (基於釀膿鏈球菌Cas9蛋白質)。參見例如Zetsche等人 (2015)。其他例示性胺基酸取代包括D917A、E1006A及D1255A (基於新兇手弗朗西斯氏菌U112 Cpf1 (FnCpf1)序列(UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1\_FRATN)))。

【0257】 在一些實施例中，編碼切口酶之mRNA將與一對分別與目標序列之有義股及反義股互補之引導RNA組合提供。在此實施例中，引導RNA將切口酶引導至目標序列且藉由在目標序列之相對股上產生切口引入DSB (亦即雙切口)。在一些實施例中，使用雙切口可提高特異性及減少脫靶效應。在一些實施例中，連同目標DNA之相對股之兩個個別引導RNA使用切口酶以在目標DNA中產生雙切口。在一些實施例中，連同經選擇以非常接近之兩個個別引導RNA使用切口酶以在目標DNA中產生雙

切口。

【0258】 在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑缺乏裂解酶及切口酶活性。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑包含dCas DNA結合多肽。dCas多肽具有DNA結合活性，而基本上缺乏催化(裂解酶/切口酶)活性。在一些實施例中，dCas多肽為dCas9多肽。在一些實施例中，缺乏裂解酶及切口酶活性之經RNA引導之DNA結合劑或dCas DNA結合多肽為其中例如藉由催化域之一或多種改變(例如點突變)，使核酸內切酶活性位點不活化的Cas核酸酶之形式(例如上文所論述之Cas核酸酶)。參見例如US 2014/0186958 A1；US 2015/0166980 A1。

【0259】 在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑包含一或多個異源功能域(例如為或包含融合多肽)。

【0260】 在一些實施例中，異源功能域可促進將經RNA引導之DNA結合劑輸送至細胞核中。舉例而言，異源功能域可為核定位信號(NLS)。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可與1至10個NLS融合。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可與1至5個NLS融合。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可與一個NLS融合。在使用一個NLS之情況下，NLS可連接於經RNA引導之DNA結合劑序列之N端或C端處。其亦可插入經RNA引導之DNA結合劑序列內。在其他實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可與多於一個NLS融合。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可與2、3、4或5個NLS融合。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可與兩個NLS融合。在某些情況下，兩個NLS可相同(例如兩個SV40 NLS)或不同。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑與連接在羧基末端處之兩個SV40 NLS序列融合。在一些實施例中，經

RNA引導之DNA結合劑可與兩個NLS融合，一個NLS連接在N端處且一個連接在C端處。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可與3個NLS融合。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可不與NLS融合。在一些實施例中，NLS可為單聯(monopartite)序列，諸如SV40 NLS、PKKKRKV (SEQ ID NO：600)或PKKKRRV (SEQ ID NO：601)。在一些實施例中，NLS可為雙聯序列，諸如核質蛋白之NLS、KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO：602)。在一特定實施例中，單一PKKKRKV (SEQ ID NO：600) NLS可連接在經RNA引導之DNA結合劑之C端處。一或多個連接子視情況包括在融合位點處。

【0261】 在一些實施例中，異源功能域可能夠修改經RNA引導之DNA結合劑的細胞內半衰期。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑之半衰期可得以提高。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑之半衰期可得以降低。在一些實施例中，異源功能域可能夠增加經RNA引導之DNA結合劑的穩定性。在一些實施例中，異源功能域可能夠降低經RNA引導之DNA結合劑的穩定性。在一些實施例中，異源功能域可充當蛋白質降解之信號肽。在一些實施例中，蛋白質降解可由蛋白水解酶，諸如蛋白酶體、溶酶體蛋白酶或鈣蛋白酶蛋白酶介導。在一些實施例中，異源功能域可包含PEST序列。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑可藉由添加泛素或多泛素鏈來修飾。在一些實施例中，泛素可為類泛素蛋白質(UBL)。類泛素蛋白質之非限制性實例包括小類泛素修飾因子(SUMO)、泛素交叉反應蛋白(UCRP，亦稱為干擾素刺激基因-15 (ISG15))、泛素相關修飾因子-1 (URM1)、神經元-前驅體-細胞表現之發育下調蛋白-8 (NEDD8，在釀酒酵母(*S. cerevisiae*)中亦稱為Rub1)、人類

白血球抗原F相關(FAT10)、自噬-8 (ATG8)及自噬-12 (ATG12)、Fau類泛素蛋白(FUB1)、膜錨定UBL (MUB)、泛素摺疊修飾因子-1 (UFM1)及類泛素蛋白-5 (UBL5)。

【0262】 在一些實施例中，異源功能域可為標記域。標記域之非限制性實例包括螢光蛋白質、純化標籤、抗原決定基標籤及報導基因序列。在一些實施例中，標記域可為螢光蛋白。適合之螢光蛋白之非限制實例包括綠色螢光蛋白(例如GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、sfGFP、EGFP、翡翠色(Emerald)、Azami綠(Azami Green)、單Azami綠(Monomeric Azami Green)、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1)、黃色螢光蛋白(例如YFP、EYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1)、藍色螢光蛋白(例如EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal、GFPuv、藍寶石色(Sapphire)、T-藍寶石色(T-sapphire))、強化型藍螢光蛋白(例如ECFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、Midoriishi強化型藍(Midoriishi-Cyan))、紅色螢光蛋白(例如mKate、mKate2、mPlum、DsRed單色、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed單色、HcRed串色、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、Jred)及橙色螢光蛋白(mOrange、mKO、Kusabira橙色(Kusabira-Orange)、單Kusabira橙色(Monomeric Kusabira-Orange)、mTangerine、tdTomato)或任何其他適合之螢光蛋白。在其他實施例中，標記域可為純化標籤及/或抗原決定基標籤。非限制性之例示性標籤包括麩胱甘肽-S-轉移酶(glutathione-S-transferase, GST)、殼質結合蛋白(CBP)、麥芽糖結合蛋白(MBP)、硫氧還蛋白(thioredoxin, TRX)、聚(NANP)、串聯親和純化(tandem affinity purification, TAP)標籤、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、6×His、8×His、生物素羧基載體蛋白(BCCP)、聚His及調鈣蛋白。非限制性之例示性報導基因包括麩胱甘肽-S-轉移酶(GST)、辣根過氧化酶(HRP)、氯黴素乙醯基轉移酶(CAT)、β-半乳糖苷酶、β-葡糖苷酸酶、螢光素酶或螢光蛋白。

【0263】 在其他實施例中，異源功能域可將經RNA引導之DNA結合劑靶向至特定細胞器、細胞型、組織或器官。在一些實施例中，異源功能域可將經RNA引導之DNA結合劑靶向至粒線體。

【0264】 在其他實施例中，異源功能域可為效應子域。當經RNA引導之DNA結合劑導引至其目標序列時，例如當Cas核酸酶藉由gRNA導引至目標序列時，效應子域可修飾或影響目標序列。在一些實施例中，效應子域可選自核酸結合域、核酸酶域(例如非Cas核酸酶域)、表觀遺傳修飾域、轉錄活化域或轉錄抑制子域。在一些實施例中，異源功能域為核酸酶，諸如FokI核酸酶。參見例如美國專利第9,023,649號。在一些實施例中，異源功能域為轉錄活化因子或抑制子。參見例如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，經RNA引導之DNA結合劑基本上變成可使用引導RNA引導以結合所需目標序列之轉錄因子。

#### **D. gRNA功效之測定**

**【0265】** 在一些實施例中，當與RNP之其他組分一起遞送或表現時，測定gRNA之功效。在一些實施例中，gRNA與經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白質，例如Cas9一起表現。在一些實施例中，gRNA於已穩定表現經RNA引導之DNA核酸酶，諸如Cas核酸酶或切口酶，例如Cas9核酸酶或切口酶之細胞株中遞送或表現。在一些實施例中，gRNA作為RNP之一部分遞送至細胞。在一些實施例中，將gRNA以及mRNA遞送至細胞，該mRNA編碼經RNA引導之DNA核酸酶，諸如Cas核酸酶或切口酶，例如Cas9核酸酶或切口酶。

**【0266】** 如本文所述，使用本文所揭示之經RNA引導之DNA核酸酶及引導RNA可導致DNA中之雙股斷裂，該等雙股斷裂可在藉由細胞機械設備修復時產生呈插入或缺失(插入或缺失)突變形式之誤差。歸因於插入或缺失之多種突變會改變閱讀框架或過早地引入終止密碼子，且因此產生非功能性蛋白質。

**【0267】** 在一些實施例中，特定gRNA之功效係基於活體外模型而判定。在一些實施例中，活體外模型為穩定地表現Cas9之HEK293細胞(HEK293\_Cas9)。在一些實施例中，活體外模型為周邊血液單核細胞(PBMC)。在一些實施例中，活體外模型為T細胞，諸如初級人類T細胞。相對於使用初級細胞，可使用市售初級細胞以在實驗之間提供較大一致性。在一些實施例中，活體外模型中(例如在T細胞中)發生缺失或插入之脫靶位點數目例如藉由分析來自經Cas9 mRNA及引導RNA活體外轉染之

細胞之基因組DNA來測定。在一些實施例中，此類測定包含分析來自經Cas9 mRNA、引導RNA及供體寡核苷酸活體外轉染之細胞之基因組DNA。使用HEK293細胞、PBMC及人類CD3<sup>+</sup> T細胞之實施例中提供用於此類測定之例示性程序。

**【0268】** 在一些實施例中，在用於gRNA選擇程序之多個活體外細胞模型上測定特定gRNA之功效。在一些實施例中，在所選gRNA之資料下進行細胞株比較。在一些實施例中，在多個細胞模型中進行交叉篩選。

**【0269】** 在一些實施例中，藉由TRBC1、TRBC2及/或TRAC之插入或缺失百分比量測引導RNA之功效。在一些實施例中，藉由TRBC及/或TRAC之插入或缺失百分比量測引導RNA之功效。在一些實施例中，藉由TRBC或TRAC之插入或缺失百分比量測引導RNA之功效。在一些實施例中，將TRBC1、TRBC2及/或TRAC之編輯百分比與實現TRBC1、TRBC2及/或TRAC蛋白質產物之阻斷基因表現所需之插入或缺失百分比相比。

**【0270】** 在一些實施例中，藉由T細胞受體(TCR)組分之表現降低或去除量測引導RNA之功效。在實施例中，T細胞受體(TCR)組分之表現降低或去除包括TRAC、TRBC1、TRBC2、CD3E、CD3G及/或CD3D之表現降低或去除。在實施例中，該TCR組分之表現降低或去除為一或多個，例如一或兩個，例如一個本文所述之gRNA分子之引入至該TCR組分達至該細胞中之結果。在實施例中，TCR組分之表現降低或去除如藉由流式細胞測量術，例如如本文所述來量測。

**【0271】** 在一些實施例中，藉由目標細胞類型(諸如T細胞)之基因組內之脫靶序列之插入或缺失之數目及/或頻率來量測引導RNA之功效。在

一些實施例中，提供有效引導RNA，其在細胞群體中及/或相對於靶點之插入或缺失產生頻率在脫靶位點以極低頻率(例如<5%)產生插入或缺失。因此，本發明提供引導RNA，其並不展現目標細胞類型(例如T細胞)中之脫靶插入或缺失形成，或其在細胞群體中及/或相對於靶點之插入或缺失產生頻率產生<5%之脫靶插入或缺失形成頻率。在一些實施例中，本發明提供並不展現目標細胞類型(例如T細胞)中之任何脫靶插入或缺失形成之引導RNA。在一些實施例中，例如如藉由一或多種本文所述方法所評估，提供在少於5個脫靶位點產生插入或缺失之引導RNA。在一些實施例中，例如如藉由一或多種本文所述方法所評估，提供在少於或等於4、3、2或1個脫靶位點產生插入或缺失之引導RNA。在一些實施例中，脫靶位點不出現於目標細胞(例如肝細胞)基因組中之蛋白質編碼區中。

**【0272】** 在一些實施例中，偵測基因編輯事件，諸如目標DNA中之插入或缺失(「插入或缺失(indel)」)突變之形成及同源定向修復(HDR)事件會利用伴隨經標記之引子且分離經標記之擴增產物的線性擴增(後文稱為「LAM-PCR」或「線性擴增(LA)」法)。

**【0273】** 在一些實施例中，藉由包含基因之所表現蛋白產物的功能蛋白複合物之含量來量測引導RNA之功效。在一些實施例中，藉由TCR表現之流動式細胞量測分析來量測引導RNA之功效，經編輯活細胞群體藉由該分析來分析TCR之缺失。

### **III. 包括治療方法及製備經工程改造之細胞或免疫療法試劑之方法的方法**

**【0274】** 本文所揭示之gRNA及相關方法及組成物適用於免疫療法及適用於製造免疫療法試劑，諸如經工程改造之細胞。

**【0275】** 在一些實施例中，包含表1或2之引導序列的gRNA與經

RNA引導之DNA核酸酶一起誘導DSB，且修復期間之非同源末端連接(NHEJ)會引起TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中發生突變。在一些實施例中，NHEJ致使核苷酸缺失或插入，其誘導TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中發生框移或無意義突變。

**【0276】** 在一些實施例中，個體為哺乳動物。在一些實施例中，個體為人類。在一些實施例中，個體為母牛、豬、猴、綿羊、狗、貓、魚或家禽。

**【0277】** 在一些實施例中，使用包含表1或2之引導序列中之任何一或多者或表3之一或多種sgRNA的引導RNA(例如在本文所提供之組合物中)製備用於治療需要免疫療法之人類個體之藥劑。

**【0278】** 在一些實施例中，引導RNA、組合物及調配物用於離體產生具有突變之TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因的T細胞。經修飾T細胞可為自然殺手(NK) T細胞。經修飾T細胞可表現T細胞受體，諸如普遍TCR或經修飾TCR。T細胞可表現CAR或具有 $\zeta$ 鏈信號傳導基元之CAR構築體。

**【0279】** 在一些實施例中，單次投與包含本文提供之引導RNA的組合物足以減少TRBC1、TRBC2或TRAC表現。在其他實施例中，投與包含本文提供之引導RNA的組合物超過一次可有益於增加治療功效。

### **遞送gRNA組合物**

**【0280】** 脂質奈米粒子(LNP)為適用於遞送核苷酸及蛋白質貨物之手段，且可用於遞送本文所揭示之引導RNA、組合物或醫藥調配物。在一些實施例中，LNP遞送核酸、蛋白質、或核酸連同蛋白質一起。

**【0281】** 引導RNA或其他核酸(例如編碼多肽之核酸)可與脂質奈米

粒子(LNP)締合。適合之LNP在此項技術中已知。參見例如PCT/US2018/053559、WO/2017/173054、WO2015/095340及WO2014/136086以及其中所提供之參考文獻之脂質。

**【0282】** 在一些實施例中，本發明包含一種向個體遞送本文所揭示之gRNA中任一者之方法，其中該gRNA經由LNP遞送。在一些實施例中，gRNA/LNP亦與Cas9或編碼Cas9之mRNA締合。

**【0283】** 在一些實施例中，本發明包含一種包含所揭示gRNA中之任一者及LNP之組合物。在一些實施例中，組合物進一步包含Cas9或編碼Cas9之mRNA。

**【0284】** 在一些實施例中，LNP包含可電離脂質。在一些實施例中，LNP包含十八-9,12-二烯酸(9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-(((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯(亦稱為(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯酸3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-(((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯)或另一可電離脂質。參見例如PCT/US2018/053559(2018年9月28日申請)、WO/2017/173054、WO2015/095340及WO2014/136086以及其中所提供之參考文獻之脂質。在一些實施例中，在LNP脂質之情形下，術語陽離子型及可電離可互換，例如其中可電離脂質視pH而定為陽離子型的。

**【0285】** 在一些實施例中，與本文所揭示之gRNA締合之LNP用於製備供治療疾病或病症用之藥劑。

**【0286】** 電穿孔為適用於遞送貨物之另一手段，且任何電穿孔方法均可用於遞送本文所揭示之gRNA中之任一者。在一些實施例中，電穿孔可用於遞送本文所揭示之gRNA中之任一者及Cas9或編碼Cas9之mRNA。

【0287】 在一些實施例中，本發明包含一種向細胞離體遞送本文所揭示之gRNA中任一者之方法，其中該gRNA與LNP締合或不與LNP締合。在一些實施例中，gRNA/LNP或gRNA亦與Cas9或編碼Cas9之mRNA締合。

【0288】 在一些實施例中，單獨或在一或多個載體上經編碼之本文所述之引導RNA組合物係在脂質奈米粒子中調配或經由脂質奈米粒子投予；參見例如WO/2017/173054，其內容以全文引用之方式併入本文中。

【0289】 在某些實施例中，本發明包含DNA或RNA載體，其編碼包含本文所述之引導序列中之任何一或多者的引導RNA中之任一者。在一些實施例中，除引導RNA序列以外，載體進一步包含不編碼引導RNA之核酸。不編碼引導RNA之核酸包括(但不限於)啟動子、增強子、調節序列及編碼經RNA引導之DNA核酸酶(其可為核酸酶，諸如Cas9)之核酸。在一些實施例中，載體包含一或多個編碼crRNA、trRNA或crRNA及trRNA之核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含一或多個編碼sgRNA及mRNA之核苷酸序列，該mRNA編碼經RNA引導之DNA核酸酶，其可為Cas核酸酶，諸如Cas9或Cpf1。在一些實施例中，載體包含一或多個編碼crRNA、trRNA及mRNA之核苷酸序列，該mRNA編碼經RNA引導之DNA核酸酶，其可為Cas蛋白質，諸如Cas9。在一個實施例中，Cas9係來自釀膿鏈球菌(亦即Spy Cas9)。在一些實施例中，編碼crRNA、trRNA或crRNA及trRNA (其可為sgRNA)之核苷酸序列包含或由以下組成：側接來自天然產生之CRISPR/Cas系統的重複序列之全部或一部分的引導序列。包含或由crRNA、trRNA或crRNA及trRNA組成之核酸可進一步構成載體序列，其中該載體序列包含或由以下組成：不會與crRNA、trRNA或

crRNA及trRNA一起經天然發現的核酸。

【0290】 在一些實施例中，組分可以裸核酸形式、以與諸如脂質體或泊洛沙姆之藥劑複合之核酸的形式引入，或其可以核酸(例如gRNA)及呈核糖核蛋白複合物(RNP)之蛋白質形式引入。在一些實施例中，組分可藉由諸如病毒載體(例如腺病毒、AAV、疱疹病毒、反轉錄病毒、慢病毒)之載體遞送。用於非病毒遞送核酸之方法及組合物包括電穿孔、脂質體轉染、顯微注射、基因槍、病毒顆粒、脂質體、免疫脂質體、LNP、聚陽離子或脂質：核酸結合物、裸核酸(例如裸DNA/RNA)、人工病毒粒子及經藥劑增強之DNA攝取。使用例如Sonitron 2000系統(Rich-Mar)進行之聲致穿孔亦可用於遞送核酸。

