202242112

(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 202242112 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：110149158 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 12 月 28 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/113 (2010.01)* *C12N9/22 (2006.01)*
A61K31/7105 (2006.01) *A61P31/20 (2006.01)*

(30)優先權：2020/12/28 美國 63/131,145

(71)申請人：美商詹森藥物公司 (美國) JANSSEN PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國
美商亞克圖羅斯醫療公司 (美國) ARCTURUS THERAPEUTICS, INC. (US)
美國

(72)發明人：崔李斯 雷蒙 迪亞茲 TRELLES, RAMON DIAZ (ES)；林 敏儀 LAM, MAN LU (CA)；立川潔 TACHIKAWA, KIYOSHI (JP)；卡爾瑪里 普里亞 普雷卡許 KARMALI, PRIYA PRAKASH (US)；奇福庫拉 帕德瑪納 CHIVUKULA, PADMANABH (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：10 共 230 頁

(54)名稱

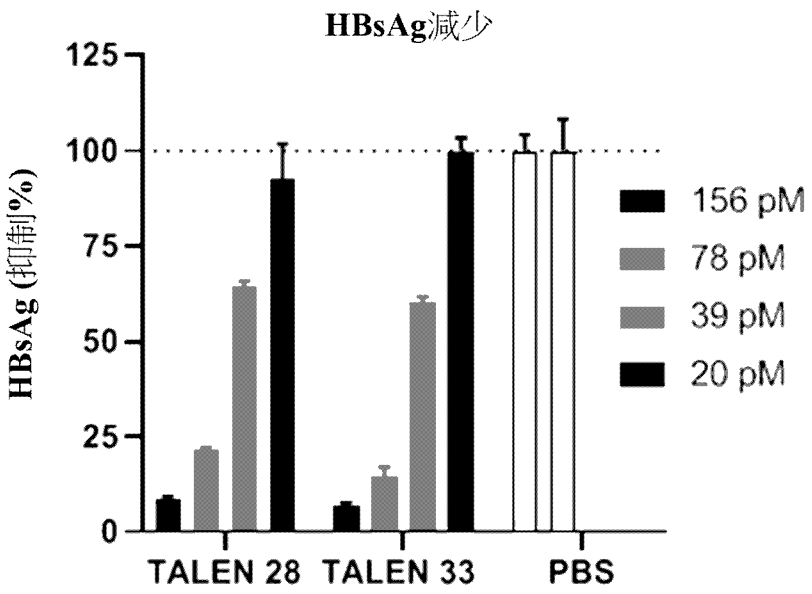
靶向 HBV 之類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)

(57)摘要

本發明描述編碼靶向 B 型肝炎病毒(HBV)基因體之類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)之核酸分子。亦描述含有該等 TALEN 之組合物、宿主細胞、脂質及醫藥組合物。亦描述使用本發明之醫藥組合物治療肝炎感染，尤其患有慢性 HBV 感染之個人之肝炎感染的方法。

Nucleic acid molecules encoding transcription activator like effector nucleases (TALENs) for targeting a hepatitis B virus (HBV) genome are described. Also described are compositions, host cells, lipids, and pharmaceutical compositions containing the TALENs. Methods for treating hepatitis infection, particularly in individuals having chronic HBV infection, using the pharmaceutical compositions of the invention are also described.

指定代表圖：


HBsAg减少
HBsAg (抑制%)
125
100
75
50
25
0
TALEN 28
TALEN 33
PBS
156 pM
78 pM
39 pM
20 pM

【圖5B】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

靶向HBV之類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)

【英文發明名稱】

TRANSCRIPTION ACTIVATOR-LIKE EFFECTOR NUCLEASES (TALENS) TARGETING HBV

【中文】

本發明描述編碼靶向B型肝炎病毒(HBV)基因體之類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)之核酸分子。亦描述含有該等TALEN之組合物、宿主細胞、脂質及醫藥組合物。亦描述使用本發明之醫藥組合物治療肝炎感染，尤其患有慢性HBV感染之個人之肝炎感染的方法。

【英文】

Nucleic acid molecules encoding transcription activator like effector nucleases (TALENs) for targeting a hepatitis B virus (HBV) genome are described. Also described are compositions, host cells, lipids, and pharmaceutical compositions containing the TALENs. Methods for treating hepatitis infection, particularly in individuals having chronic HBV infection, using the pharmaceutical compositions of the invention are also described.

【指定代表圖】

圖5B

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

靶向HBV之類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)

【英文發明名稱】

TRANSCRIPTION ACTIVATOR-LIKE EFFECTOR NUCLEASES (TALENS) TARGETING HBV

【技術領域】

【0001】 本發明大體上關於分子生物學及基因工程改造，包括使用類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)序列以用於基因靶向及基因表現調節之領域。

【先前技術】

【0002】 B型肝炎病毒(HBV)為編碼四個開放閱讀框架及七種蛋白質之3.2-kb親肝性小DNA病毒。約二十億人感染HBV，且大致2.4億人患有慢性B型肝炎感染(慢性HBV)，該感染之特徵在於血液中之持續性病毒及亞病毒粒子持續超過6個月(Cohen等人 *J. Viral Hepat.* (2011) 18(6), 377-83)。持續性HBV感染經由病毒肽及循環抗原長期刺激HBV特異性T細胞受體而導致循環及肝內HBV特異性CD4+及CD8+ T細胞的T細胞耗竭。因此，T細胞多功能性減弱(亦即，IL-2、腫瘤壞死因子(TNF)-α、IFN-γ含量減少及缺乏增殖)。

【0003】 慢性HBV (CHB)當前係用IFN-α及核苷或核苷酸類似物進行治療，但由於在受感染肝細胞中持續存在一種作為病毒RNA模板起基本作用之稱為共價閉合環狀DNA (cccDNA)之胞內病毒複製中間物及由此而來之新的病毒體，因此最終無法治癒。據認為，所誘導之病毒特異性T

細胞及B細胞反應可有效消除攜帶cccDNA之肝細胞。當前靶向HBV聚合酶之療法抑制病毒血症，但對存在於核中之cccDNA及相關循環抗原產生提供有限作用。最嚴謹的治癒形式可為消除生物體之HBV cccDNA，此既不作為自然發生之結果被觀測到，亦不作為任何治療性干預之結果被觀測到。然而，HBV表面抗原(HBsAg)減少臨床上可信地等效於治癒，此係因為疾病復發僅在嚴重免疫抑制之情況下才可能會發生，隨後其可藉由預防性治療加以預防。因此，至少自臨床觀點來看，HBsAg減少與最嚴格的針對HBV之免疫重建形式相關。

【0004】 D型肝炎病毒(HDV)感染僅在雙重感染HBV之情形下才會發生，此係因為其需要存在供HDV形成感染性病毒粒子之HBsAg。雙重感染與肝硬化之早期發展、肝細胞癌(HCC)發展之風險增加以及肝相關及總體死亡率增加相關。

【0005】 因此，具有使得能夠在慢性感染患者中靶向HBV基因體裂解、伴隨高效率及細胞毒性降低之組合物及方法係有用的。

【發明內容】

【0006】 因此，對用於靶向HBV cccDNA，特定言之HBsAg之基因編輯之肝炎，尤其B型肝炎病毒(HBV)且更尤其慢性HBV治療存在未滿足的醫療需求。本發明藉由提供用於誘導特異性DNA序列之定向裂解之組合物及方法來滿足此需求。

【0007】 在一通用態樣中，本文提供一種治療有需要之個體之肝炎感染之方法，該方法包含向該個體投與包含以下之mRNA分子組合：

(1)第一mRNA分子，其包含編碼第一類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第一TALEN單體包含第一TALE DNA

結合域及第一核酸酶催化域，其中該第一TALE DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之第一半位點序列；及

(2)第二mRNA分子，其包含編碼第二TALEN單體之聚核苷酸序列，該第二TALEN單體包含第二TALE DNA結合域及第二核酸酶催化域，其中該第二TALE DNA結合域能夠結合至該目標核酸序列之第二半位點序列；

其中當該第一TALE DNA結合域結合至該第一半位點序列且該第二TALE DNA結合域結合至該第二半位點序列時，該第一TALEN單體及該第二TALEN單體能夠形成裂解該目標核酸序列之二聚體，

較佳地，該第一核酸酶催化域為第一FokI核酸酶催化域且該第二核酸酶催化域為第二FokI核酸酶催化域。

【0008】 在某些實施例中，該目標核酸序列係在編碼HBsAg及HBV聚合酶(pol)之序列內，較佳地，

(a)該目標核酸序列之該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 1之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且該目標核酸序列之該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 2之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列；或

(b)該目標核酸序列之該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 3之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且該目標核酸序列之該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 4之核酸序列至少約90%一致，諸

如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，或

(c)該目標核酸序列包含與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之核酸序列至少90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列。

【0009】 在某些實施例中，該第一mRNA分子及該第二mRNA分子各自進一步包含5'端帽、5'-UTR、編碼核定位信號之序列、編碼N端域之序列、編碼C端域之序列、3'-UTR及多腺苷尾中之一或多者，較佳地全部。

【0010】 在某些實施例中，各別地，該第一TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 9至少90%一致之胺基酸序列，該第二TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 10至少90%一致之胺基酸序列，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自包含與SEQ ID NO: 11至少90%一致之胺基酸序列。

【0011】 在某些實施例中，該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及J中之一或多者。

【0012】 在某些實施例中，該方法進一步包含向該個體投與第二治療性組合物，較佳地包含抗HBV劑之第二治療性組合物。

【0013】 在某些實施例中，該個體患有HBV感染，較佳地慢性HBV感染。

【0014】 在某些實施例中，該個體雙重感染HBV及HDV。

【0015】 在另一通用態樣中，本文提供一種組合物，其包含經囊封於脂質奈米粒子中之包含以下之mRNA分子組合：

(1)第一mRNA分子，其包含編碼第一類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第一TALEN單體包含第一TALE DNA結合域及第一核酸酶催化域，其中該第一TALE DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之第一半位點序列；及

(2)第二mRNA分子，其包含編碼第二TALEN單體之聚核苷酸序列，該第二TALEN單體包含第二TALE DNA結合域及第二核酸酶催化域，其中該第二TALE DNA結合域能夠結合至該目標核酸序列之第二半位點序列；

其中當該第一TALE DNA結合域結合至該第一半位點序列且該第二TALE DNA結合域結合至該第二半位點序列時，該第一TALEN單體及該第二TALEN單體能夠形成裂解該目標核酸序列之二聚體，

較佳地，該第一核酸酶催化域為第一FokI核酸酶催化域且該第二核酸酶催化域為第二FokI核酸酶催化域。

【0016】 在某些實施例中，該目標核酸序列係在編碼HBsAg及HBV聚合酶(pol)之序列內，較佳地，

(a)該目標核酸序列之該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 1之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且該目標核酸序列之該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 2之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列；或

(b)該目標核酸序列之該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 3之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且該目標核酸序列之該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 4之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，或

(c)該目標核酸序列包含與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之核酸序列至少90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列。

【0017】 在某些實施例中，該第一mRNA分子及該第二mRNA分子各自進一步包含5'端帽、5'-UTR、編碼核定位信號之序列、編碼N端域之序列、編碼C端域之序列、3'-UTR及多腺苷尾中之一或多者，較佳地全部。

【0018】 在某些實施例中，各別地，該第一TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 9至少90%一致之胺基酸序列，該第二TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 10至少90%一致之胺基酸序列，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自包含與SEQ ID NO: 11至少90%一致之胺基酸序列。

【0019】 在某些實施例中，該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及J中之一或多者。

【0020】 在某些實施例中，囊封該mRNA分子組合之該等脂質奈米粒子包含陽離子脂質及至少一種選自由陰離子脂質、兩性離子脂質、中性脂質、類固醇、聚合物結合型脂質、磷脂、醣脂及其組合組成之群之其他脂質。

【0021】 在另一通用態樣中，本文提供一種組合，該組合具有：

(1)第一核酸，較佳地第一mRNA分子，其包含編碼第一類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第一TALEN單體包含第一TALE DNA結合域及第一FokI核酸酶催化域，其中該第一TALE DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之第一半位點序列，且該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 1之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列；及

(2)第二核酸，較佳地第二mRNA分子，其包含編碼第二類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第二TALEN單體包含第二TALE DNA結合域及第二FokI核酸酶催化域，其中該第二TALE DNA結合域能夠結合至該目標核酸序列之第二半位點序列，且該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 2之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列；

其中當該第一TALE DNA結合域結合至該第一半位點序列且該第二TALE DNA結合域結合至該第二半位點序列時，該第一TALEN單體及該第二TALEN單體能夠形成裂解該目標核酸序列之二聚體。

【0022】 在某些實施例中，該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及J中之一或多者。

【0023】 在另一通用態樣中，本文提供一種組合物，其包含如本文所描述之第一核酸與第二核酸之組合，其中該第一核酸及該第二核酸分開或共同經囊封於脂質奈米粒子中。

【0024】 在另一通用態樣中，本文提供一種核酸分子，其編碼如本

文所描述之第一mRNA分子及第二mRNA分子中之至少一者。

【0025】 在另一通用態樣中，本文提供一種經分離宿主細胞，其包含如本文所描述之核酸分子。

【0026】 在特定實施例中，該宿主細胞為肝細胞。

【0027】 在另一通用態樣中，本文提供一種醫藥組合物，其包含如本文所描述之組合物、如本文所描述之組合、如本文所描述之核酸分子或如本文所描述之經分離宿主細胞及醫藥學上可接受之載劑。