【0291】 多肽可藉由將諸如編碼所關注多肽之核酸模板的核酸遞送至細胞引入至細胞中。核酸模板可編碼視情況作為表現卡匣之一部分的所關注多肽，其中該模板另外包含側接序列。此類側接序列視情況為經設計以促成細胞中同源定向修復及模板核酸之整合的同源臂。核酸模板可包括側接與第一目標基因座同源之序列以促成目標基因座之同源重組之用於所關注多肽之開放閱讀框架(ORF)。模板可包括側接gRNA裂解位點之同源臂，例如其中同源臂包含側接序列。在某些實施例中，側接序列經設計以省略裂解位點或周圍之目標基因座區，以產生此區缺失，因此防止修復後之位點切割且亦防止gRNA/Cas9切割模板核酸。包括gRNA裂解位點之省略之區或「間隙」之長度可為5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150或更多個核苷酸。側接序列可經設計以缺失例如10至100個核苷酸間隙、10至50個核苷酸間隙、25至100個核苷酸間隙或50至100個核苷酸間隙。

【0292】 編碼所關注多肽之核酸可包含於病毒模板或非病毒模板中。病毒載體可為任何適合之病毒，諸如反轉錄病毒、腺病毒、慢病毒、腺相關病毒或其雜合體。在一些實施例中，病毒載體可為腺相關病毒(AAV)載體。核酸模板在ORF上游可包含外源性啟動子序列。核酸模板可為無啟動子的，因為內源性TRAC啟動子在插入其之後可驅動所關注多肽表現。

【0293】 除編碼所關注多肽之序列以外，核酸模板可包含啟動子序列、Kozak序列、IRES序列、剪接受體、polyA序列及編碼諸如P2A、T2A、E2A及其類似物之可裂解肽之序列中之一或多者。

【0294】 在一些實施例中，本文所述之方法進一步包含向細胞遞送一或多種序列，該或該等序列包含一或多種編碼一或多種所關注多肽之基因。在一些實施例中，所關注多肽涉及調節免疫耐受性。在一些實施例中，所關注多肽涉及調節癌症表現型。

【0295】 在一些實施例中，一或多種多肽包含受體，例如免疫受體。免疫受體意謂可識別抗原之受體。免疫受體之例示性類型為T細胞受體(TCR)及嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，免疫受體識別癌症抗原，諸如WT1。在某些實施例中，所關注多肽為WT1 TCR。WT1 TCR可識別VLDFAPPGA (VLD)或RMFPNAPYL (RMF) WT1肽。在某些具體實施例中，WT1 TCR識別VLD肽。所關注多肽可包含WT1 TCR  $\alpha$ 鏈。所關注多肽可包含WT1 TCR  $\beta$ 鏈。在某些實施例中，所關注多肽可包含WT1 TCR  $\alpha$ 鏈及WT1 TCR  $\beta$ 鏈。示例性WT1特異性TCR序列在此項技術中已知且包括：

表4

TCR ID	胺基酸序列	SEQ ID NO:
TCR-A ( $\beta$ -鏈子- $\alpha$ 組態)	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPIS <b>GHDY</b> LFWYRQTMMRGLELLIY <b>FNNN</b> VPIDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVY <b>FCASRKTGGY</b> <b>SNQPQH</b> FGDGTRLSILEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVLSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRGGSGAT NFSLLKQAGDVEENPGPMETLLKVLSGTLLWQLTWVRSQ QPVQSPQAVILREGEDAVINCSS <b>SKALYS</b> VHWYRQKHGEA PVFLMILL <b>KGGEQ</b> KGHEKISASFNEKKQSSLYLTASQLS YSGTY <b>FCGTAWINDYKLS</b> FGAGTTVTVRANIQNPDPAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLK VAGFNLL MTLRLWSS	500
TCR-A, $\alpha$ 鏈	METLLKVLSGTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGEDAV INCSS <b>SKALYS</b> VHWYRQKHGEAPVFLMILL <b>KGGEQ</b> KGHE KISASFNEKKQSSLYLTASQLSYSGTY <b>FCGTAWINDYKLS</b> <b>FGAGTTVTVRANIQNPDPAVY</b> QLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLK VAGFNLL MTLRLWSS	501
TCR-A, $\beta$ 鏈	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPIS <b>GHDY</b> LFWYRQTMMRGLELLIY <b>FNNN</b> VPIDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVY <b>FCASRKTGGY</b> <b>SNQPQH</b> FGDGTRLSILEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVLSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG	502
TCR-B ( $\beta$ -鏈子- $\alpha$ 組態)	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPIS <b>GHDY</b> LFWYRQTMMRGLELLIY <b>FNNN</b> VPIDDSGM PEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVY <b>FCASRKTGGY</b> <b>SNQPQH</b> FGDGTRLSILEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ	503

	KATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRGGSGAT NFSLLKQAGDVEENPGPMETLLKVLSGTLLWQLTWVRSQ QPVQSPQAVILREGEDAVINCSSSKALYSVHWYRQKHGEA PVFLMILLKGGGEQKGHEKISASFNEKKQSSLYLTASQLS YSGTYFCGTAWINDYKLSFGAGTTVTVRANIQNPDPAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLL MTLRLWSS	
TCR-B, $\alpha$ 鏈	METLLKVLSGTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGEDAV INCSSSKALYSVHWYRQKHGEAPVFLMILLKGGGEQKGHE KISASFNEKKQSSLYLTASQLSYSGTYFCGTAWINDYKLS FGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNL NFQNL SVIGFRILLK VAGFNLL MTLRLWSS	504
TCR-B, $\beta$ 鏈	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHDYLFWYRQTM MRGLELLIYFN NNVPIDDSGM PEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRKTGGY SNQPQHFGDGTRLSILEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG	505
TCR-C ( $\beta$ -鏈接子- $\alpha$ 組 態)	MSNQVLCCVVL CFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVT LSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGD IAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSPGALYE QYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDE WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATIL YEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRGGSGATNFSL LKQAGDVEENPGPMTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHP STLSVQEGDSAVIKCTYS DSASNYFPWYKQELGKRPQLIID IRSNVGEKKDQRIAVTLNKTAKHFS LHITETQPEDSAVYFC AATEDLTLIWGAGTKLIKPD IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSV	506

	CLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSF ETDTNLFQNLVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS	
TCR-C, $\alpha$ 鏈	MTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGDSAVIK CTYSDSASNYFPWYKQELGKRPLI DIRSNVGEKKDQRIA VTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAVYFCAATEDLTLIWGAGT KLIKPDIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIG FRILLK VAGFNLLMTLRLWSS	507
TCR-C, $\beta$ 鏈	MSNQVLCCVVL CFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVT LSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGD IAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSPGALYE QYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDE WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATIL YEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG	508
TCR-D ( $\beta$ -連接子- $\alpha$ 組 態)	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTTPRHLVGMTN KKSLKCEQHLGHNAMEWYKQSAKKPLELMFVYSLEERV ENNSVPSRFSPECNSSLHFLHLHTLQPEDSALYLCASSQD YLVSNEKLFFGSGTQLSVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRGGSG ATNFSLLKQAGDVEENPGPMISLRVLLVILWLQLSWVWSQ RKEVEQDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDC RKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLIRDSKLS DSATYLCVNVNLLSNQGGKLIFGQGTELSVKPNIQNPDAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLK VAGFNLL MTLRLWSS	509
TCR-D, $\alpha$ 鏈	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQDPGPFNVPEGATV AFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDG RFTAQLNRASQYISLLIRDSKLS DSATYLCVNVNLLSNQGGK LIFGQGTELSVKPNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN	510

	KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKSFETDTN LNFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	
TCR-D, $\beta$ 鏈	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTTPRHLVGMTN KKSLKCEQHLGHNAMYWYKQSAKKPLELMFVYSLEERV ENNSVPSRFSPECPNSSHLFLHLHTLQPEDSALYLCASSQD YLVSNEKLFFGSGTQLSVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMLMAMVKRKDSRG	511
TCR-E ( $\beta$ -鏈子- $\alpha$ 組 態)	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTTPRHLVGMTN KKSLKCEQHLGHNAMYWYKQSAKKPLELMFVYSLEERV ENNSVPSRFSPECPNSSHLFLHLHTLQPEDSALYLCASSQD YLVSNEKLFFGSGTQLSVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMLMAMVKRKDSRGGSG ATNFSLLKQAGDVEENPGPMISLRVLLVILWLQLSWVWSQ RKEVEQDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDC RKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLIRDSKLS DSATYLCVVNLLSNQGGKLIFGQGTELSVKPNIQNPDPAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLL MTLRLWSS	512
TCR-E, $\alpha$ 鏈	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQDPGPFNVPEGATV AFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDG RFTAQLNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVNLLSNQGGK LIFGQGTELSVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKSFETDTN LNFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	513
TCR-E, $\beta$ 鏈	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTTPRHLVGMTN KKSLKCEQHLGHNAMYWYKQSAKKPLELMFVYSLEERV ENNSVPSRFSPECPNSSHLFLHLHTLQPEDSALYLCASSQD YLVSNEKLFFGSGTQLSVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYG	514

	LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG	
TCR-F (β-鏈子-α組 態)	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCCLLGAVSVAAGVIQSPRHL IKEKRETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEK MQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSSELELGDSALYFCA SSLRGGLEKLFFGSGTQLSVLEDLNKVFPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDFGSG ATNFSLLKQAGDVEENPGPMSLSSLLKVVTASLWLGPZIA QKITQTQPGMFVQEKEAVTLDCTYDTSYGLFWYKQPS SGEMIFLIYQGSYDQQNATEGRYSLNFQKARKSANLVISAS QLGDSAMYFCAISGNTPLVFGKGTRLSVIANIQNPDPVAVYQ LRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPE SSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLL MTRLRWSS	515
TCR-F，α鏈	MSLSSLLKVVTASLWLGPZIAQKITQTQPGMFVQEKEAVT LDCTYDTSYGLFWYKQPSSGEMIFLIYQGSYDQQNAT EGRYSLNFQKARKSANLVISASQLGDSAMYFCAISGNTPLV FGKGTRLSVIANIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLN FQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTRLRWSS	516
TCR-F，β鏈	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCCLLGAVSVAAGVIQSPRHL IKEKRETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEK MQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSSELELGDSALYFCA SSLRGGLEKLFFGSGTQLSVLEDLNKVFPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF	517
TCR-G (β-鏈子-α組 態)	MGTRLLCWAALCCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIIEKRQSVAF WCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFNNGVVDDSQLP KDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSLYRGEQ YFGPGTRLTVTEDLKNVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC LATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWT	518

	<p>QDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEI  LLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRGGSGATNFSLLKQ  AGDVEENPGPMAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQ  QVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAE  GPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKSAKHLSLHIVPSQPGD  SAVYFCAARGQGNLIFGKGTKLSVKPNIQNPDPAVYQLRD  SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRS  MDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCD  VKLVEKSFETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMLTLR  LWSS</p>	
TCR-G, $\alpha$ 鏈(氨基酸序列)	<p>MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLS  VQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAE  GPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKSAKHLSLHIVPSQPGD  SAVYFCAARGQGNLIFGKGTKLSVKPNIQNPDPAVYQLRD  SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRS  MDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCD  VKLVEKSFETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMLTLR  LWSS</p>	519
TCR-G, $\beta$ 鏈(氨基酸序列)	<p>MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIIEKRQSVAF  WCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNNGVVDDSQLP  KDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSLYRGEQ  YFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC  LATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN  DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWT  QDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEI  LLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG</p>	520
TCR-H ( $\beta$ -鏈- $\alpha$ 組態)	<p>MSLGLLCCGAFSLLWAGPVNAGVTQTPKFRVLKTGQSMT  LLCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGTTAKG  EVPDGYNVSRLLKQNFLGLESAAPSQTSVYFCASRGYHR  LNNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK  ATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKE  QPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSE  NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLS  ATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRGGSGATN  FSLKQAGDVEENPGPMISLRVLLVILWLQLSWVWSGGGS  WSHPQFEKGGGSGGGSSGSAWSHPQFEKQRKEVEQDPGP  FNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSV  YSSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVK  PDPGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSD  KSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRS  MDFKS</p>	521

	NSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVE KSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS	
TCR-H, $\alpha$ 鏈(胺 基酸序列)	MISLRVLLVILWLQLSWVWSGGGSWSHPQFEKGGGSGGG SGGSAWSHPQFEKQRKEVEQDPGFNVPEGATVAFNCTYS NSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQLN RASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVKPDPGAGSYQLTFGKG TKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV SQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFAC ANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS	522
TCR-H, $\beta$ 鏈(胺 基酸序列)	MSLGLLCCGAFSLLWAGPVNAGVTQTPKFRVLKTGQSMT LLCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGETTAKG EVPDGYNVSRLLKQNFLGLESAAPSQTSVYFCASRGYHR LNNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKE QPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG	523

【0296】 互補決定區(CDR)存在於例如TCR及抗體之可變域內。在TCR $\alpha$ 及TCR $\beta$ 之各可變域中存在三個CDR，其為各可變域之指定CDR1、CDR2及CDR3。此等CDR之確切邊界可根據已知方法界定，參見例如Kabat等人，「Sequences of Proteins of Immunological Interest」及Dunbar等人，「ANARCI: antigen receptor numbering and receptor classification」，其提供適用於可變域以及界定三個CDR之殘基邊界之殘基編號系統。其他CDR界定方法可產生與基於Kabat之CDR重疊且根據特定殘基或殘基群組或甚至整個CDR並不顯著影響抗原結合之預測或實驗研究結果縮短或拉長的CDR。在本文中，CDR可根據此等方法中之任一者界定。

【0297】 一或多種序列可插入(例如經歷整合)至諸如TRAC、TRBC1及/或TRBC2之基因座中。在一些實施例中，一或多種基因插入

(例如經歷整合)至TRAC基因座中。可提供一或多種呈可操作地連接於諸如EF-1 $\alpha$ 啟動子之異源啟動子之形式的基因。或者，可提供一或多種基因以使得其經組態以在整合時自內源性啟動子(例如TRAC、TRBC1或TRBC2啟動子)表現。一或多種基因可包含藉由自裂解序列連接之兩種或更多種多肽之轉譯融合體。此方法可為有幫助的，其中提供用於多鏈受體(例如T細胞受體)之編碼序列且需要使用單一啟動子(不論內源或異源)以驅動受體表現。因此，啟動子之活性產生一種mRNA，其包含有包括複數個受體鏈之胺基酸的連續編碼序列且轉譯成多肽，該多肽經歷裂解以提供個別受體鏈。

**【0298】** 一或多種序列可藉由任何適當手段遞送，例如轉染、脂質奈米粒子、電穿孔、顯微注射或病毒載體。在一些實施例中，使用諸如腺相關病毒載體之病毒載體。

#### IV. 另外示例性實施例

**【0299】** 提供以下另外例示性實施例。

實施例001. 一種改變TRBC1及/或TRBC2基因內之DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

a. 包含選自以下之序列的引導RNA：

i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID No：1-24中任一者之引導序列；及

- v. 包含SEQ ID No：1-6中任一者之引導序列；或
- b. 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況
- c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例002. 一種降低TRBC1及/或TRBC2基因之表現之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

- a. 包含選自以下之序列的引導RNA：
  - i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；
  - ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID No：1-24中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID No：1-6中任一者之引導序列；或
- b. 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況
- c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例003. 一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞及/或同種異體細胞投與組合物，其中該組合物包含：

- a. 包含選自以下之序列的引導RNA：
  - i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；
  - ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

- iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID No：1-24中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID No：1-6中任一者之引導序列；或
- b. 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況
- c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例004. 一種改變TRAC基因內之DNA序列之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

- a. 包含選自以下之序列的引導RNA：
    - i. 選自SEQ ID NO：90-178之引導序列；
    - ii. 選自SEQ ID NO：90-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
    - iii. 與選自SEQ ID NO：90-178之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
    - iv. 包含SEQ ID No：90-113中任一者之引導序列；及
    - v. 包含SEQ ID No：90-95中任一者之引導序列；或
- b. 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況
- c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例005. 一種降低TRAC基因之表現之方法，其包含將組合物遞送至細胞，其中該組合物包含：

- a. 包含選自以下之序列的引導RNA：

- i. 選自SEQ ID NO：90-178之引導序列；
  - ii. 選自SEQ ID NO：90-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii. 與選自SEQ ID NO：90-178之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID No：90-113中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID No：90-95中任一者之引導序列；或
- b. 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況
  - c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例006. 一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞及/或同種異體細胞投與組合物，其中該組合物包含：

- a. 包含選自以下之序列的引導RNA：
  - i. 選自SEQ ID NO：90-178之引導序列；
  - ii. 選自SEQ ID NO：90-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii. 與選自SEQ ID NO：90-178之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID No：90-113中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID No：90-95中任一者之引導序列；或
- b. 編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況
- c. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例007. 一種改變TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之DNA序

列之方法，其包含向細胞遞送第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

- i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；
  - ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID No：1-24中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID No：1-6中任一者之引導序列；及
- 其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