【0028】 在另一通用態樣中，本文提供一種裂解HBV基因體中之目標核酸序列之方法，其包含使HBV基因體與如本文所描述之組合物、如本文所描述之組合、如本文所描述之核酸分子、如本文所描述之經分離宿主細胞或如本文所描述之醫藥組合物接觸。

【0029】 在另一通用態樣中，本文提供一種誘導HBV基因體中之目標核酸序列之基因編輯的方法，其包含使HBV基因體與如本文所描述之組合物、如本文所描述之組合、如本文所描述之核酸分子、如本文所描述之經分離宿主細胞或如本文所描述之醫藥組合物接觸。

【0030】 在某些實施例中，該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及J中之一或多者。

【0031】 在另一通用態樣中，本文提供一種治療有需要之個體之肝炎感染之方法，該方法包含向該個體投與如本文所描述之醫藥組合物。

【0032】 在另一通用態樣中，本文提供一種減輕個體之HBV感染及/或減少個體之HBV複製的方法，該方法包含向該個體投與如本文所描述之醫藥組合物。

【0033】 在某些實施例中，該方法進一步包含向該個體投與第二治

療性組合物，較佳地包含抗HBV劑之第二治療性組合物。

【0034】 在某些實施例中，該個體患有HBV感染，較佳地慢性HBV感染。

【0035】 在某些實施例中，該個體雙重感染HBV及HDV。

【0036】 在某些實施例中，該個體之HBsAg、HBeAg、HBV DNA、HBV cccDNA或整合HBV DNA中之一或多者之表現量降低。在特定實施例中，該表現量為肝細胞含量、核或細胞含量、肝含量、血清含量或血漿含量。

【0037】 在另一通用態樣中，本文提供一種產生TALEN之方法，該方法包含活體外或活體內轉錄如本文所描述之核酸分子。

【0038】 在另一通用態樣中，本文提供一種如本文所描述之醫藥組合物，其用於治療有需要之個體之B型肝炎病毒(HBV)誘發之疾病，較佳地其中該個體患有慢性HBV感染。

【0039】 在某些實施例中，該HBV誘發之疾病選自由以下組成之群：晚期纖維化、硬化及肝細胞癌(HCC)，該醫藥組合物視情況與另一治療劑，較佳地另一抗HBV劑組合。

【0040】 根據以下揭示內容，包括具體實施方式及其較佳實施例以及隨附申請專利範圍，本發明之其他態樣、特點及優勢將顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0041】 當結合附圖閱讀時，將更好地理解前述發明內容以及以下具體實施方式。應理解，本發明不限於附圖中所示之確切實施例。

【0042】 本專利或申請案檔案含有至少一張彩製圖。在請求且支付必要費用後，專利局將提供具有(多張)彩色圖式之本專利或專利申請公開

案之複本。

【0043】 圖1A-圖1C顯示HBV DNA基因體內之TALEN 28及33目標位點。圖1A：HBV基因體及病毒蛋白之重疊開放閱讀框架之示意性圖示(前核心/核心(preC/Core)、pol、前S1、前S2、HBsAg及HBx)。TALEN 28及33靶向編碼HBsAg/pol之基因內之位點。圖1B：TALEN28 (上部，SEQ ID NO: 5)及TALEN33 (底部，SEQ ID NO: 6)之左TALEN臂及右TALEN臂所靶向之HBV DNA序列。圖1C：TALEN mRNA構築體之示意性圖示。HBV DNA結合域位於15-19 TALE重複序列之陣列內，其中之各者含有兩個經設計以靶向HBV序列之稱為重複可變雙殘基(RVD)之胺基酸。

【0044】 圖2A-圖2B顯示HBV TALEN 28目標序列保守性分析。基於TALEN 28左臂(圖2A)及右臂(圖2B)之各靶向核苷酸豐度生成保守性標誌。保守性愈高，(多個)豐富核苷酸之尺寸愈大。

【0045】 圖3A-圖3B顯示HBV TALEN 33目標序列保守性分析。基於TALEN 33左臂(圖3A)及右臂(圖3B)之各靶向核苷酸豐度生成保守性標誌。保守性愈高，(多個)豐富核苷酸之尺寸愈大。

【0046】 圖4A-圖4C顯示TALEN 28及TALEN 33靶向寬HBV基因型覆蓋度。TALEN 28 (圖4A)及TALEN 33 (圖4B)中之各者之左TALEN靶向高度保守序列，其中右TALEN臂內有於基因型(GT) A及GT C中觀測到之單一錯配。圖4C顯示針對GT A至H之HBV DNA分離株之經活體外轉譯之TALEN蛋白的DNA裂解結果。

【0047】 圖5A-圖5D顯示TALEN 28及TALEN 33於HepG2.2.15細胞中之作用。圖5A：TALEN質體經活體外轉錄且經轉染至細胞中。轉染

後24小時，用DAPI對核進行染色，且藉由免疫螢光證實核中之TALEN表現。6天後，針對TALEN活性對細胞培養基中之HBsAg分泌性蛋白含量(圖5B)、細胞活力(圖5C)及HBV DNA基因編輯(圖5D)之影響對細胞進行評估。

【0048】 圖6A-圖6E顯示TALEN 28於感染HBV之原代人類肝細胞(PHH)中之作用。圖6A：使用PHH進行之HBV感染及TALEN mRNA轉染之示意性圖解。在HBV感染後第5天，用或不用TALEN 28 mRNA對治療PHH。圖6B：藉由免疫螢光(紅色)偵測TALEN 28表現且在轉染後6小時藉由使用DAPI (藍色)對細胞核進行染色。圖6C：經TALEN 28治療細胞抵抗HBsAg及HBeAg產生之抗病毒作用。在感染後第11天，測定HBsAg及HBeAg含量。圖6D：在TALEN治療後6天，藉由T7E1消化分析檢驗TALEN誘導之靶向cccDNA序列破裂。星號指示破裂序列。圖6E：經基因編輯之cccDNA在TALEN 28目標序列內顯示大部分缺失。藉由次世代定序分析序列。

【0049】 圖7A-圖7D顯示TALEN 33於感染HBV之PHH中之作用。圖7A：使用PHH進行之HBV感染及TALEN mRNA轉染之示意性圖解。HBV感染後第5天，用或不用TALEN 33 mRNA對治療PHH。圖7B：藉由免疫螢光(綠色)偵測TALEN 33表現且在轉染後6小時藉由使用DAPI (藍色)對細胞核進行染色。圖7C：經TALEN 33治療細胞抵抗HBsAg及HBeAg產生之抗病毒作用。在感染後第11天，測定在存在或不存在TALEN 33之情況下的HBsAg及HBeAg含量。資料係自至少3項獨立研究計算而來且伴隨誤差桿表示平均值。圖7D：藉由T7E1消化分析檢驗TALEN誘導之靶向cccDNA序列破裂。星號指示破裂序列。

【0050】 圖8顯示TALEN 33編輯來自感染HBV GT A至D之PHH之cccDNA。對自感染HBV之PHH提取之cccDNA執行T7E1分析，該等PHH經編碼TALEN 33之mRNA對治療(+)或未經編碼TALEN 33之mRNA對治療(-)。星號指示破裂序列。

【0051】 圖9A-圖9C顯示經囊封至脂質奈米粒子中之TALEN 33 mRNA對(LNP-HBV TALEN)減少血清HBsAg (圖9A)及血清HBV DNA (圖9B)，且顯示感染AAV-HBV之小鼠之劑量依賴性基因編輯活性(圖9C)。

【0052】 圖10A-圖10B顯示感染AAV-HBV之小鼠之LNP-HBV TALEN與HBV治療劑恩替卡韋(entecavir) (ETV)之比較結果。在單次劑量之LNP-HBV TALEN之情況下而非在非靶向HBV之TTR TALEN之情況下觀測到血漿HBsAg (圖10A)及HBV DNA (圖10B)持續減少超過91天。QD投與7天之ETV減少血漿HBV DNA，但在治療停止後觀測到病毒反彈。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0053】 本申請案主張2020年12月28日申請之美國臨時專利申請案第63/131,145號之權益，該案以全文引用之方式併入本文中。

【0054】 先前技術及本說明書通篇引用或描述各種公開案、文章及專利；此等參考文獻中之各者以全文引用之方式併入本文中。對本說明書中所包括之文件、行為、材料、裝置、製品或其類似者之論述係出於為本發明提供脈絡之目的。該論述並非承認任何或所有此等內容形成關於所揭示或所主張之任何發明之先前技術的一部分。

【0055】 除非另外定義，否則本文所使用之所有技術及科學術語皆具有與一般熟習本發明所涉及技術者通常所理解之含義相同之含義。此外，本文所使用之某些術語具有如說明書中所闡述之含義。本文所引用之所有專利、公開專利申請案及公開案皆以引用之方式併入，如同在本文中完整闡述一般。

【0056】 亦必須注意，除非上下文另外清楚地指示，否則如在本文及隨附申請專利範圍中所使用之單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個提及物。

【0057】 除非另外說明，否則諸如本文所描述之序列一致性%或序列一致性%範圍之任何數值應理解為在所有情況下均由術語「約」修飾。因此，一數值通常包括所敍述值±10%。舉例而言，10 mg劑量包括9 mg至11 mg。除非上下文另外清楚地指示，否則如本文所使用之數值範圍使用明確地包括所有可能的子範圍、在該範圍內之所有個別數值，包括該等範圍內之整數及該等值之分數。

【0058】 如本文所使用之在多個所敍述要素之間的連接性術語「及/或」理解為涵蓋個別選項及組合選項兩者。舉例而言，當兩個要素由「及/或」連結時，第一選項係指第一要素之適用性，不含第二要素。第二選項係指第二要素之適用性，不含第一要素。第三選項係指第一要素與第二要素合用之適用性。此等選項中之任一者理解為落入該含義內，且因此滿足如本文所使用之術語「及/或」之要求。該等選項中超過一者之同時適用性亦理解為落入該含義內，且因此滿足術語「及/或」之要求。

【0059】 除非另外指示，否則在一系列要素之前的術語「至少」理解為指代該系列中之每一要素。熟習此項技術者將認識到或能夠僅使用常

規實驗即可確定本文所描述之本發明特定實施例之許多等效方案。本發明意欲涵蓋該等等效方案。

【0060】 在本說明書及隨後之申請專利範圍通篇，除非上下文另外要求，否則字語「包含(comprise)」及諸如「包含(comprises/comprising)」之變化形式應理解為暗示包括一個所陳述整數或步驟或一組整數或步驟，但不排除任何另外一個整數或步驟或任何另外一組整數或步驟。當在本文中使用時，術語「包含(comprising)」可經術語「含有(containing)」或「包括(including)」取代，或有時當在本文中使用時，經術語「具有(having)」取代。

【0061】 當在本文中使用時，「由……組成」排除所主張要素中未規定之任何要素、步驟或成分。當在本文中使用時，「基本上由……組成」不排除並不實質上影響技術方案之基本及新穎特徵之材料或步驟。每當在本文中在本發明之態樣或實施例之上下文中使用時，前述術語「包含(comprising)」、「含有(containing)」、「包括(including)」及「具有(having)」中之任一者可經術語「由……組成」或「基本上由……組成」置換以改變本發明之範疇。

【0062】 術語「核酸分子」及「聚核苷酸」在本文中可互換使用，且係指RNA分子及DNA分子兩者，包括包含cDNA、基因體DNA、合成DNA之核酸分子，及含有核酸類似物之DNA或RNA分子。術語「互補核苷酸鹼基」意謂與彼此形成氫鍵之一對核苷酸鹼基。腺嘌呤(A)與胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U)在RNA中配對，且鳥嘌呤(G)與胞嘧啶(C)配對。核酸之互補區段或互補股與彼此雜交(亦即，藉由氫鍵結來接合)。「互補」意謂核酸可藉由傳統的華特生-克里克(Watson-Crick)或藉由其他非傳統的結

合模式與另一核酸序列一起形成(多個)氫鍵。核酸分子可具有任何三維結構。核酸分子可為雙股或單股的(例如有義股或反義股)。核酸分子之非限制性實例包括基因、基因片段、外顯子、內含子、信使RNA (mRNA)、轉移RNA、核糖體RNA、siRNA、微小RNA、tracrRNA、crRNA、導引RNA、核糖核酸酵素、cDNA、重組聚核苷酸、分支鏈聚核苷酸、核酸探針及核酸引子。核酸分子可含有非習知核苷酸或經修飾之核苷酸。如本文可互換使用之術語「聚核苷酸序列」及「核酸序列」係指聚核苷酸分子之序列。