- i. 選自SEQ ID NO：90-178之引導序列；
- ii. 選自SEQ ID NO：90-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
- iii. 與選自SEQ ID NO：90-178之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
- iv. 包含SEQ ID No：90-113中之任一者之引導序列；及
- v. 包含SEQ ID No：90-95中任一者之引導序列。

實施例008. 一種降低TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現之方法，其包含向細胞遞送第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

- i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；

- ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID No：1-24中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID No：1-6中任一者之引導序列；及
- 其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：
- i. 選自SEQ ID NO：90-178之引導序列；
  - ii. 選自SEQ ID NO：90-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
  - iii. 與選自SEQ ID NO：90-178之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；
  - iv. 包含SEQ ID No：90-113中任一者之引導序列；及
  - v. 包含SEQ ID No：90-95中任一者之引導序列。

實施例009. 一種免疫治療方法，其包含向個體、其自體細胞或同種異體細胞投與組合物，其中該組合物包含：第一引導RNA、第二引導RNA，及視情況經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸，其中該第一引導RNA包含選自以下之序列：

- i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；
- ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；
- iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID No：1-24中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID No：1-6中任一者之引導序列；及

其中該第二引導RNA包含選自以下之序列：

i. 選自SEQ ID NO：90-178之引導序列；

ii. 選自SEQ ID NO：90-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；

iii. 與選自SEQ ID NO：90-178之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；

iv. 包含SEQ ID No：90-113中任一者之引導序列；及

v. 包含SEQ ID No：90-95中任一者之引導序列。

實施例010. 如前述實施例中任一者之方法，其中投與經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例011. 一種組合物，其包含：

a. 引導RNA，其包含

i. 選自SEQ ID NO：1-89之引導序列；或

ii. 選自SEQ ID NO：1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；或

iii. 與選自SEQ ID NO：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；或

iv. 包含SEQ ID No：1-24中任一者之引導序列；或

v. 包含SEQ ID No：1-6中任一者之引導序列；及視情況

b. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例012. 如實施例11之組合物，其係用於改變細胞中TRBC1及/或TRBC2基因內之DNA序列。

實施例013. 如實施例11之組合物，其係用於降低細胞中該等TRBC1及/或TRBC2基因之表現。

實施例014. 一種組合物，其包含：

a. 引導RNA，其包含：

i. 選自SEQ ID NO：90-178之引導序列；或

ii. 選自SEQ ID NO：90-178之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；或

iii. 與選自SEQ ID NO：90-178之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；或

iv. 包含SEQ ID No：90-113中任一者之引導序列；或

v. 包含SEQ ID No：90-95中任一者之引導序列；及視情況

b. 經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸。

實施例015. 如實施例14之組合物，其係用於改變細胞中TRAC基因內之DNA序列。

實施例016. 如實施例14之組合物，其係用於降低細胞中該TRAC基因之表現。

實施例017. 如實施例11至17中任一者之組合物，其係用於個體之免疫療法中。

實施例018. 一種細胞，其係藉由如實施例1至10中任一者之方法改變。

實施例019. 如實施例18之細胞，其中該細胞經離體改變。

實施例020. 如實施例18或實施例19之細胞，其中該細胞為T細胞。

實施例021. 如實施例18至20中任一者之細胞，其中該細胞為CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及/或CD8<sup>+</sup>T細胞。

實施例022. 如實施例18至21中任一者之細胞，其中該細胞為哺乳動物、靈長類動物或人類細胞。

實施例023. 如實施例18至21中任一者之細胞，其係用於個體之免疫療法中。

實施例024. 如實施例1至10中任一者之方法，其進一步包含：

a. 誘導細胞及/或個體中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之雙股斷裂(DSB)；或

b. 誘導細胞及/或個體中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因內之單股斷裂(SSB)；或

c. 降低細胞及/或個體中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現。

實施例025. 如實施例1至3、7至13中任一者之方法或組合物，其中該組合物讓該等TRBC1及/或TRBC2基因發生編輯。

實施例026. 如實施例4至10及14至17中任一者之方法或組合物，其中該組合物讓該TRAC基因發生編輯。

實施例027. 如實施例7至10中任一者之方法或組合物，其中該組合物讓該TRBC基因及/或TRAC基因發生編輯。

實施例028. 如實施例25至27中任一者之方法或組合物，其中該編輯經計算為經編輯之群體之百分比(編輯百分比或插入或缺失百分比)。

實施例029. 如實施例25至28中任一者之方法或組合物，其中該編輯百分比係在群體之10%與100%之間，例如在群體之30%與99%之間。

實施例030. 如實施例25至29中任一者之方法或組合物，其中該編輯百分比係在群體之30%與35%、35%與40%、40%與45%、45%與50%、50%與55%、55%與60%、60%與65%、65%與70%、70%與75%、75%與80%、80%與85%、85%與90%、90%與95%或95%與99%之間。

實施例031. 如實施例1至3、7至13、17及24至30中任一者之方法或組合物，其中該組合物包含sgRNA，該sgRNA包含

- a. SEQ ID NO：179-184中之任一者；或
- b. 選自SEQ ID NO：1-89中任一者之引導序列；或
- c. 選自SEQ ID No：1-24之引導序列；或
- d. 選自SEQ ID No：1-6之引導序列。

實施例032. 如實施例4至10、14至17及24至30中任一者之方法或組合物，其中該組合物包含sgRNA，該sgRNA包含

- a. 選自SEQ ID NO：90-178中任一者之引導序列；或
- b. 選自SEQ ID No：90-113之引導序列；或
- c. 選自SEQ ID No：90-95之引導序列。

實施例033. 如實施例1至17及24至32中任一者之方法或組合物，其中該目標序列係於該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子1、2、3或4中。

實施例034. 如實施例33之方法或組合物，其中該目標序列係於該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子1中。

實施例035. 如實施例33之方法或組合物，其中該目標序列係於該等

TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子2中。

實施例036. 如實施例33之方法或組合物，其中該目標序列係於該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子3中。

實施例037. 如實施例33之方法或組合物，其中該目標序列係於該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之外顯子4中。

實施例038. 如實施例33至37中任一者之方法或組合物，其中該目標序列係於人類TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中。

實施例039. 如實施例1至17或24至38中任一者之方法或組合物，其中該引導序列與TRBC1、TRBC2及/或TRAC之正股中之目標序列互補。

實施例040. 如實施例1至17或24至38中任一者之方法或組合物，其中該引導序列與該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之負股中之目標序列互補。

實施例041. 如實施例1至17或24至40中任一者之方法或組合物，其中該第一引導序列與該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之正股中之第一目標序列互補，且其中該組合物進一步包含第二引導序列，其與該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之負股中之第二目標序列互補。

實施例042. 如實施例1至17或24至41中任一者之方法或組合物，其中該引導RNA包含選自SEQ ID No 1-178中任一者之引導序列，且進一步包含SEQ ID NO：200之核苷酸序列，其中SEQ ID NO：200之核苷酸位於該引導序列之3'端之後。

實施例043. 如實施例1至17或24至41中任一者之方法或組合物，其中該引導RNA包含選自SEQ ID No 1-178中任一者之引導序列，且進一步包含SEQ ID NO：201之核苷酸序列，其中SEQ ID NO：201之核苷酸位

於該引導序列之3'端之後。

實施例044. 如實施例1至17或24至43中任一者之方法或組合物，其中該引導RNA係根據SEQ ID NO：300之模式修飾，其中該等N集體為表1之引導序列(SEQ ID No 1-89)中之任一者。

實施例045. 如實施例44之方法或組合物，其中SEQ ID NO：300中各N為任何天然或非天然核苷酸，其中該等N形成引導序列，且該引導序列使Cas9靶向該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因。

實施例046. 如實施例42至44中任一者之方法或組合物，其中該sgRNA包含與選自SEQ ID No：1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列。

實施例047. 如實施例1至17或24至46中任一者之方法或組合物，其中該引導RNA包含至少一種修飾。

實施例048. 如實施例47之方法或組合物，其中該至少一種修飾包括2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾之核苷酸。

實施例049. 如實施例47或48之方法或組合物，其包含核苷酸之間的硫代磷酸酯(PS)鍵。

實施例050. 如實施例47至49中任一者之方法或組合物，其包含2'-氟(2'-F)修飾之核苷酸。

實施例051. 如實施例47至50中任一者之方法或組合物，其包含該引導RNA之5'端之前五個核苷酸中之一或多者處之修飾。

實施例052. 如實施例47至51中任一者之方法或組合物，其包含該引導RNA之3'端之後五個核苷酸中之一或多者處之修飾。

實施例053. 如實施例47至52中任一者之方法或組合物，其包含該引

導RNA之前四個核苷酸之間的PS鍵。

實施例054. 如實施例47至53中任一者之方法或組合物，其包含該引導RNA之後四個核苷酸之間的PS鍵。

實施例055. 如實施例47至54中任一者之方法或組合物，其包含該引導RNA之5'端之前三個核苷酸處之2'-O-Me修飾之核苷酸。

實施例056. 如實施例47至55中任一者之方法或組合物，其包含該引導RNA之3'端之後三個核苷酸處之2'-O-Me修飾之核苷酸。

實施例057. 如實施例47至56中任一者之方法或組合物，其中該引導RNA包含SEQ ID NO：300之經修飾之核苷酸。

實施例058. 如實施例1至17或24至57中任一者之方法或組合物，其中該組合物進一步包含醫藥學上可接受之賦形劑。

實施例059. 如實施例1至58中任一者之方法或組合物，其中該引導RNA與脂質奈米粒子(LNP)締合。

實施例060. 如實施例59之方法或組合物，其中該LNP包含生物可降解之可電離脂質。

實施例061. 如實施例60之方法或組合物，其中該可電離脂質為十八-9,12-二烯酸(9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-(((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯，亦稱為(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯酸3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-(((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯。

實施例062. 如實施例59至61中任一者之方法或組合物，其中該LNP包含中性脂質。

實施例063. 如實施例62之方法或組合物，其中該中性脂質為

DSPC。

實施例064. 如實施例59至63中任一項之方法或組合物，其中該LNP包含輔助脂質。

實施例065. 如實施例64之方法或組合物，其中該輔助脂質為膽固醇。

實施例066. 如實施例59至65中任一項之方法或組合物，其中該LNP包含隱形脂質。

實施例067. 如實施例66之方法或組合物，其中該隱形脂質為PEG2k-DMG。

實施例068. 如實施例1至17或24至66中任一者之方法或組合物，其中該組合物進一步包含經RNA引導之DNA結合劑。

實施例069. 如實施例1至17或24至68中任一者之方法或組合物，其中該組合物進一步包含編碼經RNA引導之DNA結合劑的mRNA。

實施例070. 如實施例68或69之方法或組合物，其中該經RNA引導之DNA結合劑為Cas9。

實施例071. 如實施例1至17或24至70中任一者之方法或組合物，其中該組合物為醫藥調配物且進一步包含醫藥學上可接受之載劑。

實施例072. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法、組合物或細胞，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：1。

實施例073. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：2。

實施例074. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：3。

實施例075. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：4。

實施例076. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：5。

實施例077. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：6。

實施例078. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：7。

實施例079. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：8。

實施例080. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：9。

實施例081. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ

ID NO：10。

實施例082. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：11。

實施例083. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：12。

實施例084. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：13。

實施例085. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：14。

實施例086. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：15。

實施例087. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：16。

實施例088. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：17。

實施例089. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71

中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：18。

實施例090. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：19。

實施例091. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：20。

實施例092. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：21。

實施例093. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：22。

實施例094. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：23。

實施例095. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：24。

實施例096. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：25。

實施例097. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：26。

實施例098. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：27。

實施例099. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：28。

實施例100. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：29。

實施例101. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：30。

實施例102. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：31。

實施例103. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：32。

實施例104. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ

ID NO：33。

實施例105. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：34。

實施例106. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：35。

實施例107. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：36。

實施例108. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：37。

實施例109. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：38。

實施例110. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：39。

實施例111. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：40。

實施例112. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71

中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：41。

實施例113. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：42。

實施例114. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：43。

實施例115. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：44。

實施例116. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：45。

實施例117. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：46。

實施例118. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：47。

實施例119. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：48。

實施例120. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：49。

實施例121. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：50。

實施例122. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：51。

實施例123. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：52。

實施例124. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：53。

實施例125. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：54。

實施例126. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：55。

實施例127. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ

ID NO：56。

實施例128. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：57。

實施例129. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：58。

實施例130. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：59。

實施例131. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：60。

實施例132. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：61。

實施例133. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：62。

實施例134. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：63。

實施例135. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71

中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：64。

實施例136. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：65。

實施例137. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：66。

實施例138. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：67。

實施例139. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：68。

實施例140. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：69。

實施例141. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：70。

實施例142. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：71。

實施例143. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：72。

實施例144. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：73。

實施例145. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：74。

實施例146. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：75。

實施例147. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：76。

實施例148. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：77。

實施例149. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：78。

實施例150. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ

ID NO：79。

實施例151. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：80。

實施例152. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：81。

實施例153. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：82。

實施例154. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：83。

實施例155. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：84。

實施例156. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：85。

實施例157. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：86。

實施例158. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71

中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：87。

實施例159. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：88。

實施例160. 如實施例1至3、7至13、17、24、25、27至31或33至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：1-89之序列為SEQ ID NO：89。

實施例161. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：90。

實施例162. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：91。

實施例163. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：92。

實施例164. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：93。

實施例165. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：94。

實施例166. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：95。

實施例167. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：96。

實施例168. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：97。

實施例169. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：98。

實施例170. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：99。

實施例171. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：100。

實施例172. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：101。

實施例173. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID

NO：102。

實施例174. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：103。

實施例175. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：104。

實施例176. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：105。

實施例177. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：106。

實施例178. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：107。

實施例179. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：108。

實施例180. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：109。

實施例181. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一

者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：110。

實施例182. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：111。

實施例183. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：112。

實施例184. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：113。

實施例185. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：114。

實施例186. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：115。

實施例187. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：116。

實施例188. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：117。

實施例189. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：118。

實施例190. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：119。

實施例191. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：120。

實施例192. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：121。

實施例193. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：122。

實施例194. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：123。

實施例195. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：124。

實施例196. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID

NO：125。

實施例197. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：126。

實施例198. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：127。

實施例199. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：128。

實施例200. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：129。

實施例201. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：130。

實施例202. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：131。

實施例203. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：132。

實施例204. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一

者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：133。

實施例205. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：134。

實施例206. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：135。

實施例207. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：136。

實施例208. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：137。

實施例209. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：138。

實施例210. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：139。

實施例211. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：140。

實施例212. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：141。

實施例213. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：142。

實施例214. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：143。

實施例215. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：144。

實施例216. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：145。

實施例217. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：146。

實施例218. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：147。

實施例219. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID

NO：148。

實施例220. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：149。

實施例221. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：150。

實施例222. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：151。

實施例223. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：152。

實施例224. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：153。

實施例225. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：154。

實施例226. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：155。

實施例227. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一

者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：156。

實施例228. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：157。

實施例229. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：158。

實施例230. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：159。

實施例231. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：160。

實施例232. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：161。

實施例233. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：162。

實施例234. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：163。

實施例235. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：164。

實施例236. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：165。

實施例237. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：166。

實施例238. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：167。

實施例239. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：168。

實施例240. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：169。

實施例241. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：170。

實施例242. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID

NO：171。

實施例243. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：172。

實施例244. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：173。

實施例245. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：174。

實施例246. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：175。

實施例247. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：176。

實施例248. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：177。

實施例249. 如實施例4至10、14至17、24、26至30或32至71中任一者之方法或組合物，其中該選自SEQ ID NO：90-178之序列為SEQ ID NO：178。

實施例250. 一種如任何前述實施例之組合物、調配物或細胞之用

途，其係用於製備藥劑。

實施例251. 如任何前述實施例之組合物、調配物或細胞，其係用作藥劑。

實施例252. 如實施例18至23中任一者之細胞，其缺乏內源性T細胞受體，該細胞用於製備表現非內源性T細胞受體之T細胞。

實施例253. 如實施例18-23中任一者之細胞，其缺乏內源性T細胞受體，該細胞用於製備表現CAR之T細胞。

實施例254. 如實施例18至23中任一者之細胞，其中該經改變之細胞為CD3<sup>-</sup>細胞。

實施例255. 如實施例18至23中任一項之細胞，其中該細胞在改變之前為CD3<sup>+</sup>細胞，且該經改變之細胞為CD3<sup>-</sup>細胞。

實施例256. 一種細胞群體，其包含如實施例18至23中任一者之細胞，其中經改變之群體之大於約50%、大於約55%、大於約60%、大於約65%、大於約70%、大於約75%、大於約80%、大於約85%、大於約90%、大於約95%、大於約98%或大於約99%為CD3<sup>-</sup>細胞。

實施例257. 如實施例256之群體，其中該群體之大於約90%為CD3<sup>-</sup>。

實施例258. 如實施例256之群體，其中該群體之大於約95%為CD3<sup>-</sup>。

實施例259. 如實施例256之群體，其中該群體之大於約99%為CD3<sup>-</sup>。

實施例260. 一種細胞群體，其包含如實施例18至23中任一者之細胞，其中該群體之大於約50%、大於約55%、大於約60%、大於約65%、

大於約70%、大於約75%、大於約80%、大於約85%、大於約90%、大於約95%、大於約98%或大於約99%為缺乏內源性T細胞受體。

實施例261. 如實施例260之群體，其中該群體之大於約90%缺乏內源性T細胞受體。

實施例262. 如實施例260之群體，其中該群體之大於約95%缺乏內源性T細胞受體。

實施例263. 如實施例260之群體，其中該群體之大於約99%缺乏內源性T細胞受體。

實施例264. 一種細胞群體，其包含如實施例18至23中任一者之細胞，其中在該群體中TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現相對於未經改變之相同細胞群體已降低至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約98%或至少約99%。

實施例265. 如實施例264之群體，其中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現降低係至少約90%。

實施例266. 如實施例264之群體，其中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現降低係至少約95%。

實施例267. 如實施例264之群體，其中該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因之表現降低係至少約99%。

實施例268. 如實施例264至267中任一者之群體，其中該降低係該TRBC1基因之表現降低。

實施例269. 如實施例264至267中任一者之群體，其中該降低係該TRBC2基因之表現降低。

實施例270. 如實施例264至267中任一者之群體，其中該降低係該TRAC基因之表現降低。

實施例271. 一種細胞群體，其包含如實施例18至23中任一者之細胞，其中該群體之10%與100%之間，例如該群體之30%與99%之間在該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中具有插入或缺失。

實施例272. 如實施例271之群體，其中該群體之30%與35%之間、35%與40%之間、40%與45%之間、45%與50%之間、50%與55%之間、55%與60%之間、60%與65%之間、65%與70%之間、70%與75%之間、75%與80%之間、80%與85%之間、85%與90%之間、90%與95%之間，或95%與99%之間可在該等TRBC1、TRBC2及/或TRAC基因中具有插入或缺失。

實施例273. 如實施例271或272之群體，其中該插入或缺失係於該TRBC1基因中。

實施例274. 如實施例271或272之群體，其中該插入或缺失係於該TRBC2基因中。

實施例275. 如實施例271或272之群體，其中該插入或缺失係於該TRAC基因中。

\* \* \*

**【0300】** 本說明書及例示性實施例不應視為限制性的。出於本說明書及隨附申請專利範圍之目的，除非另外指明，否則表示量、百分比或比例之所有數目及說明書及申請專利範圍中使用之其他數值應理解為在所有情況下藉由術語「約」修飾，程度為其尚未如此修飾。因此，除非有相反指示，否則以下說明書及所附申請專利範圍中所闡述之數值參數為可視設

法獲得之所需特性而變化的近似值。最低限度地，且不試圖限制等效物之原則對申請專利範圍之範疇的應用，各數值參數至少應根據所報導之有效數位的數目且藉由應用一般捨入技術來解釋。

**【0301】** 應注意，如本說明書及申請專利範圍中所用，除非明確地且肯定地限於一個指示物，否則單數形式「一(a/an)」與「該」及任何詞之任何單數使用形式包括複數個指示物。如本文所用，術語「包括」及其文法變化形式意欲具有非限制性，因此清單中之各項的敘述不排除可以取代或添加至所列項中的其他類似項。

## 實例

**【0302】** 提供以下實例以說明某些所揭示實施例且不應視為以任何方式限制本發明之範疇。

實例1：材料及方法

### 基因組DNA分離

**【0303】** 轉染後24小時時收集HEK293\_Cas9轉染細胞。根據製造商之方案使用50微升/孔QuickExtract™ DNA萃取溶液(Lucigen，目錄號QE09050)自96孔盤之各孔萃取gDNA。如本文所述，對DNA樣品進行PCR及後續NGS分析。

### 對於中靶(on-target)裂解效率之下一代定序(「NGS」)及分析

**【0304】** 為定量測定基因組中目標位置之編輯效率，使用深度定序來鑑別藉由基因編輯引入之插入及缺失的存在。PCR引子設計於所關注基因(例如*TRAC*)內之靶點周圍，且將所關注基因組區擴增。引子序列設計係以此領域中之標準進行。

**【0305】** 根據製造商之方案(Illumina)進行另外PCR以添加化學定

序。擴增子係經Illumina MiSeq儀器定序。在去除具有低品質評分之讀段之後，將讀段與人類參考基因組(例如hg38)比對。選擇與所關注目標區重疊之讀段，且計算野生型讀段數目相對於含有插入或缺失(「indel」)之讀段數目。

**【0306】** 編輯百分比(例如「編輯效率」或「插入或缺失百分比」)定義為具有插入或缺失(「indel」)之序列讀段之總數目除以包括野生型之序列讀段之總數目。

**【0307】** 實例2：在HEK細胞中之TRAC引導物設計及篩選  
**人類TRAC引導物設計**

**【0308】** 使用人類參考基因組(例如hg38)及使用者定義之所關注基因組區(例如TRAC蛋白質編碼外顯子)經由電腦模擬(*in silico*)進行初始引導物選擇以鑑別所關注區中之PAMs。對於各經鑑別之PAM，進行分析且報導統計資料。基於此項技術中已知的多種準則(例如GC含量、預測之中靶活性和可能之脫靶活性)進一步選擇gRNA分子且進行等級排序。

**【0309】** 針對TRAC (ENSG00000277734)靶向蛋白質外顯子編碼區及內含子1設計總計88種引導RNA。提供引導序列及對應基因組座標(表2)。

**【0310】** 在HEK293\_Cas9細胞中針對編輯效率篩選引導物。在補充有10%胎牛血清之DMEM培養基中培養組成性表現Spy Cas9 (「HEK293\_Cas9」)之人類胚胎腎臟腺癌細胞株HEK293。在轉染之前約24小時，將細胞以10,000個細胞/孔之密度接種於96孔盤中(在轉染時約70%滿度(confluent))。根據製造商之方案用脂染胺(Lipofectamine) RNAiMAX (ThermoFisher，目錄號13778150)轉染細胞一式二份。用含有個別引導物

(25 nM)、trRNA (25 nM)、脂染胺RNAiMAX (0.3微升/孔)及OptiMem之脂複合體(lipoplex)轉染細胞。如實例1所述進行DNA分離及NGS分析。圖1及表5顯示HEK293\_Cas9細胞中藉由此等引導物在TRAC基因座之插入或缺失%。

【0311】表5：在HEK293\_Cas9細胞中之TRAC引導物編輯

SEQ ID NO:	插入或缺失% (平均值)	SD	SEQ ID NO:	插入或缺失% (平均值)	SD
90	53.1	13	135	0.7	0.3
91	51.9	5.2	136	0.1	0.1
92	29.8	15.8	137	0.1	0.1
93	35.1	16.1	138	0.5	0.2
94	55.4	9	139	0.5	0.1
96	6.6	2.3	140	0.3	0.1
97	35.3	9.8	141	0.1	0
98	15.6	4.2	142	0.4	0.1
99	32	9.5	143	0.4	0.1
100	40	14.3	144	1.3	0.8
101	17	4.1	145	0.2	0.1
102	32.9	7.8	146	0.1	0
103	24.8	3.1	147	0.1	0.1
104	47.2	15.7	148	2.5	1.2
105	34.7	13.9	149	3	1
106	27.4	3.8	150	0.2	0.1
107	54.9	17.8	151	0.7	0.4
108	28.2	7.9	152	0.2	0.1
109	54.4	14	153	0.7	0.1
110	52.9	9.5	154	0.3	0.1
111	22.6	5	155	0.1	0.1
112	46.8	15.3	156	0.1	0
113	41.6	10.8	157	0.1	0.1
114	0.4	0.1	158	0.1	0.1
115	26.4	9.4	159	0.2	0.1
116	22.8	3.3	160	0.1	0
117	8.9	1.8	161	0.7	0.2
118	0	0	162	0.1	0.1

SEQ ID NO:	插入或缺失% (平均值)	SD	SEQ ID NO:	插入或缺失% (平均值)	SD
119	5.3	1.1	163	0.7	0
120	0.4	0.1	164	0.1	0
121	0.2	0.1	165	0	0
122	1.2	0.6	166	0.3	0
123	2.2	0.4	167	0.3	0.3
124	0.3	0.1	168	0.1	0.1
125	0.1	0	169	0.5	0.2
126	0.1	0.1	170	0.2	0.1
127	0	0	171	0.2	0.1
128	0.4	0.4	172	0.2	0.1
129	1.1	0.3	173	0	0
130	1.6	0.7	174	0.1	0
131	0.2	0.1	175	0.1	0.1
132	0.4	0.1	176	0.1	0
133	2.5	0.5	177	0.1	0.1
134	0.5	0.2	178	0.1	0

【0312】 實例3：人類CD3<sup>+</sup> T細胞中之TRAC引導物篩選

【0313】 在人類CD3<sup>+</sup> T細胞中針對編輯效率及T細胞受體(TCR)阻斷基因表現篩選來自實例2之HEK293\_Cas9細胞中具有最高插入或缺失編輯百分比之24種引導物。CD3<sup>+</sup> T細胞由多個包括CD4<sup>+</sup> T輔助細胞及CD8<sup>+</sup> 細胞毒性T細胞之T細胞群體構成。此等細胞可自全血中分離或自白血球分離術樣品中分離。T細胞可使用Cas9介導之編輯藉由工程改造患者T細胞進行修飾以特異性靶向癌細胞且具有較小免疫原性。此實例描述用以在T細胞中遞送Cas9 RNP，例如靶向TRAC之Cas9 RNP的基礎方法。僅需要改變RNP中之目標crRNA以使此方案適於不同T細胞目標(例如本文提供之彼等目標中之任一者)。

### 將RNP遞送至T細胞

【0314】 T細胞以市售方式獲得(例如人類周邊血液CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>

T細胞，冷凍，Stem Cell Technology，目錄號70029)或在內部由leukopak製備。對於內部製備，首先使用市售套組(例如EasySep™人類T細胞分離套組，Stem Cell Technology)由leukopak增濃T細胞。將經增濃之T細胞等分且冷凍(以 $5 \times 10^6$ /小瓶)以供未來使用。小瓶隨後視需要解凍，且藉由添加於T細胞培養基(RPMI 1640、FBS、L-麩醯胺酸、非必需胺基酸、丙酮酸鈉、HEPES緩衝液、2-巰基乙醇及視情況IL2)中之3:1比率之CD3/CD28珠粒(戴諾磁珠(Dynabeads)，Life Technologies)而活化。RNP藉由混合等量之試劑且在95°C下培育2 min且冷卻至室溫使個別crRNA及trRNA預黏接而產生。將由經預退火之crRNA及trRNA組成之雙引導物(dgRNA)與Sp將由經預黏接之crRNA及trRNA組成之雙引導物(dgRNA)與Spy Cas9蛋白質一起培育以形成核糖核蛋白(RNP)複合物。CD3<sup>+</sup> T細胞用含有Cas9 (10 nM)、個別引導物(10 nM)及示蹤劑RNA (10 nM)之RNP重複三次轉染，使用關於刺激之人類T細胞之製造商之Amaxa™ 96孔Shuttle™方案使用P3初級細胞96孔Nucleofector™套組(Lonza，目錄號V4SP-3960)核轉染。在核轉染之後緊接著將T細胞培養基添加至細胞中且培養2天或更多天。

【0315】核轉染後兩天，如實例1中所述製備基因組DNA且進行NGS分析。表6及圖2顯示CD3<sup>+</sup> T細胞中用多種引導物TRAC編輯之後插入或缺失頻率之結果。

【0316】表6：人類CD3<sup>+</sup> T細胞中TRAC編輯之插入或缺失頻率

SEQ ID NO:	插入或缺失頻率	標準差	樣品編號(n)
90	79.3%	1.5%	3
91	86.9%	1.2%	3
92	79.0%	1.9%	3
93	82.6%	1.4%	3
96	0.7%	0.1%	3

SEQ ID NO:	插入或缺失頻率	標準差	樣品編號(n)
97	55.2%	3.1%	3
98	15.5%	1.0%	3
99	27.9%	0.9%	3
100	57.7%	3.0%	3
101	26.2%	0.8%	3
102	31.2%	0.8%	3
103	58.1%	1.8%	3
104	62.0%	2.8%	3
105	47.8%	2.0%	3
106	52.0%	2.7%	3
108	27.7%	1.9%	3
109	72.7%	3.7%	3
110	33.0%	2.2%	3
111	36.9%	1.3%	3
112	76.7%	1.0%	3
113	65.7%	4.3%	3

**【0317】 TCR表現之流式細胞測量分析**

**【0318】** 核轉染後4天量測TCR之表現。細胞用可固定活死亡染料(Thermo fisher L34975)染色，且使用Alexa Fluor® 647抗人類TCR  $\alpha/\beta$  抗體(Biolegend，目錄號306714)偵測TCR。在冰上用2 ul抗體培育細胞至少20分鐘，藉由流式細胞測量術使用例如Beckman Coulter CytotflexS)分析。使用Flow Jo軟體分析資料。分析活細胞群體之TCR缺失。結果顯示於表7及圖3中。

**【0319】 表7：CD3<sup>+</sup> T細胞中TRAC編輯後之TCR表現**

SEQ ID NO:	供體1 - TCR 陰性%	供體1 - 標準差	供體2 - TCR 陰性%	供體2 - 標準差
90	80.2	19.5	84.9	3.6
91	95.3	1.4	80.7	20.5
92	93.5	0.3	87.6	3.4
93	95.9	0.6	91.7	5
94	73.5	28.3	90.2	2.1
96	3.6	0.8	1.8	0.4

SEQ ID NO:	供體1 - TCR 陰性%	供體1 - 標準差	供體2 - TCR 陰性%	供體2 - 標準差
97	59.9	0.9	51.3	0.4
98	17.9	1.1	11.5	1.2
99	32.9	1.1	30.4	2.3
100	61.4	1.7	55.8	3.4
101	28.8	1.3	24.6	2
102	28.7	0.5	20.7	1
103	58.2	6.4	41.6	0.4
104	68	5.7	58	3.2
105	46.8	3.3	46.2	1.5
106	58	1.6	51.6	1.7
107	62.3	4.6	62.2	0.9
108	3.3	0.3	2.6	0.4
109	4.5	0.5	4.2	0.5
110	33.1	2.5	35.1	10.9
111	5.1	0.1	3.7	0.3
112	10.5	0.2	17.7	12.3
113	6.3	0.7	5.7	1
116	19.3	1.5	13.7	0.4

#### 【0320】 實例4：HEK細胞中之TRBC引導物設計及篩選

##### 人類TRBC引導物設計

【0321】 用於編輯人類*TRBC1* (ENSG00000211751)及*TRBC2* (ENSG00000211772)之最初引導物選擇如實例2中所述。設計總計89種引導RNA：2種僅靶向*TRBC1* (SEQ ID NO：11及SEQ ID NO：26)，2種僅靶向*TRBC2* (SEQ ID NO：8)且86種靶向*TRBC1*與*TRBC2*。引導物經設計以靶向蛋白質外顯子編碼區。上文提供引導物及對應基因組座標(表1)。

【0322】 在HEK293\_Cas9細胞中針對編輯效率篩選TRBC引導物。如實例2中所述進行轉染。如實例1所述進行DNA分離及NGS分析。圖4A及4B及表8顯示HEK293\_Cas9細胞中藉由此等引導物在*TRBC1*及*TRBC2*基因座之插入或缺失%。

【0323】表8：在HEK293\_Cas9細胞中之TRBC引導物編輯

SEQ ID NO:	TRBC1平均 插入或缺失 %	TRBC1 SD	值數(n)	TRBC2平均 插入或缺失 %	TRBC2 SD	值數(n)
1	22.7	4.8	3	28.0	5.9	3
2	50.6	2.9	3	56.9	3.1	3
3	28.7	3.5	3	41.9	4	3
4	53.4	8.6	3	34.4	NA	1
5	33.9	7.7	3	29.5	7.1	3
6	54.8	8	3	48.7	7.7	3
7	47.3	4	3	43.9	3.8	3
8	30.2	3.5	3	38.6	2.5	3
9	29.5	6.4	3	30	6.5	3
10	31.5	4.6	3	41.7	5.9	3
11	38.4	9.7	3	2.6	0.8	3
12	29.6	5	3	28.1	6	3
13	61.7	4.9	3	65.7	4.4	3
14	31.5	7.8	3	38.3	8	3
15	24.2	7.5	3	31.7	10.3	3
16	33	2.6	3	34.9	3.2	3
17	37.4	9.3	3	32.3	8.2	3
18	43	9.4	3	37.6	7.9	3
19	22.2	8.6	3	30.2	9.3	3
20	38.7	8.9	3	48.5	10.4	3
21	40.9	5	3	31.3	3.6	3
22	33.1	7.5	3	28.3	7.4	3
23	36.4	2.2	3	22.7	0.8	3
24	32.6	4.2	3	29.5	3.8	3
26	22.5	2.6	3	2.9	0.3	3
27	3.7	0.2	3	3.2	0.3	3
28	0.1	0	3	0.1	0.1	3
29	0.3	0.1	3	0.4	0.2	3
30	0.2	0.1	3	0.3	0.2	3
31	0.1	0	3	0.2	0.1	3
32	0.2	0.1	3	0.2	0.1	3
33	0.4	0.1	3	0.2	0.1	3
34	0.4	0.1	3	0.3	0.1	3
35	0	0.1	3	0.1	0.1	3

SEQ ID NO:	TRBC1平均 插入或缺失 %	TRBC1 SD	值數(n)	TRBC2平均 插入或缺失 %	TRBC2 SD	值數(n)
36	0.3	0.1	3	0.3	0.1	3
37	0.8	0.1	3	0.5	0.2	3
38	0.3	0.1	3	0.3	0.1	3
39	2.2	0.4	3	2.2	0.4	3
40	0.1	0.1	3	0.2	0.1	3
41	0.1	0	3	0.2	0.1	3
42	0.1	0.1	3	0.2	0.1	3
43	0.2	0	3	0.1	0.1	3
44	0.2	0	3	0.3	0.1	3
45	0.1	0.1	3	0.1	0	3
46	0.1	0	3	0.1	0	3
47	0.1	0	3	0.2	0.1	3
48	0.2	0.2	3	0.3	0.1	3
49	0.1	0	3	0.1	0	3
50	0.3	0.1	3	0.2	0.1	3
51	0.4	0.1	3	0.4	0.1	3
52	0.2	0.1	3	0.1	0.1	3
53	1.6	0.2	3	1.8	0.2	3
54	0.2	0.1	3	0.3	0.1	3
55	0.1	0.1	3	0	NA	1
56	0.2	0.1	3	0.4	0.1	3
57	0.1	0	3	0.1	0	3
58	5.8	1.3	3	5	1.1	3
59	0.3	0.1	3	0.2	0.1	3
60	0.3	0.1	3	0.2	0.1	3
61	1	0.2	3	1.6	0.3	3
62	1.7	0.3	3	2.2	0.2	3
63	0.3	0.1	3	0.3	0.1	3
64	0.2	0.1	3	0.3	0.1	3
65	0.2	0	3	0.2	0	3
66	0.1	0.1	3	0.2	0.1	3
67	0.1	0	3	0.1	0.1	3
68	0.7	0.2	3	0.6	0.1	3
69	0	0.1	3	0.1	0.1	3
70	0.1	0.1	3	0.1	0.1	3