【0063】片語「序列一致性百分比(%)」或「一致性%」或「與……%一致」當參照胺基酸序列使用時描述兩個或更多個經比對之胺基酸序列中一致胺基酸之匹配(「命中(hit)」)數目與構成該等胺基酸序列總長之胺基酸殘基數目的相比結果。換言之，當比較兩個或更多個序列且比對達到如使用如此項技術中已知之序列比較演算法所量測之最大對應性時或當手動比對且目視檢查時，使用比對可測定該等序列之相同胺基酸殘基百分比(例如在胺基酸序列全長內90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%一致性)。可對核苷酸序列進行相同測定。因此，供比較以測定序列一致性之序列可因胺基酸之(多個)取代、(多個)添加或(多個)缺失而有所不同。適合用於比對蛋白質序列之程式係熟習此項技術者已知的。蛋白質序列之序列一致性百分比可例如用諸如CLUSTALW、Clustal Omega、FASTA或BLAST之程式，例如使用NCBI BLAST演算法(Altschul SF等人(1997)，*Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402)來測定。

【0064】如本文所使用之術語「結合」或「特異性結合」係指巨分

子之間(例如蛋白質與核酸之間)的序列特異性非共價相互作用。並非結合相互作用之全部組件皆需要為序列特異性的(例如，與DNA骨幹中之磷酸酯殘基接觸)，只要整體相互作用為序列特異性的即可。

【0065】 如本文所使用，在向個體投與兩種或更多種療法或組分之情形下，術語及片語「組合(combination)」、「組合地(in combination)」、「與……組合(in combination with)」、「共遞送(co-delivery)」及「與……一起投與(administered together with)」係指同時投與兩種或更多種療法或組分，諸如兩種例如mRNA分子之核酸分子，或治療性組合物及脂質。「同時投與」可為至少在同一天內投與兩種組分。當兩種組分係「與……一起投與」或「與……組合投與」時，其可在諸如24、20、16、12、8或4小時之短時段內或在1小時內在獨立組合物中依序投與，或其可在單一組合物中同時投與。使用術語「與...組合」並不限制向個體投與療法或組分之次序。舉例而言，第一療法或組分(例如第一核酸分子)可在投與第二療法或組分(例如第二核酸分子)之前(例如在其之前5分鐘至一小時)、伴隨其或與其同時或在其之後(例如在其之後5分鐘至一小時)投與。在一些實施例中，第一療法或組分(例如第一核酸分子)及第二療法或組分(例如第二核酸分子)係在同一組合物中投與。在其他實施例中，第一療法或組分(例如第一核酸分子)及第二療法或組分(例如第二核酸分子)係在獨立組合物中投與。

【0066】 術語「細胞毒性」係指殺滅細胞(例如哺乳動物細胞(例如人類細胞))、細菌、病毒、真菌、原蟲、寄生蟲、普里昂蛋白(prion)或其組合或對其造成有害、有毒或致命影響。

【0067】 術語「遞送」係指遞送化合物、物質、實體、部分、貨物

或有效負載物之行為或方式。

【0068】 術語「遞送劑」係指至少部分地便於將聚核苷酸活體內遞送至靶向細胞之任何物質。

【0069】 術語「經工程改造」係指分子經設計以具有與起點、野生型或天然分子不同之特點或特性，無論結構特點或特性還是化學特點或特性。

【0070】 術語核酸序列之「表現」係指以下事件中之一或多者：(1)由DNA序列產生RNA模板(例如，藉由轉錄)；(2)加工RNA轉錄物(例如，藉由剪接、編輯、形成5'端帽及/或加工3'端)；(3)將RNA轉譯成多肽或蛋白質；及(4)轉譯後修飾多肽或蛋白質。

【0071】 術語「脂質」意謂包含脂肪酸之酯且特徵在於不可溶於水中但可溶於許多有機溶劑中之有機化合物。脂質通常分成至少三類：(1)「簡單脂質」，其包括脂肪及油以及蠟；(2) 「化合物脂質」，其包括磷脂及醣脂；及(3) 「衍生脂質」，諸如類固醇。

【0072】 術語「脂質遞送媒劑」意謂可用於將治療性核酸(例如mRNA)遞送至所關注之目標位點(例如細胞、組織、器官及其類似位點)之脂質調配物。脂質遞送媒劑可為可由陽離子脂質、非陽離子脂質(例如磷脂)、防止粒子聚集之結合脂質(例如PEG-脂質)及視情況選用之膽固醇形成的核酸-脂質粒子。通常，治療性核酸(例如mRNA)可經囊封於粒子之脂質部分中，由此保護其免於酶促降解。

【0073】 術語「經囊封之脂質」意謂提供具有完全囊封、部分囊封或兩者之諸如mRNA之治療性核酸的脂質粒子。在一較佳實施例中，核酸(例如mRNA)經完全囊封於脂質粒子中。

【0074】 如本文所使用之「非天然存在之」核酸或多肽係指自然界中不存在之核酸或多肽。「非天然存在之」核酸或多肽可在實驗室及/或製造環境中經合成、處理、製造及/或以其他方式操作。在一些情況下，非天然存在之核酸或多肽可包含經處理、加工或操作以展現在處理之前不存在於天然存在之核酸或多肽中之特性的天然存在之核酸或多肽。如本文所使用之「非天然存在之」核酸或多肽可為自發現其之天然來源隔離或分離之核酸或多肽，且其與在天然來源中與其相關之序列之間缺乏共價鍵。「非天然存在之」核酸或多肽可以重組方式或經由諸如化學合成之其他方法來製造。

【0075】 如本文所使用之術語「以可操作方式連接」係指鍵聯或並接，其中如此描述之組件係呈准許其以其預期方式起作用之關係。舉例而言，以可操作方式連接至所關注之核酸序列之調節序列能夠引導所關注之核酸序列之轉錄，或以可操作方式連接至所關注之胺基酸序列之信號序列能夠將所關注之胺基酸序列分泌或易位至膜上。

【0076】 如本文所使用之「個體」意謂將藉由根據本申請案之一個實施例之方法加以治療或已藉由該方法加以治療之任何動物，較佳地哺乳動物，最佳地人類。如本文所使用之術語「哺乳動物」涵蓋任何哺乳動物。哺乳動物之實例包括但不限於母牛、馬、綿羊、豬、貓、狗、小鼠、大鼠、兔、天竺鼠、諸如猴或猿之非人類靈長類動物(NHP)、人類等，更佳地人類。人類個體可包括患者。本文所描述之化合物、組合物及方法可適用於人類療法及針對可能會慢性感染HBV之物種之獸醫學應用兩者。在一些實施例中，個體患有HBV感染，更尤其慢性HBV (CHB)感染。個體可能會患有CHB，伴隨或不伴隨病毒雙重感染。如本文所使用之「病毒