SEQ ID NO:	TRBC1平均插入或缺失 %	TRBC1 SD	值數(n)	TRBC2平均插入或缺失 %	TRBC2 SD	值數(n)
71	18.9	5.1	3	24.2	6	3
72	13.8	3	3	14.2	2.6	3
73	12.9	2.9	3	18.4	3.3	3
74	3.3	0.4	3	4.2	1.2	3
75	8.3	1.1	3	13	1.4	3
76	0.3	0	3	0.1	0.1	3
77	18.5	1.3	3	15.1	1.3	3
78	22.2	2.8	3	23.3	2.2	3
79	14.6	2.5	3	13.6	2.6	3
80	0.4	0.1	3	0.5	0.2	3
81	0.3	0.1	3	0.5	0.1	3
82	15.9	2.3	3	9.1	1.8	3
83	13.6	5	3	16.8	5.5	3
84	0.8	0.3	3	0.7	0.1	3
85	6.9	1.2	3	6.3	1.5	3
86	9.7	2	3	9	1.8	3
87	0.7	0.1	3	0.2	0.2	3
88	15.8	1.7	3	13.9	1.6	3
89	5	0.6	3	6.3	0.3	3

【0324】 實例5：人類CD3<sup>+</sup> T細胞中之TRBC引導物篩選

【0325】 在人類CD3<sup>+</sup> T細胞中針對編輯效率及T細胞受體(TCR)表現篩選來自實例4之HEK293\_Cas9細胞中具有最高插入或缺失編輯百分比之TRBC引導物。如實例3中進行核轉染、編輯分析及TCR表現分析。表9及圖5顯示CD3<sup>+</sup> T細胞中用多種引導物TRBC編輯後之插入或缺失頻率之結果。表10及圖6顯示CD3<sup>+</sup> T細胞中TRBC編輯後之TCR表現量測值(以TCR陰性細胞%)。

表9：CD3<sup>+</sup> T細胞中TRBC1之插入或缺失頻率

SEQ ID NO:	平均插入或缺失頻率	標準差	樣品編號(n)
------------	-----------	-----	---------

1	42.40%	0.80%	3
2	50.50%	3.90%	3
3	45.80%	3.00%	3
4	42.50%	3.40%	3
5	45.00%	5.00%	3
6	53.50%	2.40%	3
7	37.30%	7.90%	3
8	27.40%	1.50%	3
9	34.00%	3.20%	3
10	28.20%	3.50%	3
11	25.10%	4.60%	3
12	8.30%	0.40%	3
13	34.20%	1.20%	3
14	21.00%	1.30%	3
15	11.60%	2.50%	3
16	45.70%	1.00%	3
17	35.10%	4.60%	3
18	14.10%	1.30%	3
19	30.40%	2.10%	3
20	30.50%	2.70%	3
21	23.80%	0.90%	3
22	35.50%	3.40%	3
23	30.00%	1.10%	3
24	24.80%	1.40%	3

表10：CD3<sup>+</sup> T細胞中TRBC編輯後之TCR表現

SEQ ID NO:	供體1 - TCR 陰性%	供體1 - 標準差	供體2 - TCR 陰性%	供體2 - 標準差
1	71.2	1.4	74.4	1.3
2	72.4	2.6	79.9	1.5
3	73.3	2.3	76.4	2.8
4	74	0.9	79.2	0.7
5	66.4	1.1	71.5	0.5
6	75	2.2	85.7	1.4
7	53.5	2.2	60.7	2.3
8	18	5.1	30.6	7.6
9	44.4	1.3	59.6	4.1
10	41.2	7.9	47.9	2.3
11	16.3	0.3	20.9	0.7

第 145 頁(發明說明書)

SEQ ID NO:	供體1 - TCR 陰性%	供體1 - 標準差	供體2 - TCR 陰性%	供體2 - 標準差
12	11.8	0.7	14.6	1
13	48.2	12.3	67.2	2
14	23.3	6.5	34.8	3.9
15	22.1	0.8	23.3	1.6
16	60.8	1.7	70.5	0.5
17	42.8	1.4	49.7	0.7
18	20.6	1.8	28.7	8.7
19	45.9	0.8	50.7	1.4
20	55.3	3.2	60.2	1.1
21	39.7	3.4	46.1	0.8
22	39.6	2.1	44.1	1.4
23	33.5	1	43.6	1.1
24	29.5	2.1	32.8	1
25	43.2	1	57	1.5

【0326】 實例6：對於TRBC及TRAC引導物之脫靶分析

【0327】 使用生物化學方法(參見例如Cameron等人, *Nature Methods*. 6, 600-606 ; 2017)測定由靶向TRAC、TRBC1或TRBC2之Cas9裂解之潛在脫靶基因組位點。用此分析測試顯示實例3及實例5中之大部分CD3陰性細胞之引導物的潛在脫靶基因組裂解位點。在此實驗中，使用分離之HEK293\_Cas基因組DNA篩選靶向人類TRAC之7種sgRNA、靶向TRBC之6種sgRNA及具有已知脫靶特徵之兩種對照引導物。使在生物化學分析中使用16 nM之RNP濃度偵測到之潛在脫靶位點數目繪製於圖7A中且示於表11中。該分析鑑別用於所測試之sgRNA之潛在脫靶位點。

【0328】 表11：生物化學脫靶分析

SEQ ID NO:	目標	位點數目
179	TRBC1/2	48
180	TRBC1/2	11
181	TRBC1/2	54
182	TRBC1/2	72

SEQ ID NO:	目標	位點數目
183	TRBC1/2	65
184	TRBC1/2	61
186	TRAC	36
187	TRAC	40
188	TRAC	168
189	TRAC	35
190	TRAC	31
191	TRAC	207
192	TRAC	253
193	EMX1	118
194	VEGFA	1113

### 用於驗證潛在脫靶位點之靶向定序

【0329】 在諸如上文所用之生物化學方法之已知脫靶偵測分析中，典型地藉由設計來恢復大量潛在脫靶位點以便為可在其他情形下，例如在所關注初級細胞中驗證之潛在位點「廣泛撒網」。舉例而言，當分析利用不含細胞環境之經純化之高分子量基因組DNA且視所使用之Cas9 RNP之劑量而定時，生物化學方法典型地過度展示潛在脫靶位點之數目。因此，藉由此等方法識別之潛在脫靶位點可使用所識別之潛在脫靶位點之靶向定序來驗證。

【0330】 在一種方法中，將所關注之Cas9及sgRNA (例如用於評估之具有潛在脫靶位點之sgRNA)引入至初級T細胞中。接著將T細胞溶解且使用側接潛在脫靶位點之引子產生用於NGS分析之擴增子。某一水準之插入或缺失之鑑別可驗證潛在脫靶位點，然而在潛在脫靶位點所見之插入或缺失之缺乏在所用脫靶分析中可指示為假陽性。

【0331】 用此分析測試顯示目標插入或缺失活性之引導物的潛在脫靶基因組裂解位點。在此實驗中，除具有已知脫靶特徵之對照引導物SEQ

ID NO：194 (VEGFA)以外，使用自混合雄性人類周邊血液單核細胞 (PBMC)純化之基因組DNA篩選靶向人類TRBC1或TRBC2之5種sgRNA及靶向人類TRAC之3種引導物。在生物化學分析中使用64 nM之引導物濃度偵測到之潛在脫靶位點之數目示於圖7B及表12中。

**【0332】** 表12：64 nM脫靶分析

sgRNA之SEQ ID NO:	目標	引導序列(SEQ ID NO:)	脫靶位點計數
179	TRBC1/2	GGCUCUCGGAGAAUGACGAG (SEQ ID NO：1)	190
180	TRBC1/2	GGCCUCGGCGCUGACGAUCU (SEQ ID NO：2)	15
181	TRBC1/2	AUGACGAGUGGACCCAGGAU (SEQ ID NO：3)	92
183	TRBC1/2	UGAGGGUCUCGGCCACCUUC (SEQ ID NO：5)	127
184	TRBC1/2	AGAGAUCUCCCACACCCAAA (SEQ ID NO：6)	90
186	TRAC	CUCUCAGCUGGUACACGGCA (SEQ ID NO：90)	32
192	TRAC	UCAGGGUUCUGGAUAUCUGU (SEQ ID NO：185)	293
206	TRAC	UAGGCAGACAGACUUGUCAC (SEQ ID NO：214)	114
194	VEGFA	參見表3	2945

**【0333】** 實例7：使用TRAC及TRBC引導物進行多次編輯

**【0334】** 亦測試引導物之TRAC及TRBC基因座之同時編輯。使用用於密度梯度離心之Lymphoprep™ (Stem Cell Technology)自白血球層分離來自3個不同健康供者之周邊血液單核細胞(PBMC)。使用Dynabeads™ ClinExVivo™ CD3/CD28 (Invitrogen)遵循製造商說明書活化且分選此等細胞。將T細胞於補充有5% FBS以及IL7及IL15 (各5 ng/ml)之X-VIVO™

15造血性無血清培養基(Lonza™)中以10<sup>6</sup>個細胞/毫升之濃度接種。在刺激之後兩天，如實例3中所述同時用靶向TRAC之crRNA及靶向TRBC之crRNA將T細胞電穿孔。使用來自一個供體之細胞，將TRAC及TRBC引導物獨立電穿孔。在刺激後第6天，將珠粒分離且細胞於補充有5% FBS以及IL7及IL15 (各5 ng/ml)之X-VIVO™ 15中以1百萬/毫升之濃度接種。第7天之TRAC及TRBC基因剔除效率藉由流式細胞測量術評估不具有CD3分子之T細胞之百分比來評定，如圖8A及表13中所示。

**【0335】 表13：TCR阻斷基因表現之效率**

SEQ ID NO:	CD3+		CD3neg		樣品(n)
	平均值%	SD	平均值%	SD	
95	1	N/A	98	N/A	1
6	1	N/A	99	N/A	1
6及95	2	1	98	1	3
模擬	97	1	2	1	3

**由TCR基因之慢病毒插入同時進行TRAC及TRBC編輯。**

**【0336】** 刺激後三天，經編輯T細胞藉由隨機插入編碼來源於健康供體之WT1特異性TCR (HD1-TCR)之慢病毒載體(LV)而用LV轉導。簡言之，TCR  $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈基因在雙向啟動子下分離、密碼子最佳化、半胱胺酸修飾及選殖於LV中。下文給出HD1 TCR  $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈基因之DNA及胺基酸序列。 $\alpha$ 鏈在最小人類CMV啟動子下以反義位向選殖，且 $\beta$ 鏈在PGK啟動子下以正義位向選殖。LV藉由整合酶勝任型第三代構築體封裝且藉由水泡性口炎病毒(VSV)包膜假模式化。T淋巴球用LV感染24小時。隨後，將T細胞在10<sup>6</sup>個細胞/毫升下培養且擴增。在轉導之後兩天，轉導效率藉由確定表現特異性V $\beta$ 基因(TRBV12-3/TRBV12-4)以及特異性抗原決定基肽多聚體(抗原決定基：VLDFAPPGA)之T細胞之百分比來評估。在刺激後第

15天，T細胞表現型藉由細胞螢光分析來評估。圖8B及表14顯示超過45%之T細胞表現CD3分子(平均值 $\pm$  SEM = 45.3  $\pm$  5.7)。藉由量測抗原決定基肽多聚體陽性所評估之WT1特異性CD8<sup>+</sup> T細胞之百分比超過95% (平均值 $\pm$  SEM = 95.3  $\pm$  0.7)，當使用SEQ ID NO 6及95時，藉由量測抗原決定基肽多聚體陽性所評估之WT1特異性CD8<sup>+</sup> T細胞之百分比超過95% (平均值 $\pm$  SEM = 95.3  $\pm$  0.7) (圖8C、表14)。在第15天評估經編輯T細胞之T細胞表現型，如圖8D及表15中所示。

**【0337】 SEQ ID NO : 250 : HD1 TCR  $\alpha$ 鏈 - DNA序列**

**【0338】** ATGGAAACCCTGCTGAAGGTGCTGAGCGGCACACTGCTGTGGCAGCTG  
ACATGGGTCCGATCTCAGCAGCCTGTGCAGTCTCCTCAGGCCGTGATTCTGAGAG  
AAGGCGAGGACGCCGTGATCAACTGCAGCAGCTCTAAGGCCCTGTACAGCGTGC  
ACTGGTACAGACAGAAGCACGGCGAGGCCCTGTGTTCTGATGATCCTGCTGA  
AAGGCGGCGAGCAGAAGGGCCACGAGAAGATCAGCGCCAGCTTCAACGAGAAG  
AAGCAGCAGTCCAGCCTGTACCTGACAGCCAGCCAGCTGAGCTACAGCGGCACC  
TACTTTTGTGGCACCGCCTGGATCAACGACTACAAGCTGTCTTTCGGAGCCGGCA  
CCACAGTGACAGTGCGGGCCAATATTCAGAACCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCT  
GAGAGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTACCGACTTCGACAG  
CCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGATAAGTG  
CGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTC  
CAACAAGAGCGATTTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGA  
GGACACATTCTTCCAAGTCCTGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAA  
GAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTGAGCGTGATCGGCTT  
CAGAATCCTGCTGCTCAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGAGACTG  
TGGTCCAGCTGA

**【0339】 SEQ ID NO : 251 : HD1TCR  $\alpha$ 鏈 - 胺基酸序列**

**【0340】** METLLKVLSTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGEDAVINCSSSKALYS  
VHWYRQKHGEAPVFLMILLKGGEQKGHEKISASFNEKKQQSSLYLTASQLSYSGTYF  
CGTAWINDYKLSFGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV  
SQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPE  
SSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS\*

**【0341】 SEQ ID NO : 252 : HD1 TCR  $\beta$ 鏈 - DNA序列**

【0342】

ATGGGATCTTGGACACTGTGTTGCGTGTCCCTGTGCATCCTGGTGGCCA  
 AGCACACAGATGCCGGCGTGATCCAGTCTCCTAGACACGAAGTGACCGAGATGG  
 GCCAAGAAGTGACCCTGCGCTGCAAGCCTATCAGCGGCCACGATTACCTGTTCTG  
 GTACAGACAGACCATGATGAGAGGCCTGGAAGTCTGATCTACTTCAACAACAA  
 CGTGCCCATCGACGACAGCGGCATGCCCAGGATAGATTACGCGCCAAGATGCC  
 CAACGCCAGCTTCAGCACCCCTGAAGATCCAGCCTAGCGAGCCCAGAGATAGCGC  
 CGTGTACTTCTGCGCCAGCAGAAAGACAGGGCGGCTACAGCAATCAGCCCCAGCA  
 CTTTGGAGATGGCACCCGGCTGAGCATCCTGGAAGATCTGAAGAACGTGTTCCCA  
 CCTGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCCACACACAGAAA  
 GCCACACTCGTGTGTCTGGCCACCGGCTTCTATCCCGATCACGTGGAAGTGTCTT  
 GGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGTACCGATCCTCAGCCTC  
 TGAAAGAGCAGCCCGCTCTGAACGACAGCAGATACTGCCTGAGCAGCAGACTGA  
 GAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCAGAAACCACTTCAGATGCCAGGTGC  
 AGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGGATAGAGCCAAGCCTG  
 TGACACAGATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAG  
 CGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGTCTGTCTGCCACAATCCTGTACGAGATCCTGCTG  
 GGCAAAGCCACTCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCCCTGGTGTCTGATGGCCATGG  
 TCAAGCGGAAGGATAGCAGGGGCTGA

【0343】 SEQ ID NO：253：HD1 TCR β鏈 - 胺基酸序列

【0344】

MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDY  
 LFWYRQTM MRGLELLIYFNNNPIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSA  
 VYFCASRKTGGYSNQPQHFGDGRSLSEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV  
 CLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATF  
 WQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG  
 VLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG\*

【0345】 表14：經編輯T細胞中TCR插入之效率

SEQ ID NO:	CD3+		CD3 neg		CD3+CD8+Dx+		樣品(n)
	平均值%	SD	平均值%	SD	平均值%	SD	
95	62	N/A	39	N/A	68	N/A	1
6	51	N/A	49	N/A	88	N/A	1
6及95	45	10	55	10	95	1	3
模擬	98	1	2	1	0	0	3

【0346】 表15：經TCR編輯T細胞之表現型

SEQ ID NO	N/Tscm		CM		EM		TemRa		樣品(n)
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	
PBMC	44	4	25	5	19	3	12	5	3
模擬	56	12	31	13	9	2	4	2	3
95	93	N/A	4	N/A	0	N/A	2	N/A	1
6	94	N/A	4	N/A	1	N/A	2	N/A	1
6及95	82	8	13	6	3	2	2	0	3

【0347】 測試具有TRAC及TRBC編輯及LV HD1-TCR插入之T細胞的殺死初級AML母細胞之能力。使用抗原決定基肽多聚體染色及磁性分選以磁性方式分選經編輯T細胞以富集WT1-CD8<sup>+</sup>特異性T細胞。轉導之後二十一天，將WT1-CD8<sup>+</sup> T細胞與獲自攜帶HLA-A\*02:01對偶基因之3位不同患者之初級AML母細胞及作為對照之不攜帶特異性HLA等位基因之初級母細胞共同培養。共同培養物以不同效應子:目標比率(1:1；5:1；10:1)接種。在6小時共同培養後，將卡斯蛋白酶3在活目標細胞中之表現用作讀數。結果示於圖9A-D及表16中。觀測到在多達43%之表現WT1且攜帶HLA-A\*02:01之白血病母細胞中誘發細胞凋亡(平均值± SEM = 31 ± 6.6)。偵測到無法識別不表現HLA-A\*02:01對偶基因之AML母細胞。

【0348】 表16：AML殺死

條件	E:F比率	模擬	HD1-TCR+ 平均值%	SD
pAML#14	1:1	5.9	22.1	4.9
	5:1	6.7	36.1	10.9
	10:1	7.5	38.6	11.6
pAML#15	1:1	3.6	15.7	16.9
	5:1	4.4	14.5	6.7
	10:1	5.3	18.1	8.1
pAML#16	1:1	3.1	9.4	3.1
	5:1	3.1	14.7	5.5
	10:1	3.4	16.4	5.6
pAML HLA-A*02:01	1:1	16.2	13.2	1.8
	5:1	13.8	9.8	2.2
	10:1	15.1	12.1	2.5

【0349】 實例8：用於多次編輯之另外TRAC及TRBC引導物

【0350】 亦測試另外crRNA之TRAC及TRBC基因座之同時編輯。T細胞用含有SEQ ID NO：185之RNP、含有SEQ ID NO：6之RNP或兩種RNP物種之混合物核轉染。如實例3中進程序，但其中改用補充有5%

FBS、50  $\mu$ M  $\beta$ -巰基乙醇、10mM N-乙醯基L-胱胺酸、1X青黴素-鏈黴素溶液(Corning，目錄號30-002-CI)且視情況有IL7 (5 ng/ml)、IL15 (5 ng/ml)及IL2 (200-500 U/ml)之BioWhittaker™ X-VIVO™ 15造血性無血清培養基(Lonza™，目錄號04-418Q)。在核轉染之後十七天，收集T細胞且藉由NGS分析。圖10及表17顯示在同時核轉染之後各基因座之編輯(呈插入或缺失頻率)。亦可使用流式細胞測量術藉由量測在其表面上表現TCR蛋白質之T細胞之部分來測試編輯效率。

**【0351】** 表17：用多種引導物編輯

條件	擴增子	平均插入或缺失頻率	標準差
SEQ ID NO：6 及SEQ ID NO：185	TRAC	83.4%	0.3%
	TRBC1	82.2%	0.9%
	TRBC2	77.1%	0.2%
無引導物	TRAC	0.1%	0.1%
	TRBC1	0.4%	0.6%
	TRBC2	1.0%	0.7%

**【0352】** 實例9

**【0353】** 如實例7中所述測試靶向另外一對TRAC及TRBC之crRNA的組合編輯。T細胞用含有SEQ ID NO：95之RNP、含有SEQ ID NO：2之RNP或兩種RNP物種之混合物核轉染。TRAC及TRBC基因剔除效率藉由流式細胞測量術評估不具有CD3分子之T細胞之百分比來評定，如圖11A及表18中所示。

**【0354】** 表18：TCR阻斷基因表現之效率

SEQ ID NO:	CD3+		CD3neg		樣品(n)
	平均值%	SD	平均值%	SD	
95	0.5	N/A	99.5	N/A	1
2	10.2	N/A	89.3	N/A	1
2及95	1.8	1.0	98.1	1.0	3
模擬	96.8	N/A	2.4	N/A	1

【0355】在慢病毒轉導之後，T細胞表現型藉由細胞螢光分析來評估，如圖11B及表19中所示。WT1特異性CD8<sup>+</sup> T細胞之百分比藉由量測抗原決定基肽多聚體陽性來評估(圖11C、表19)。經編輯T細胞之T細胞表現型示於圖11D及表20中。

【0356】表19：經編輯T細胞中TCR轉導之效率

SEQ ID NO:	CD3+		CD3 neg		CD3+CD8+Dx+		樣品(n)
	平均值%	SD	平均值%	SD	平均值%	SD	
模擬	99.6	N/A	0.4	N/A	0	N/A	1
2及95	40.1	5.4	59.9	5.4	93	1	3

【0357】表20：經TCR編輯T細胞之表現型

SEQ ID NO	N/Tscm		CM		EM		TemRa		樣品(n)
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	
PBMC	44	4	25	5	19	3	12	5	3
模擬	86	N/A	10	N/A	1	N/A	3	N/A	1
2及95	89	4	8	3	1	0	3	1	3

【0358】實例7及9之經工程改造之細胞使TRAC gRNA及TRBC gRNA與編碼具有SEQ ID NO:251之TCR  $\alpha$ 鏈及SEQ ID NO:253之TCR  $\beta$ 鏈的WT1特異性TCR之慢病毒載體組合。經工程改造之細胞可藉由遞送第一及第二組合物至細胞來改變，且其中第一組合物包含：(a)包含選自以下之序列的引導RNA：(i)選自SEQ ID NO:1-89之引導序列；(ii)選自SEQ ID NO:1-89之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；(iii)與選自SEQ ID NO:1-89之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；(iv)包含SEQ ID NO:1-24中任一者的引導序列；及(iv)包含SEQ ID NO:1-6中任一者的引導序列；或(b)編碼(a.)之引導RNA之核酸；及視情況(c)經RNA引導之DNA結合劑，或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸；且其中第二組合物包含編碼具有SEQ ID NO:251之TCR  $\alpha$ 鏈及SEQ ID NO:253之TCR  $\beta$ 鏈

的WT1特異性TCR之慢病毒載體。

**【0359】** 在一些實施例中，經工程改造之細胞可藉由遞送組合物來改變，該組合物進一步包含：(a)包含選自以下之序列之引導RNA：(i)選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之引導序列；(ii)選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列之至少17、18、19或20個連續核苷酸；(iii)與選自SEQ ID NO：90-178、185及213-218之序列至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致之引導序列；(iv)包含SEQ ID NO：90-113及213-218中任一者的引導序列；及(iv)包含SEQ ID NO：90-95中任一者的引導序列；或(b)編碼(a.)之引導RNA之核酸。

**【0360】** 實例10. 用單一引導物編輯

**【0361】** 除非實例中另外提及，否則以下實例藉由以下方法進行。

### **基因組DNA分離**

**【0362】** 核轉染後> 48小時收集T細胞。如實例1中所述進行DNA分離。如實例1中所述，對DNA樣品進行PCR及後續NGS分析。

### **將RNP遞送至T細胞**

**【0363】** 健康供體PBMC或leukopak以商業方式獲得且T細胞遵循製造商之方案使用來自微珠套組(Miltenyi Biotec)之筆直CD4/CD8藉由陽性選擇或使用EasySep人類T細胞分離套組(Stem Cell Technology，目錄號17951)藉由陰性選擇來分離。將T細胞極冷保藏於Cryostor CS10冷凍培養基(目錄號07930)中用於將來使用。解凍後，將T細胞靜置於補充有200 U/mL IL2(Peprotech)及各5 ng/ml之IL7及IL15的鹼性培養基(補充有2-巰基乙醇、N-乙醯基-半胱胺酸及5%人類AB血清或FBS之XVIVO15)中隔

夜。T細胞隨後用如製造商所推薦之T Cell TransAct (Miltenyi Biotec, 130-111-160)活化且培養48至72小時，之後進行電穿孔。

**【0364】** 包含Cas9蛋白質及ggRNA之核糖核蛋白(RNP)複合物藉由首先藉由混合等量之試劑且在95°C下培育2分鐘且冷卻至室溫使個別crRNA及trRNA預黏接而產生。RNP中之引導物利用先前藉由在95°C下培育2分鐘之後冷卻至環境溫度而黏接之以單一RNA分子(單導引RNA, sgRNA)或以兩個個別RNA分子(雙引導RNA, dgRNA)形式締合之crRNA及trRNA。靶向TRAC或TRBC基因座之RNP藉由以2:1莫耳比混合SEQ ID NO: 186 (TRAC)或SEQ ID NO: 180 (TRBC1/2)與SpyCas9而複合，達至最終濃度20  $\mu\text{M}$ 之Cas9-RNP。對於電穿孔，T細胞以5至 $20 \times 10^6$ 個細胞/100微升懸浮，且如所示添加TRAC及TRBC RNP至最終濃度2  $\mu\text{M}$ 之RNP。T細胞使用P3初級細胞96孔Nucleofector™套組(Lonza, 目錄號V4SP-3960)或Lonza 4D-核轉染子X單元(目錄號: AAF-1002X)使用Buffer P3及製造商之脈衝代碼用RNP來核轉染。電穿孔後即刻將鹼性培養基添加至細胞中，且使細胞靜置至少4小時。

**【0365】** 對於選擇分析，使用G-Rex方案擴增細胞。簡言之，在電穿孔之後，轉移 $1 \times 10^6$ 個細胞於24孔G-Rex之1個孔中於1 ml細胞介素培養基中，及轉移等於MOI  $3 \times 10^5$ 之病毒至孔中。在24小時之後，使用細胞介素培養基將體積補充至7 ml。每2至3天，在不干擾細胞下移除一半培養基(3.5 ml)，且添加2倍細胞介素培養基。在第11至13天之後收集。

#### 用於流式細胞測量術之細胞染色

**【0366】** 在RNP核轉染之後四至12天，將經編輯T細胞(200微升/200,000個細胞)收集於96孔圓底盤中且在500g下短暫離心5分鐘。接著使

細胞再懸浮於含有靶向CD3、CD4、CD8、CD45RO、CD45RA、CD27、CCR7、CD62L之抗體及/或TCR特異性pMHC四聚體或TCR特異性V $\beta$ 鏈抗體之組合的抗體混合物中。在室溫下在黑暗中培育混合物45分鐘。將樣品在500g下短暫離心5分鐘，收集細胞集結粒，且再懸浮於FACS緩衝液中之1:10,000 DAPI (Biolegend - #422801)中。接著使用cytoflex根據製造商之說明書進行流式細胞測量術。

【0367】亦測試經刺激T細胞中單一引導物之TRAC及TRBC基因座之個別及同時編輯。T細胞用2:1之引導物:Cas9比率之靶向TRBC1及TRBC2基因座之含有引導SEQ ID NO: 180之RNP、靶向TRAC之含有引導SEQ ID NO: 186之RNP或兩種RNP物種之混合物核轉染。電穿孔後兩天，使T細胞傳代且收集溶胞物。

【0368】如實例1中所述製備基因組DNA且進行NGS分析。一式三份測試樣品及單份模擬樣品。用於個別及同時編輯TRAC及TRBC引導物之TCR表面表現之阻斷效率藉由流式細胞測量術以存在或不存在CD3為目標來評定。不具有CD3分子之T細胞百分比示於表21及圖12A中。

【0369】表21：群體中之經編輯CD3-細胞

樣品	平均CD3-%	SD	n
TRAC RNP	98.47	0.06	3
TRBC RNP	91.20	0.17	3
TRAC/TRBC RNP	95.83	5.05	3

【0370】

【0371】在CD3<sup>-</sup> T細胞中TRAC及TRBC之個別及組合編輯之後藉由NGS分析評定插入或缺失頻率。TRAC及TRBC之引導物編輯百分比示於表22及圖12B中。

【0372】表22：在T細胞中之TRAC引導物編輯

SEQ ID NO :	TRAC 平均插入或缺失%	TRAC SD	TRBC1 平均插入或缺失%	TRBC1 SD	TRBC2 平均插入或缺失%	TRBC2 SD	N
TRAC KO	90	1.2	0.4	0	0.2	0.1	3
TRBC KO	0.2	0.1	85.4	3.2	91.2	1.5	3
TRAC KO + TRBC KO	81.8	4.7	78.2	4.4	83.6	2.7	3
模擬	0.2	-	0.2	-	0.1	-	1

**【0373】** 實例11. TRAC引導物插入篩選

**【0374】** 將AAV模板插入至T細胞中

**【0375】** 使用靶向TRAC基因座之12種引導物之位置設計腺病毒相關病毒(AAV)模板，該模板缺失TRAC基因座之80 bp區以防止修復後之位點切割且防止引導物/Cas9切割模板。由此將產生可將TCR插入至TRAC基因座中之基因座。使用具有80bp缺失之同源臂，構築體經設計以插入模型TCR且第二構築體經設計以插入GFP，兩者皆由EF1a啟動子驅動，接著藉由GenScript USA Inc.合成且插入至具有用於次選殖至AAV載體中之BglII限制位點之pUC19載體中。AAV模板設計成具有側接TRAC引導物切割位點之同源臂以在T細胞中位點特異性插入編碼TCR或報導分子(亦即GFP)之基因。

**【0376】** 如實例10中所述進行T細胞分離及RNP核轉染程序。電穿孔後十分鐘，將T細胞以 $1 \times 10^6$ 個細胞/毫升添加至細胞介素培養基，且添加MOI為 $3 \times 10^5$ 之AAV模板。電穿孔後二十四小時，將細胞分開且在用於功能分析之前於靜態培養物或G-REX多孔盤(Wilson Wolf Manufacturing)中再擴增4至12天，或極冷保藏。進行流式細胞測量術。

**TRAC引導物插入篩選**

**【0377】** 在T細胞中篩選靶向TRAC基因座之外顯子1之雙引導物以

評估插入效率。最初篩選使用編碼GFP報導基因AV9之基於AAV之插入模板(AV9)，其設計成具有80 bp間隙，該間隙經設計以涵蓋表23中所列舉之引導物之靶點。AV9描述於以下表37中。T細胞用含有雙引導物之RNP重複兩次核轉染，但其中僅AAV且無RNP(模擬)樣品用作對照。用RNP進行細胞轉導之程序如實例10中所述進行，但其中引導物:Cas9比率改為1:1。TRAC引導物之插入效率藉由如實例10中所述之流式細胞測量術偵測插入之構築體的GFP之螢光來測定，如表23及圖13A中所示。用於TRAC引導物編輯之TCR表面表現之阻斷效率藉由流式細胞測量術以存在或不存在CD3為目標來評定。不具有CD3分子之T細胞百分比示於表23及圖13B中。

【0378】 表23. 插入之引導物之GFP表現百分比

引導物	GFP %	GFP % SD	CD3- 細胞% (n=1)
96	6.44	0.28	4.96
213	8.22	0.06	19.8
90	43.9	1.41	98.9
97	20.05	3.61	58.1
95	22.65	2.9	99.2
98	19.1	1.98	26.8
214	36.05	1.63	61.5
185	32.05	3.32	85.7
215	31	0.28	17.9
216	30.4	8.2	13.1
217	39.4	0.14	31.6
218	26.55	0.07	52.5
模擬	0	0	0.45
僅AAV	4.52	0.72	NA

【0379】 實例12. 用於TRAC插入之單引導物篩選

【0380】 接著在T細胞中篩選靶向TRAC基因座之外顯子1之單引導物以使用AV9評估插入效率。用於T細胞製備及RNP轉導之程序如實例10

中所述重複兩次進行，但其中引導物:Cas9比率改為1:1。AV9如實例11中所述用表24中所列舉之引導物設計。如實例1中所述進行NGS插入或缺失分析。

**【0381】** TRAC引導物之插入效率藉由流式細胞測量術偵測插入之構築體的GFP之螢光來測定，如表24及圖14A中所示。藉由TRAC引導物之TCR表面表現之基因剔除效率藉由流式細胞測量術以存在或不存在CD3為目標來評定。不具有CD3分子之T細胞百分比示於表24及圖14B中。亦分析經化學修飾及未經修飾之引導物之編輯效率且發現具有活性。

**【0382】** 表24. GFP陽性細胞之百分比

引導物	GFP% (平均值)	GFP% SD	CD3-細胞%	CD3- 細胞% SD
201	45.65	0.78	88.85	0.21
202	40.65	2.05	89.10	0.42
203	53.05	0.21	96.15	0.21
204	51.95	2.33	95.70	0.71
191	37.15	1.34	95.95	0.21
205	66.35	3.46	93.50	0.71
206	73.15	1.34	93.25	0.78
211	53.75	0.21	92.55	0.21
207	48.45	1.34	62.25	0.64
208	57.35	1.06	71.50	0.14
209	55.00	2.97	72.15	1.91
210	53.15	2.05	93.70	0.28
186	36.15	0.35	85.50	0.57
模擬	1.88	0.41	0.63	0.01
僅AAV	0.00	0.00	1.71	0.78

**【0383】** 實例13 - 評定用於外源TCR插入及表現之啟動子及ITR用於功能分析之基因編輯TCR-T細胞之工程改造

**【0384】** 在多種啟動子及兩種ITR長度下測試TCR插入及後續表面表現。T細胞分離及用引導SEQ ID NO：185進行RNP轉染如實例10中所

述進行，但其中改用1:1莫耳比之gRNA:SpyCas9。含有TCR-C之AAV構築體向T細胞中之RNP轉導如實例11中所述進行。AAV模板含有與側接TRAC基因座中SEQ ID NO: 185切割位點之各側的500 bp對應之500 bp同源臂。各AAV構築體之特徵為啟動子及ITR之不同組合，如表25中所示。經編輯T細胞為染色用於流動式細胞測量術分析之四聚體，如實例11中所述。

**【0385】** TCR-C插入效率藉由細胞螢光分析經由細胞表面上CD3<sup>+</sup>之存在評定T細胞身分與經由TCR特異性配位體之四聚體(RMF肽)評定表現所插入TCR之細胞的數目來評估(參見例如US20160083449A1，其內容以引用的方式併入本文中)。CD3<sup>+</sup> 四聚體 + 細胞之百分比示於表25及圖15A中。四聚體染色之T細胞之平均螢光強度(MFI)示於表25及圖15B中。

**【0386】** 表25. 用於AAV模板之啟動子及ITR

此表中所示之序列要素及序列進一步定義於表37中。

AAV模板ID	啟動子	ITR長度 (bp)	四聚體 + CD3+% (平均值)	SD	CD3+螢光強度(平均值)	SD	n
AV2	Efla - 短	145	0.48	0.48	52752	34002	2
AV3	MND-1	141	15.85	1.48	77704	646	2
AV6	MND-1	145	18.55	0.49	67845	4084	2
AV4	MND-2	141	17.10	0.57	116978	6798	2
AV8	MND-2	145	14.55	2.62	65281	3117	2
AV5	PGK	135	2.35	0.03	23410	437	2
AV7	PGK	146	9.01	0.57	12596	78	2
AV1	EF1a	146	37	-	117223	-	1

實例14：使用內源性TRAC啟動子之經工程改造之T細胞中之GFP表現

**【0387】** 在另一實驗中，將依序含有P2A核糖體跨越位點、GFP報導基因(亦即無外源性啟動子)之AAV模板(AV10)插入至TRAC基因座之外顯子1中以判定內源性TRAC啟動子是否可驅動GFP表現。如實例10中所

述T細胞用含有引導SEQ ID NO：186之RNP核轉染且用AAV AV10轉導。對照條件包括未經編輯之T細胞(模擬)及接受RNP核轉染但無AAV之T細胞(僅RNP)。在培養4天之後，經編輯T細胞用用於CD3之結合APC-Cy7之抗CD3e (Biolegend, 300318)共染色，且藉由流式細胞測量術分析GFP表現及TCR基因剔除，如表26及圖16A-C中所示。

表26 群體中經編輯CD3-及GFP陽性細胞之百分比.