雙重感染」係指感染至少兩種類型之病毒。「病毒雙重感染」可為同時感染至少兩種類型之病毒。「病毒雙重感染」亦可為重複感染，其中一或多種類型之病毒感染外加預先存在之一或多種其他類型之病毒感染。在一些實施例中，個體患有HBV-HDV雙重感染。較佳地，個體患有CHB-HDV雙重感染。更佳地，個體患有CHB與慢性HDV之病毒雙重感染。

【0077】「目標位點」或「目標序列」為界定將與結合分子或結合域結合、為所存在之結合提供充分條件的核酸之一部分的核酸序列。如本文所使用之目標序列之「半位點序列」係指將與結合分子或結合域結合、為所存在之結合提供充分條件的目標序列之一部分。目標核酸序列內一般存在可藉由間隔序列分隔開之兩個半位點序列。舉例而言，第一TALE DNA結合域可結合至目標核酸之第一半位點序列且第二TALE DNA結合域可結合至同一目標核酸之第二半位點序列。較佳地，第一半位點序列及第二半位點序列係不同的且藉由間隔序列分隔開。

【0078】本文中之描述係關於本申請案之各種實施例。任何實施例之論述僅意圖為例示性的，且並不意欲表明本發明之範疇，包括申請專利範圍，限於此等實例。舉例而言，儘管本文所描述之本申請案之核酸序列之實施例可含有特定組件，包括但不限於以特定次序佈置的特定TALE DNA結合域、核酸酶催化域等，但一般熟習此項技術者應瞭解，本文所揭示之概念可同樣適用於以可用於本申請案之核酸序列中之其他次序佈置的其他組件。本申請案涵蓋使用具有可用於本申請案之核酸序列中之任何序列的呈任何組合形式之可應用組件中之任一種，無論特定組合是否得到明確描述。

肝炎

【0079】 肝炎為最常由病毒性感染造成之肝發炎。存在五種稱為A、B、C、D及E型之主要肝炎病毒。A型及E型肝炎通常由攝入受污染食物或水造成。B型、C型及D型肝炎通常由於非經腸接觸受感染體液(例如，來自輸血或使用受污染設備之侵入性醫療程序)而發生。B型肝炎亦藉由性接觸傳播。

【0080】 A型肝炎病毒(HAV)為造成發熱、不適(malaise)、厭食症、噁心、腹部不適(abdominal discomfort)及黃疸之經腸傳播之病毒性疾病。HAV通常藉由糞-口途徑、藉由人與人接觸、受污染食物或水攝入或混合血漿產品傳播而獲得。脂質外膜之不存在使得HAV對物理化學失活極具抗性，且病毒可耐受血液產品之習知熱處理。用以鑑別受感染個人之HAV抗原及/或抗體之敏感及特定診斷分析以及用以偵測病毒血症樣本以將其排除在輸注之外的基於核酸之試驗的發展表示重要的公眾健康挑戰。

【0081】 A型肝炎病毒(HAV)為經分類為小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)之肝病毒屬的非包膜小球狀病毒。HAV基因體由編碼聚合蛋白前驅體之單股線性7.5 kb RNA分子組成，該RNA分子經加工以產生病毒複製所需之結構蛋白及酶促活性。HAV編碼四種含有由受感染個人之抗體識別之主要抗原域的衣殼蛋白(A、B、C及D)。除衣殼蛋白之外，亦已報導於諸如2A之非結構蛋白及病毒編碼蛋白酶中之抗原域。

【0082】 B型肝炎病毒(HBV)感染人類且可能會產生兩種臨床結果。在大部分成人臨床感染(90%-95%)中，病毒係在幾週或幾個月之後被清除，且患者對再感染產生終身免疫性。然而，在剩餘情況下，病毒並未自組織消除，且患者仍受到慢性感染。慢性感染之後遺症係嚴重的：該等

個人高度有可能出現肝組織瘢痕形成(硬化)且可能最終罹患肝細胞癌。HBV係在遞送期間經由受感染血液或其他體液，尤其唾液及精液，性活動或共用被受感染血液污染之針來傳播。

【0083】 慢性B型肝炎(CHB)感染為肝硬化及肝細胞癌(HCC)之最常見病因，每年估計有500,000-900,000例死亡。持續HBV複製增加了惡化成硬化及HCC之風險。

【0084】 C型肝炎病毒(HCV)為最初經鑑別為非A型、非B型肝炎之主要慢性肝感染之致病因子。HCV已感染美國約四百萬人及全世界1.7億人，多達HIV的約四倍且占歸因於輸血之肝炎的90%至95%。據推測，主要感染途徑係經由與來自受感染個人之受污染體液，尤其血液接觸。HCV感染係美國及其他國家之肝移植之主要病因之一。美國大致40%-50%肝移植係基於HCV感染。該疾病通常惡化成慢性肝損傷。儘管HCV感染病變主要影響肝，但在包括周邊血液淋巴球之身體內之其他細胞類型中發現病毒。

【0085】 HCV為黃病毒科C型肝炎病毒屬之RNA病毒，且與瘟疫病毒、BVDV及GBV-B最密切相關。HCV基因體由長度為大致9.6 kb之RNA之單一正股構成。HCV基因體具有編碼具有約3,000個胺基酸之聚合蛋白的連續轉譯開放閱讀框架(ORF)。(多種)結構蛋白似乎經編碼於ORF之N端區域之大致前四分之一中，剩餘部分編碼非結構蛋白。聚合蛋白充當至少10種對於後代病毒粒子之複製及組裝至關重要之獨立病毒蛋白的前驅體。HCV聚合蛋白中結構蛋白及非結構蛋白之組織如下：C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b。

【0086】 D型肝炎病毒(HDV)為視B型肝炎表面抗原而定、用於組

裝其外膜且形成傳播感染之新病毒體的衛星RNA病毒。HDV具有1.7 Kb小基因體，使其成為最小的已知人類病毒。D型肝炎環狀基因體由於GC核苷酸含量高而為動物病毒中所獨有。然而，HDV為最嚴重形式之病毒性肝炎。與病毒性肝炎之其他因子相比，急性HDV感染更常常與爆發性肝炎相關，爆發性肝炎係肝大部分受到破壞之快速進行性、常常致命的疾病形式。慢性D型肝炎之特徵通常在於壞死性發炎病變，類似於慢性HBV感染，但更嚴重，且常常快速惡化成硬化及肝衰竭，此解釋了慢性HDV感染與終末期肝病之不對稱關聯。儘管HDV感染比單獨HBV影響人數更少，但所造成之急性或慢性肝衰竭為歐洲以及北美洲之肝移植的常見適應症。慢性HDV疾病影響全世界1500萬人，其中約70,000人為美國人。疾病控制中心(Centers for Disease Control)估計美國每年有1,000例因HDV感染所致之死亡。