樣品	%CD3-	SD	%GFP+	SD
AV10-GFP + RNP	97.5	0.05	76.4	1.9
僅RNP	86.7	2.05	1.1	0.0
模擬品	0.8	0.04	0.0	0.0

實例15：使用內源性及外源性TRAC啟動子之經工程改造之T細胞中之TCR表現

【0388】 在另一實驗中，將含有TCR-A、TCR-CP或TCR-D且有或無外源性啟動子之AAV模板插入至TRAC基因座中以判定內源性TRAC啟動子是否可驅動插入之TCR表現及起作用。T細胞轉染及AAV插入分別如實例10及11中所述重複兩次進行。T細胞用含有TRAC (SEQ ID NO：186)及TRBC (引導SEQ ID NO：180)之RNP核轉染，其中含有引導物之RNP含有表27中所示之多種AAV模板。表現插入之TCR的T細胞藉由流式細胞測量術使用對CD4+及CD8+細胞中插入之TCR之TCR Vβ鏈具有特異性之抗體來偵測，如表27及圖17A-C中所示(用於TCR-A之抗Vβ8，[Biolegend目錄號140104]、圖17B中之用於TCR-D之Vβ7.2[Beckman Coulter，目錄號IM3604]及圖17C中所示之用於TCR-C之Vβ17[Beckman Coulter，目錄號IM2048])。

【0389】 表27. 有及無外源性啟動子存在下經工程改造之TCR之表面表現

AAV模板	TCR	啟動子	% CD4+ CD3+ Vb+ (平均值)	SD	% CD8+ CD3+ Vb+ (平均值)	SD
AV21	TCR-A	內源性(PL)	67.05	0.49	66.50	1.27
AV11	TCR-A	EF1a	65.45	0.49	66.05	1.20
AV20	TCR-D	內源性(PL)	69.85	0.07	70.25	0.64
AV18	TCR-D	EF1a	44.60	0.00	47.00	0.00
AV19	TCR-C	內源性(PL)	50.45	0.35	46.40	0.99
AV12	TCR-C	EF1a	60.20	0.71	54.70	0.85

\*PL - 無啟動子模板構築體

此表中所示之序列要素及序列進一步定義於表37中。

**【0390】** 進行響應於特異性WT1肽抗原之T細胞脫粒及細胞介素釋放以測試自內源性啟動子或外源性TRAC啟動子表現之經工程改造之效應T細胞之官能度。特定言之，評定經工程改造之T細胞與來自癌細胞株OCI-AML3之肽脈衝式細胞(DSMZ，目錄號ACC 582)共同培養後之CD107a之上調及IL2及IFN $\gamma$ 之表現。簡言之，100,000個OCI-AML3細胞在37度下在具有0至5000 nM範圍內之滴定量之9聚體肽VLDFAPPGA (VLD)或RMFPNAPYL (RMF)肽濃度的鹼性培養基(Xvivo鹼性培養基：無細胞介素 + 1  $\mu$ L/mL GolgiPlug + 0.7  $\mu$ L/mL GolgiStop及30  $\mu$ L/mL CD107a APC/Cy7 (3微升/孔))中脈衝處理4至5小時。經基因編輯之TCR+ T細胞以 $1 \times 10^6$ 個插入TCR之細胞/毫升懸浮於含有最終濃度30  $\mu$ l /mL CD107a APC/Cyanine7抗體(Biolegend)、1  $\mu$ l/ml Golgiplug (BD)及0.7  $\mu$ l/ml Golgistop (BD)之XVIVO15鹼性培養基中，且以1:1之效應細胞:目標細胞(E:T)比率添加至肽脈衝式細胞中。在37°C下培育共同培養物隔夜，且細胞針對表面標記物CD3、CD4、CD8及TCR-A或TCR-D之特異性TCR $\beta$ 鏈染色，且培育30分鐘。在表面染色之後，對於細胞內IFN- $\beta$ 及TNF $\alpha$ 染色，使用市售套組(Invitrogen)使細胞固定且滲透，之後在室溫下

培育30分鐘。在細胞內染色之後，將細胞洗滌且藉由流式細胞測量術進行分析。

【0391】 EF1a (或EF-1 $\alpha$ )及內源性啟動子對T細胞殺死及細胞介素釋放之作用藉由對於各樣品中所存在之CD107a、IFN $\gamma$ 及或TNF $\alpha$ 呈陽性之細胞的百分比來量測。具有TCR及啟動子類型之效應T細胞列於表28中。TCR+ T細胞之流式細胞測量術結果示於表28中且表現TCR-A之細胞的劑量反應曲線示於圖18A (AV21及AV11)中。表現TCR-D之CD107a+細胞之百分比示於表28及圖18B (AV20及AV18)中。由T細胞誘發之免疫反應藉由量測TNF- $\alpha$ 及干擾素 $\gamma$ 之百分比來評估，如表28及圖19A-B中所示。

表28. 有及無外源性啟動子存在下表現TCR之經工程改造之T細胞中之脫粒及干擾素 $\gamma$ 反應

構築體	TCR	啟動子	肽濃度	%CD107a+	SD	%TNF $\alpha$ + IFN $\gamma$ +	SD
AV21	TCR-A	內源性	0 nM	3.79	0.49	0.08	0.02
			0.5 nM	40.55	0.35	9.66	1.34
			5 nM	88.70	0.42	22.75	1.34
			50 nM	97.55	0.07	29.10	0.00
			500 nM	98.55	0.07	38.55	1.34
			5000 nM	98.65	0.35	32.80	1.56
			5000 nM RMF	11.50	0.71	1.60	0.57
AV11	TCR-A	EF1a	0 nM	3.83	0.33	0.02	0.03
			0.5 nM	42.85	0.07	4.92	0.40
			5 nM	90.15	0.78	17.20	0.85
			50 nM	97.65	0.21	28.90	0.28
			500 nM	98.15	0.07	37.15	2.19
			5000 nM	98.60	0.00	34.35	0.35
			5000 nM RMF	11.45	0.21	0.83	0.11
AV20	TCR-D	內源性	0 nM	1.73	0.18	0.05	0.04
			0.5 nM	2.16	0.19	0.21	0.08
			5 nM	11.95	0.21	3.40	0.23

構築體	TCR	啟動子	肽濃度	%CD107a+	SD	%TNFa+ IFNg+	SD
			50 nM	53.30	0.85	11.35	0.07
			500 nM	87.15	0.64	21.05	1.91
			5000 nM	92.30	0.28	26.20	0.85
			5000 nM RMF	1.82	0.13	0.01	0.01
AV18	TCR-D	EF1a	0 nM	2.56	0.11	0.01	0.02
			0.5 nM	3.52	0.45	0.12	0.08
			5 nM	12.70	1.98	2.12	0.00
			50 nM	53.25	4.60	10.58	1.87
			500 nM	85.10	2.40	17.25	1.34
			5000 nM	91.35	1.63	19.15	2.62
			5000 nM RMF	2.86	0.25	0.05	0.01

此表中所示之序列要素及序列進一步定義於表37中。

實例16：藉由基因剔除內源性T細胞受體 $\alpha$ 鏈與 $\beta$ 鏈增加TCR表現

**【0392】** 評估T細胞之包含插入之 $\alpha$ 鏈與插入之 $\beta$ 鏈的經工程改造之TCR-A、TCR-B或TCR-D之表面表現。測試增加插入之 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈配對之三個條件：(1)添加可形成半胱胺酸橋鍵以締合插入之 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈的半胱胺酸殘基，(2)自內源性TRAC啟動子或自外源性啟動子表現及(3)破壞TRAC、TRBC1及TRBC2 TRAC內源性複本。T細胞轉染及AAV轉導如實例10中所述進行。如上文所述，用僅靶向TRAC基因座之RNP或靶向TRAC、TRBC1與TRBC2基因座之RNP經由AAV模板、AV11、AV13、AV18或AV20插入TCR。轉染後，T細胞如實例10中所述擴增。細胞擴增後九天，經編輯T細胞用抗CD3e及適當V- $\beta$ 試劑(PE)共染色以經由流式細胞測量術鑑別經工程改造之TCR。各條件之TCR-A及TCR-B CD3+Vb7.2+細胞之百分比示於表29中。圖20A及20B針對表29中之資料繪製經工程改造之TCR-A及TCR-B CD3+Vb7.2+細胞之表面表現之代表性實例。亦量測CD8+及CD4+細胞群體中經工程改造之TCR-A及TCR-B之表

面表現，如表29及圖21C中所示。

【0393】 表29. 評定包含插入之 $\alpha$ 鏈與 $\beta$ 鏈的經工程改造之TCR-A及TCR-B之表現

樣品	RNP	CD8+				CD4+			
		平均 CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD	平均 CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD
AV13- TCR-B (有 cys)	TRAC	62.2	1.56	8487	290	68.85	0.64	8947	291
	TRAC + TRBC	69.05	2.05	20709	443.3 6	75.35	2.05	24521	492
AV11- TCR-A (無 cys)	TRAC	60.8	nd	12520	nd	69.3	nd	13782	nd
	TRAC + TRBC	67.55	0.21	40104	2203	74.75	0.50	49273	1743

【0394】 使用內源性或外源性啟動子之AV20-TCR-D及AV18-TCR-D CD3+ Vb7.2+細胞之百分比示於表30中。如表30及圖21A-D中所示量測CD8+及CD4+細胞群體中經工程改造之TCR-D之表面表現。

【0395】 表30 評定包含插入之 $\alpha$ 鏈與 $\beta$ 鏈的經工程改造之TCR-D之表現

樣品	RNP	CD8+				CD4+			
		CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD	CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD
AV18-TCR-D	TRAC	41.3	nd	13586	nd	58.6	nd	22324	nd
	TRAC + TRBC	71.4	1.6	58469	12479	74.05	1.15	85360	18034
AV20-TCR-E	TRAC	40.4	nd	25613	nd	62.1	nd	13406	nd
	TRAC + TRBC	83.5	0.3	44342	11035	84.1	0.3	71007	18790

【0396】 實例17：TRBC基因剔除對來自另外TCR之 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈配對之影響。

【0397】 用另外經工程改造之TCR評估T細胞之內源性 $\beta$ 鏈對插入之 $\alpha$ 鏈與插入之 $\beta$ 鏈配對之影響。如本文所述進行實驗，但其中改用四聚體染

色量測MFI，且改用表31中之AAV插入物用於轉導。細胞擴增後九天，經編輯T細胞用VLD-四聚體(一種Vβ染色之正交方法)共染色以如表31中所示藉由流式細胞測量術鑑別具有TCR表面表現之細胞，且來自代表性實驗之資料示於圖22、23及24中。平均螢光強度(MFI)亦藉由流式細胞測量術測定，如表31及圖25及26所示。

**【0398】** 表31. 經工程改造之T細胞中之表面TCR表現

樣品	RNP	CD8+				CD4+			
		平均四聚物+%	SD	平均四聚體MFI	SD	平均四聚物+%	SD	平均四聚體MFI	SD
AV11-TCR-A	TRAC	12.65	0.6	21853.5	12	7.6	0.4	10064.5	634
	TRAC + TRBC	51.2	3.9	23697	1605	48	2.5	11332	387
AV14-TCR-F	TRAC	61.05	6.2	50097	3828	78.9	0.8	67332.5	1379
	TRAC + TRBC	76.6	0.3	171770	7974.	81.8	2.3	231348	8432
AV15-TCR-G	TRAC	73.6	0.3	101676	2594	77.55	0.77	101366	4317
	TRAC + TRBC	81.9	0.1	190002	3919	85.35	2.05	251084	1569
AV16-TCR-H	TRAC	68.85	1.8	75226.5	1704	71.65	1.8	64255	3921
	TRAC + TRBC	77.1	3.8	138847	1916	80.25	3.5	131127	5313
僅RNP	TRAC	0.0555	0.05	n.a	n.a	0.112	0.04	n.a	n.a
	TRAC + TRBC	0.052	0.02	n.a	n.a	0.107	0.06	n.a	n.a

**【0399】** 實例18 - 經工程改造之T細胞細胞毒性及細胞介素釋放

**【0400】** 分別經由量測目標細胞中之細胞凋亡及量測釋放至生長培養基中之細胞介素來分析經工程改造之T細胞的細胞毒性及細胞介素反應。如本文所述使用表32中所述之AAV模板序列用僅靶向TRAC基因座之RNP或靶向TRAC與TRBC基因座之RNP對T細胞工程改造。如實例15中所述將HLA-02.01陽性T2細胞株目標細胞脈衝處理且與經編輯T細胞共同培養，但其中TCR+T細胞之細胞比率為2.5:1之E:T。將卡斯蛋白酶3/7紅

試劑(Essen Bioscience)以2  $\mu$ M之最終濃度添加至各孔中。在6小時之後使用Incucyte活細胞分析系統(Essen Bioscience)及Incucyte S3分析軟體(2018B版)定量來自卡斯蛋白酶3/7細胞凋亡細胞之紅色螢光。在24小時之後，收集來自各孔之上清液且藉由ELISA使用Duoset ELISA套組(R&D Systems)遵循製造商之方案定量IL2及IFN- $\gamma$ 細胞介素釋放。平均卡斯蛋白酶3/7整合強度示於表32及33及圖27A-C及28A-D中。細胞介素釋放示於表34AD及圖29A-G及30A-D中。

【0401】 表32 - 細胞毒性

樣品	肽(nM)	TRAC/TRBC		僅TRAC	
		平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD	平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD
AV11-TCR-A	0nM VLD	92,634	7,107	132,075	37,266
	0.005nM VLD	116,733	25,315	141,590	71,782
	0.05nM VLD	227,475	69,325	135,336	36,246
	0.5nM VLD	729,355	193,569	345,431	43,799
	5nM VLD	1,017,766	174,286	629,094	151,367
	50nM VLD	897,413	122,632	762,373	59,142
	500nM VLD	885,460	225,388	741,203	77,370
	500nM RMF	98,877	12,254	121,279	7,212
AV13-TCR-B	0nM VLD	97,684	21,060	93,536	19,338
	0.005nM VLD	126,983	7,518	88,855	42,431
	0.05nM VLD	174,492	11,465	119,259	14,122
	0.5nM VLD	388,825	71,913	180,269	23,378
	5nM VLD	835,068	86,910	382,323	94,136
	50nM VLD	922,968	49,804	724,521	280,318
	500nM VLD	876,706	57,316	748,140	249,718
	500nM RMF	78,919	21,138	81,044	8,512
AV12-TCR-C	0 nM RMF	279,375	93,562	276,204	65,787
	0.05 nM RMF	238,879	17,971	360,532	63,189
	0.5nM RMF	639,925	37,882	560,793	134,482
	5nM RMF	1,446,931	341,193	1,463,030	193,719
	50nM RMF	1,864,716	569,777	2,020,037	65,722

樣品	肽(nM)	TRAC/TRBC		僅TRAC	
		平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD	平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD
	500nM RMF	1,519,652	256,405	2,168,849	391,750
	500nM VLD	218,526	35,777	330,230	34,681

表33 - 細胞毒性

樣品	肽(nM)	TRAC / TRBC		僅TRAC	
		平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD	平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD
AV11-TCR-A	0 nM VLD	381,416	143,786	9,042	413
	0.005 nM VLD	374,092	69,482	9,184	1,881
	0.05 nM VLD	1,134,226	154,362	16,907	5,212
	0.5 nM VLD	1,173,265	110,362	38,844	19,238
	5 nM VLD	1,325,404	313,592	137,374	35,354
	50 nM VLD	1,197,360	92,955	207,010	81,220
	500 nM VLD	1,571,735	526,514	233,358	55,713
	500 nM RMF	280,465	54,951	7,342	1,113
AV14-TCR-F	0 nM VLD	21,702	8,974	18,238	3,665
	0.005 nM VLD	17,809	2,730	24,480	7,844
	0.05 nM VLD	25,664	9,946	31,096	6,502
	0.5 nM VLD	528,157	163,446	346,541	71,382
	5 nM VLD	1,297,535	240,491	930,724	169,903
	50 nM VLD	1,150,859	143,371	1,198,605	138,751
	500 nM VLD	1,228,755	146,056	845,589	119,495
	500 nM RMF	8,578	1,615	9,659	2,534
AV15-TCR-G	0 nM VLD	12,408	4,254	12,182	2,841
	0.005 nM VLD	20,974	7,838	21,046	12,983
	0.05 nM VLD	310,566	130,784	199,014	55,935
	0.5 nM VLD	963,870	113,005	1,007,001	378,833
	5 nM VLD	1,255,083	289,237	1,143,162	399,176
	50 nM VLD	1,037,328	87,408	1,276,265	379,466
	500 nM VLD	1,187,161	202,415	1,305,422	104,837
	500 nM RMF	6,795	1,439	4,949	1,238
AV16-TCR-H	0 nM VLD	7,388	1,738	6,560	1,298
	0.005 nM VLD	9,815	1,987	7,651	4,159
	0.05 nM VLD	32,360	3,457	23,556	6,335

樣品	肽(nM)	TRAC / TRBC		僅TRAC	
		平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD	平均卡斯蛋白酶3/7整合強度	SD
	0.5 nM VLD	627,805	91,413	549,651	126,913
	5 nM VLD	983,752	124,769	991,625	147,487
	50 nM VLD	1,080,676	152,098	1,082,346	86,963
	500 nM VLD	1,181,699	122,175	1,180,497	276,768
	500 nM RMF	3,889	3,101	4,189	944

表34A - IL2細胞介素釋放

構築體	肽(nM)	IL2 TRAC/TRBC			IL2 僅TRAC		
		平均值 (pg/ml)	SD (pg/ml)	N	平均值 (pg/ml)	SD (pg/ml)	N
AV11-TCR-A	0nM VLD	46	3	3	1,715	119	3
	0.005nM VLD	34	3	3	1,490	79	3
	0.05nM VLD	52	19	3	1,436	18	3
	0.5nM VLD	50	10	3	1,186	170	3
	5nM VLD	506	29	3	1,713	264	3
	50nM VLD	1,902	104	3	3,554	223	3
	500nM VLD	4,804	345	3	5,003	112	3
	500nM RMF	46	3	3	1,615	194	3
AV13-TCR-B	0nM VLD	46	3	3	1,109	181	3
	0.005nM VLD	42	2	3	1,048	60	3
	0.05nM VLD	39	5	3	913	44	3
	0.5nM VLD	55	10	3	868	73	3
	5nM VLD	248	17	3	976	66	3
	50nM VLD	1,095	90	3	2,160	240	3
	500nM VLD	3,363	303	3	3,547	121	3
	500nM RMF	51	18	3	1,011	64	3
AV12-TCR-C	0 nM RMF	n.d.	n.d.	n.d.	498	49	3
	0.05 nM RMF	398	210	3	511	40	3
	0.5nM RMF	320	15	2	481	42	3
	5nM RMF	182	17	3	333	19	3
	50nM RMF	392	56	3	396	79	3
	500nM RMF	3,193	165	3	2,386	207	3
	500nM VLD	7,776	539	3	7,830	557	3
	0nM VLD	378	113	3	415	66	3

表34B - 干擾素 $\gamma$ 釋放

構築體	肽(nM)	TRAC/TRBC			僅TRAC		
		平均值 (pg/ml)	SD (pg/ml)	N	平均值 (pg/ml)	SD (pg/ml)	N
AV11-TCR-A	0nM VLD	<LLOD*	<LLOD	3	1,313	446	3
	0.005nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	904	243	3
	0.05nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	731	68	3
	0.5nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	1,442	148	3
	5nM VLD	7,361	399	3	4,323	332	3
	50nM VLD	15,845	1,783	3	9,221	381	3
	500nM VLD	25,242	3,021	3	11,558	407	3
	500nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	1,656	115	3
AV13-TCR-B	0nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	406	75	3
	0.005nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	265	36	3
	0.05nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	981	896	3
	0.5nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	471	140	3
	5nM VLD	4,643	154	3	1,865	183	3
	50nM VLD	11,273	643	3	3,645	184	3
	500nM VLD	19,868	1,925	3	6,476	434	3
	500nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	648	199	3
AV12-TCR-C	0 nM RMF	n.d.	n.d.	n.d.	1,243	92	3
	0.05 nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	839	144	3
	0.5nM RMF	<LLOD	<LLOD	2	1,151	93	3
	5nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	1,181	96	3
	50nM RMF	4,643	154	3	2,434	26	3
	500nM RMF	11,273	643	3	5,302	723	3
	500nM VLD	19,868	1,925	3	16,247	192	3
	0nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	1,058	93	3

\* LLOD指示讀數低於所用特定分析中之偵測水準。

表34C - IL2細胞介素釋放

TCR	肽(nM)	TRAC/TRBC			僅TRAC		
		平均值 (pg/ml)	SD (pg/ml)	N	平均值 (pg/ml)	SD (pg/ml)	N
AV11-TCR-A	0 nM VLD	314	46	3	2,259	156	3
	0.005 nM VLD	304	42	3	2,247	122	3
	0.05 nM VLD	227	29	3	2,046	188	3

	0.5 nM VLD	200	63	3	2,007	73	3
	5 nM VLD	494	15	3	4,266	96	3
	50 nM VLD	1,182	157	3	7,062	283	3
	500 nM VLD	1,511	141	3	8,375	385	3
	500 nM RMF	81	19	3	2,135	245	3
AV16-TCR-H	0 nM VLD	17	21	2	102	9	2
	0.005 nM VLD	15	0	1	44	27	3
	0.05 nM VLD	40	0	1	2	0	1
	0.5 nM VLD	17	17	2	23	11	3
	5 nM VLD	30	6	2	175	79	2
	50 nM VLD	286	8	2	111	32	3
	500 nM VLD	455	90	3	387	17	3
	500 nM RMF	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
AV15-TCR-G	0 nM VLD	306	144	3	338	28	3
	0.005 nM VLD	196	40	3	326	49	3
	0.05 nM VLD	198	42	3	284	14	3
	0.5 nM VLD	248	72	3	305	26	3
	5 nM VLD	351	27	3	442	21	3
	50 nM VLD	764	47	3	1,053	89	3
	500 nM VLD	1,203	111	3	1,566	112	3
	500 nM RMF	157	29	3	242	10	3
AV14-TCR-F	0 nM VLD	283	16	3	295	55	3
	0.005 nM VLD	303	84	3	316	24	3
	0.05 nM VLD	274	46	3	361	25	3
	0.5 nM VLD	836	103	3	724	129	3
	5 nM VLD	1,406	69	3	1,634	51	3
	50 nM VLD	3,755	180	3	3,850	116	3
	500 nM VLD	4,301	57	3	4,289	459	3
	500 nM RMF	117	53	3	190	19	2

表34D - 干擾素 $\gamma$ 釋放

TCR	肽(nM)	TRAC/TRBC			僅TRAC		
		平均值	SD	N	平均值	SD	N
AV11-TCR-A	0 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	3,491	108	3
	0.005 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	4,489	444	3
	0.05 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	5,126	262	3
	0.5 nM VLD	1,257	23	3	8,284	1,195	3
	5 nM VLD	21,739	653	3	16,572	1,237	3

	50 nM VLD	40,200	2,121	3	28,080	1,871	3
	500 nM VLD	47,628	1,520	3	31,541	3,672	3
	500 nM RMF	0	0	3	3,590	389	3
AV16-TCR-H	0 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.005 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.05 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.5 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	5 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	50 nM VLD	16,058	422	3	15,923	427	3
	500 nM VLD	24,426	61	3	24,319	849	3
	500 nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
AV15-TCR-G	0 nM VLD	219	15	3	260	33	3
	0.005 nM VLD	219	56	3	429	196	3
	0.05 nM VLD	549	102	3	854	54	3
	0.5 nM VLD	1,850	258	3	2,265	391	3
	5 nM VLD	7,034	497	3	6,424	616	3
	50 nM VLD	23,558	1,135	3	23,733	1,748	3
	500 nM VLD	31,629	1,790	3	27,473	663	3
	500 nM RMF	235	33	3	416	199	3
AV14-TCR-F	0 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.005 nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.05 nM VLD	4,088	1,334	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.5 nM VLD	12,141	321	3	10,419	934	3
	5 nM VLD	26,510	1,161	3	25,934	611	3
	50 nM VLD	42,858	1,197	3	40,326	2,516	3
	500 nM VLD	50,607	2,350	3	51,106	2,385	3
	500 nM RMF	1,230	938	3	<LLOD	<LLOD	3

【0402】 實例19：如藉由CD107a脫粒及細胞內細胞介素染色(ICS)所分析之經工程改造之T細胞細胞毒性

【0403】 亦經由分別量測CD107a及細胞內細胞介素染色來評定經工程改造之T細胞之細胞毒性及細胞介素反應。如實例18中所述使用表35中所述之AAV模板序列用僅靶向TRAC基因座或靶向TRAC與TRBC基因座之RNP對T細胞工程改造。HLA-02.01陽性T2細胞株如實例18中所述脈

衝處理，但其中改將經編輯TCR+T細胞以1:1之E:T細胞比率添加至肽脈衝目標細胞中。在37°C下培育共同培養物隔夜，且細胞針對表面標記物CD3、CD4、CD8及特異性TCR $\beta$ 鏈或四聚體染色。在表面染色之後，對於細胞內IFN- $\gamma$ 及TNF $\alpha$ 染色，使用市售套組(Invitrogen)使細胞固定且滲透。誘發TCR表現之免疫反應示於表35A及圖31A-B中。有及無TRBC基因剔除下由表現之TCR產生之細胞毒性藉由量測經工程改造之T細胞中之CD107a來評估，如表35B及圖32A-B中所示。

表35A. 細胞內細胞介素染色

樣品名稱	VLD肽 (nM)	CD8+TNFa+ IFNg+			CD4+TNFa+ IFNg+		
		平均細胞 %	SD	N	平均細胞 %	SD	N
AV11-TCR-A TRAC/TRBC	0	9.4	0.2	2	1.1	0.5	2
	0.005	21.0	0.1	2	1.6	0.5	2
	0.05	53.0	0.4	2	1.2	0.1	2
	0.5	74.3	1.3	2	1.8	0.4	2
	5	79.8	0.1	2	11.1	0.7	2
	50	81.3	1.0	2	25.1	2.0	2
	50 RMF	10.0	0.3	2	1.6	0.1	2
AV14-TCR-F 僅TRAC	0	0.8	0.0	2	2.0	0.0	2
	0.005	1.0	0.2	2	1.9	0.0	2
	0.05	6.4	0.6	2	1.9	0.6	2
	0.5	44.1	1.5	2	1.3	0.1	2
	5	69.6	1.0	2	1.0	0.1	2
	50	74.1	0.2	2	1.3	0.5	2
	50 RMF	0.7	0.1	2	2.9	0.9	2
AV14-TCR-F TRAC/TRBC	0	1.3	0.0	2	1.2	0.3	2
	0.005	1.9	0.3	2	1.4	0.3	2
	0.05	8.5	0.3	2	1.1	0.5	2
	0.5	44.6	0.6	2	0.4	0.2	2
	5	68.0	1.8	2	0.3	0.0	2
	50	78.7	0.4	2	2.1	0.4	2
	50 RMF	1.8	0.1	2	1.5	0.0	2
AV15-TCR-G	0	0.4	0.1	2	2.1	0.1	2

TRAC/TRBC	0.005	7.6	0.9	2	1.6	0.2	2
	0.05	28.7	0.6	2	0.9	0.0	2
	0.5	46.5	1.3	2	0.6	0.0	2
	5	63.1	0.4	2	0.2	0.0	2
	50	71.4	1.2	2	0.1	0.1	2
	50 RMF	0.4	0.0	2	2.2	0.1	2
AV16-TCR-H TRAC/TRBC	0	0.5	0.1	2	3.1	0.1	2
	0.005	3.7	0.0	2	2.1	0.5	2
	0.05	27.1	1.0	2	3.0	0.6	2
	0.5	48.7	1.0	2	4.4	0.1	2
	5	67.5	1.5	2	6.0	0.1	2
	50	79.2	0.6	2	6.9	0.4	2
	50 RMF	0.6	0.4	2	2.9	0.5	2

表35B. CD107a脫粒

樣品名稱	VLD肽 (nM)	CD8+ CD107a+			CD4+ CD107a+		
		平均細胞 %	SD	N	平均細胞 %	SD	N
AV11-TCR-A TRAC/TRBC	0	21.95	1.06	2	4.45	1.51	2
	0.005	37.30	0.28	2	4.64	0.78	2
	0.05	64.10	0.57	2	4.68	0.44	2
	0.5	73.05	0.35	2	4.23	0.96	2
	5	75.80	1.84	2	11.85	0.49	2
	50	76.20	0.99	2	21.10	0.99	2
	50 RMF	22.05	0.49	2	4.30	0.28	2
AV14-TCR-F 僅TRAC	0	6.33	0.03	2	7.14	0.52	2
	0.005	5.93	0.13	2	7.73	1.29	2
	0.05	10.30	0.00	2	7.39	1.10	2
	0.5	42.75	0.78	2	9.08	0.46	2
	5	57.05	0.92	2	8.35	0.36	2
	50	60.75	0.07	2	9.38	0.88	2
	50 RMF	5.42	0.02	2	6.63	0.76	2
AV14-TCR-F TRAC/TRBC	0	15.90	0.14	2	5.84	0.41	2
	0.005	14.75	0.92	2	5.14	0.03	2
	0.05	22.55	1.06	2	4.89	0.40	2
	0.5	63.15	1.34	2	4.94	0.90	2
	5	78.25	0.78	2	4.71	1.35	2
	50	82.05	0.78	2	5.14	1.26	2
	50 RMF	12.00	0.00	2	3.78	0.23	2

第 175 頁(發明說明書)

AV15-TCR-G TRAC/TRBC	0	3.15	0.40	2	4.62	0.47	2
	0.005	12.15	1.34	2	5.06	0.47	2
	0.05	34.25	1.06	2	4.23	1.06	2
	0.5	53.30	0.99	2	4.74	1.32	2
	5	65.75	0.64	2	4.44	0.88	2
	50	73.25	0.21	2	4.52	0.05	2
AV16-TCR-H TRAC/TRBC	50 RMF	2.82	0.37	2	4.67	0.65	2
	0	2.29	0.07	2	3.42	0.60	2
	0.005	5.05	0.17	2	3.63	0.46	2
	0.05	23.60	0.85	2	4.48	0.24	2
	0.5	45.65	0.92	2	6.82	0.24	2
	5	60.70	0.28	2	8.09	0.30	2
	50	70.55	1.06	2	8.28	0.08	2
	50 RMF	2.64	0.84	2	3.70	0.15	2

**【0404】 實例20：同種異體反應性分析**

**【0405】** 亦在混合淋巴細胞反應(MLR)抑止分析中分析實例18中所製備之經工程改造之T細胞對抗原呈遞細胞之非特異性反應性。經工程改造之T細胞根據製造商之說明書用CellTrace紫(Invitrogen)標記。同種異體PBMC使用MACS (Miltenyi)耗盡CD3+細胞，且用以刺激經CTV標記之T細胞。特定言之，將 $5 \times 10^4$ 個T細胞與 $3 \times 10^4$ 個耗盡CD3之同種異體PBMC接種於96孔U底盤(Corning)中。五天後，收集細胞，用抗CD4染色且藉由流式細胞測量術分析。增生程度藉由稀釋CellTrace紫染料來定量。具有麩醯胺酸之羅斯維·帕克紀念研究所1640培養基(Roswell Park Memorial Institute, RPMI; Corning)補充有10% FBS、 $1 \times$  GlutaMAX、10 mM HEPES、 $1 \times$ 青黴素/鏈黴素、1 mM丙酮酸鈉、50  $\mu$ M 2-ME及 $1 \times$ 非必需胺基酸，用於整個MLR分析中。用低含量之CellTrace紫(CTV)染色之細胞，亦即高增生之細胞的平均百分比示於表36及圖33A-B中。圖33A及33B示用以分析CTV含量之閘控。在CD4+與CD4- (CD8+)細胞中，對於所測試之各插入之TCR，用TRBC RNP處理之細胞展示比不用

TRBC RNP處理之細胞之增生小，如表36及圖33C及33D中所示。

【0406】 表36 - 響應於同種異體PBMC之增生

T細胞類型	樣品名稱	TRAC RNP + TRBC RNP			TRAC RNP		
		平均低CTV 細胞%	SD	n	平均低CTV 細胞%	SD	n
CD4-	AV12-TCR-C	18%	13%	3	52%	2%	3
	AV11-TCR-A	16%	3%	3	70%	2%	3
	AV13-TCR-B	21%	5%	3	61%	2%	3
CD4+	AV12-TCR-C	14%	1%	3	36%	3%	3
	AV11-TCR-A	16%	7%	3	40%	2%	3
	AV13-TCR-B	22%	2%	3	32%	1%	3

【0407】 表37 - 核酸模板。注意，所有模板以ssAAV遞送且包含AAV2 5'及3'ITR。同源臂如上文所述。如下文所闡述，許多模板另外包含一或多個啟動子、裂解或polyA序列。下文「\*」指示終止密碼子。

表37

模板	轉殖基因	啟動子或(無 啟動子/肽)	TCR ORF組 態	PolyA
AV1 (SEQ ID NO : 613)	TCR-C	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV2 (SEQ ID NO : 614)	TCR-C	Ef1a - 短	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV3 (SEQ ID NO : 615)	TCR-C	MND-1	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV4 (SEQ ID NO : 616)	TCR-C	MND-2	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV5 (SEQ ID NO : 617)	TCR-C	PGK	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV6 (SEQ ID NO : 618)	TCR-C	MND-1	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV7 (SEQ ID NO : 619)	TCR-C	PGK	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV8 (SEQ ID NO : 620)	TCR-C	MND-2	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV9 (SEQ ID NO : 621)	EGFP	EF1a	n/a	SV40
AV10 (SEQ ID NO : 622)	EGFP	(T2A)	n/a	bGH
AV11 (SEQ ID NO : 623)	TCR-A	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV12 (SEQ ID NO : 624)	TCR-C	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV13 (SEQ ID NO : 625)	TCR-B	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV14 (SEQ ID NO : 626)	TCR-F	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV15 (SEQ ID NO : 627)	TCR-G	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV16 (SEQ ID NO : 628)	TCR-H	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV18 (SEQ ID NO : 629)	TCR-D	EF1a	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH

模板	轉殖基因	啟動子或(無 啟動子/肽)	TCR ORF組 態	PolyA
AV19 (SEQ ID NO : 630)	TCR-C	(T2A)	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV20 (SEQ ID NO : 631)	TCR-E	(T2A)	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH
AV21 (SEQ ID NO : 632)	TCR-B	(T2A)	$\beta$ -P2A- $\alpha$ -*	bGH

表37中所定義之模板之要素根據如下序列來定義：EF1a (SEQ ID NO : 603)；EF1 (SEQ ID NO : 604)；MND-1 (SEQ ID NO : 605)；MND-2 (SEQ ID NO : 606)；PGK (SEQ ID NO : 607)；T2A (SEQ ID NO : 608)；P2A (SEQ ID NO : 609)；EGFP (SEQ ID NO : 610)；SV40 Poly A (SEQ ID NO : 611)；bGH PolyA (SEQ ID NO : 612)。