【0087】 HDV病毒體由核糖核蛋白核心及外膜構成。該核心含有HDV-RNA及D型肝炎抗原(HDAg)，HDAg係由此病毒編碼之唯一蛋白質。該外膜由B型肝炎輔助病毒(helper virus)之表面抗原蛋白(B型肝炎表面抗原或HBsAg)形成。該套膜為由HBV提供之唯一輔助官能基。HDV能夠在不存在HBV之情況下在細胞內複製其RNA，但需要HBsAg用於封裝及釋放HDV病毒體以及用於獲得感染性。由於HDV依賴於HBV，因此HDV僅與HBV聯合感染個人。

【0088】 E型肝炎病毒(HEV)為E型肝炎之病因，E型肝炎係在世界上許多資源有限區域流行的急性病毒性肝炎形式。據估計，作為世界人口約三分之一的約20億人在HEV流行區域生活且處於感染風險下。在此等區域，E型肝炎為急性肝炎之主要形式；在印度，例如約50%之急性肝炎

歸因於HEV。

【0089】 HEV係尺寸為27-34 nm之非包膜小病毒且經分類為肝炎病毒科之肝炎病毒。HEV基因體為具有5'-甲基鳥嘌呤端帽及3'多(腺苷)延伸段之~7.2 kb正義單股RNA，且含有三個部分重疊之開放閱讀框架(ORF)—稱為orf1、orf2及orf3。作為具有1693個胺基酸之聚合蛋白的HEV orf1編碼病毒性非結構官能基。於HEV非結構聚合蛋白中鑑別到之功能域包括(始於N端)-甲基轉移酶(MeT)、類木瓜酶半胱胺酸蛋白酶(PCP)、RNA解螺旋酶(Hel)及RNA依賴性RNA聚合酶(RdRp)。HEV orf2編碼具有660個胺基酸之病毒衣殼蛋白，咸信該病毒衣殼蛋白對病毒RNA基因體包衣殼。咸信HEV orf3表現114個胺基酸蛋白質，該蛋白質對於活體外複製而言為非必需的且咸信其充當病毒輔助蛋白(viral accessory protein)，此可能影響宿主對感染之反應。

【0090】 如HCV之GBV-C或G型肝炎病毒(HGV)屬於黃病毒科。GBV-C分佈在全球，其中在美國供給者群體中高度盛行，且類似於HCV及HBV，其可藉由受污染血液輸注及性接觸來擴散。當前，GBV-C可僅藉由利用聚合酶鏈反應偵測其於血清中之RNA來加以診斷。相對於急性或慢性肝炎而言GBV-C感染之臨床意義未得到充分理解，但其他證據優勢表明GBV-C不對人類造成肝炎。該病毒基因體由具有正極性之單鏈RNA表示。GBV-C基因體在其組織方面與HCV RNA類似，亦即結構基因位於基因體5'區處且非結構基因位於3'端處。5'端處之非轉譯區可充當內部核糖體裝載(embarkation)位點，從而確保RNA編碼區之轉譯。

B型肝炎病毒(HBV)

【0091】 如本文所使用之「B型肝炎病毒」或「HBV」係指肝去氧

核糖核酸病毒科之特定病毒。HBV為編碼四個開放閱讀框架及七種蛋白質之(例如3.2 kb)親肝性小DNA病毒。七種由HBV編碼之蛋白質包括小型(S)、中型(M)及大型(L)表面抗原(HBsAg)或外膜(Env)蛋白、前核心蛋白、核心蛋白、病毒聚合酶(Pol)及HBx蛋白。HBV表現三種表面抗原或外膜蛋白，亦即L、M及S，其中S最小，且L最大，且M中等。L蛋白包括Pre-S1-Pre-S2-S域，M蛋白包括Pre-S2-S域，且S蛋白僅包括S域。核心蛋白為病毒核衣殼之亞單元。Pol為病毒DNA (反轉錄酶、核糖核酸酶H及引子)合成所需，該合成發生在位於受感染肝細胞之細胞質之核衣殼中。前核心為具有N端信號肽之核心蛋白，且在自受感染細胞分泌之前在其N端及C端處經蛋白分解加工為所謂的B型肝炎e抗原(HBeAg)。HBx蛋白為共價閉合環狀DNA (cccDNA)有效轉錄所需。HBx不為病毒結構蛋白。除共用mRNA之核心及聚合酶外，所有HBV病毒蛋白皆具有其自身mRNA。除前核心蛋白之外，該等HBV病毒蛋白中無一者進行轉譯後蛋白水解加工。

【0092】 HBV病毒體含有病毒外膜、核衣殼及部分雙股DNA基因體之單一複本。核衣殼包含120個核心蛋白二聚體且由嵌入有S、M及L病毒外膜或表面抗原蛋白之脂膜覆蓋。在進入細胞之後，病毒包衣經去除，且具有經共價結合之病毒聚合酶的含衣殼松環DNA (rcDNA)遷移至核中。在該過程期間，核心蛋白磷酸化誘導結構變化，從而暴露核定位信號，使得衣殼能夠與所謂的內輸蛋白(importin)相互作用。此等內輸蛋白介導核心蛋白與核孔複合物之結合，在該結合後，衣殼解離且聚合酶/rcDNA複合物經釋放至核中。在核內，rcDNA變得去蛋白化(移除聚合酶)且由宿主DNA修復機制轉化成共價閉合環狀DNA (cccDNA)基因體(經

由添加組織蛋白及其他宿主因子來進一步轉化成微型染色體)，自此，重疊轉錄物編碼HBeAg、HBsAg、核心蛋白、病毒聚合酶及HBx蛋白。核心蛋白、病毒聚合酶及前基因體RNA (pgRNA)在細胞質中締合且自組裝成不成熟的含pgRNA衣殼粒子，該等粒子進一步轉化為成熟rcDNA-衣殼且充當共同中間物，該共同中間物經包膜且分泌為感染性病毒粒子或轉運回到核中以補充且維持穩定cccDNA池。

【0093】 迄今為止，HBV基於外膜蛋白上存在之抗原性抗原決定基而分成四種血清型(adr、adw、ayr、ayw)，且基於病毒基因體之序列而分成八種基因型(A、B、C、D、E、F、G及H)。近來已鑑別出兩種新基因型I及J。HBV基因型分佈在不同地理區域。舉例而言，亞洲最盛行的基因型為基因型B及C。基因型D主要存在於非洲、中東及印度，而基因型A廣泛分佈於北歐、撒哈拉以南非洲及西非。

【0094】 如本文所使用之患有「慢性HBV感染」、「慢性B型肝炎病毒(CHB)感染」、「CHB」、「CHB感染」或「CHB病毒感染」之患者或個體係指此項技術中之一般含義，更尤其指代慢性感染HBV且在HBV偵測之後在血液中存在可偵測HBsAg (伴隨或不伴隨HBeAg)達六個月或更長時間的患者或個體。CHB感染可經分類為四個階段，其通常但非始終自一階段發展至下一階段：(I) HBeAg陽性之慢性感染(先前稱為免疫耐受型)、(II) HBeAg陽性之慢性肝炎(先前稱為免疫活性型)、(III) HBeAg陰性之慢性感染(先前稱為非活性攜帶者型)及(IV) HBeAg陰性之慢性肝炎(先前稱為再活化型)。慢性HBV感染之不同階段之特徵亦可在於病毒負荷、肝酶含量(壞死性發炎活動性)、HBeAg或HBsAg負荷或針對此等抗原之抗體存在的差異。即使病毒血症可能會顯著變化，但未經治療個

體之cccDNA含量保持相對恆定，每個細胞大致10至50個複本，但當藉由核苷(核苷酸)類似物療法加以抑制時，可低至每個細胞1至2個複本。cccDNA物種之持續性導致慢性。在一些實施例中，慢性HBV感染之特徵可在於由疾病控制與預防中心(Centers for Disease Control and Prevention；CDC)所公佈之實驗室準則，諸如：(i)對IgM針對B型肝炎核心抗原之抗體(IgM抗HBc)呈陰性，且對B型肝炎表面抗原(HBsAg)、B型肝炎e抗原(HBeAg)、或B型肝炎病毒DNA核酸試驗呈陽性，或(ii)對HBsAg、或HBV DNA核酸試驗呈陽性，或間隔至少6個月對HBeAg呈陽性兩次。

【0095】 在本申請案之一些實施例中，目標核酸序列係在HBV基因體內。在一些實施例中，TALE DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列。在本申請案之一些實施例中，目標核酸序列係在編碼HBV抗原之核酸序列內。在一些實施例中，TALE DNA結合域能夠結合至編碼HBV抗原之核酸序列內之目標核酸序列。在一些實施例中，目標核酸序列之第一半位點序列及第二半位點序列係在編碼HBV抗原之核酸序列內。在一些實施例中，TALE DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之半位點序列。在本申請案通篇，包含能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之TALE DNA結合域的TALEN單體亦稱為「HBV TALEN」。任何基因型之HBV基因體之核酸序列可為用於TALE DNA結合之目標核酸序列。在一些實施例中，目標核酸序列係在基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及J中之一或多者之HBV基因體內。在一些實施例中，HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G及H中之一或多者。

【0096】 在本申請案之一些實施例中，目標核酸序列係在編碼HBV核心蛋白之核酸序列內。在特定實施例中，TALE DNA結合域能夠結合至編碼HBV核心蛋白之核酸序列內之目標核酸序列。在一些實施例中，目標核酸序列之第一半位點序列及第二半位點序列係在編碼HBV核心蛋白之核酸序列內。

【0097】 在本申請案之一些實施例中，目標核酸序列係在編碼HBV聚合酶(pol)之核酸序列內。在特定實施例中，TALE DNA結合域能夠結合至編碼HBV pol之核酸序列內之目標核酸序列。在一些實施例中，目標核酸序列之第一半位點序列及第二半位點序列係在編碼HBV pol之核酸序列內。

【0098】 在本申請案之一些實施例中，目標核酸序列係在編碼HBV表面抗原(HBsAg)之核酸序列內。在特定實施例中，TALE DNA結合域能夠結合至編碼HBsAg之核酸序列內之目標核酸序列。在一些實施例中，目標核酸序列之第一半位點序列及第二半位點序列係在編碼HBsAg之核酸序列內。

TALEN

【0099】 類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)為藉由使TAL效應物DNA結合域與DNA裂解域融合而生成之人工限制酶。此等試劑使得能夠進行有效、可程式化及特異性DNA裂解且表示用於原位基因體編輯之強力工具。類轉錄活化子效應物(TALE)可經快速工程改造以實際上結合任何DNA序列。如本文所使用之術語TALEN為寬泛的且包括可在無另一TALEN輔助之情況下裂解雙股DNA之單體TALEN。術語TALEN亦用以指經工程改造以一起起作用來裂解同一位點處之DNA的一對TALEN之一

或兩個成員。一起起作用之TALEN可稱為左TALEN及右TALEN，此參考DNA之偏手性。參見美國序列號12/965,590；美國序列號13/426,991(美國專利第8,450,471號)；美國序列號13/427,040 (美國專利第8,440,431號)；美國序列號13/427,137 (美國專利第8,440,432號)；及美國序列號13/738,381，以上所有案皆以全文引用之方式併入本文中。

【0100】 TAL效應物為植物病原性黃單胞菌屬(*Xanthomonas*)細菌所分泌之蛋白質。DNA結合域含有具有33-34胺基酸序列之高度保存重複區段，第12及第13胺基酸除外。此兩個位置為高度可變的(稱為重複可變雙殘基(RVD))且顯示與特異性核苷酸識別之強相關性(參見圖1C)。胺基酸序列與DNA識別之間的此簡單關係允許藉由選擇含有適當RVD之重複區段組合來工程改造特異性DNA結合域。RVD中之略微變化及「非習知」RVD序列併入可改善靶向特異性。

【0101】 來自FokI核酸內切酶之末端之非特異性DNA裂解域可用於構築在酵母分析中具有活性之雜交核酸酶。此等試劑在植物細胞及動物細胞中亦具有活性。初始TALEN研究使用野生型FokI裂解域，但一些後續TALEN研究亦使用具有經設計以改善裂解特異性及裂解活性之突變的FokI裂解域變異體。FokI域充當二聚體，需要兩個具有獨特DNA結合域來在目標基因體中以適當取向及間距獲得位點的TALEN構築體。TALE DNA結合域與FokI裂解域(C端域)之間的胺基酸殘基數目以及兩個個別TALEN結合位點之間的鹼基(間隔子)數目兩者均為用於達成高位準活性之參數。C端域中、TALE DNA結合域與FokI裂解域之間的胺基酸殘基數目可藉由根據間隔序列中之鹼基數目引入或缺失胺基酸來加以修改。DNA目標序列中之間隔子可為約12至約30個核苷酸。

【0102】 胺基酸序列與TALE結合域之DNA識別之間的關係允許可設計之蛋白質。一旦已組裝TALEN基因，則可例如將其插入質體或病毒構築體中，隨後使用其來轉染其中基因產物經表現之目標細胞且進入核中以接近基因體。TALEN可用於藉由在DNA中誘導雙股斷裂(DSB)來編輯基因體。任何方法及任何方法組合均可用於例如在目標細胞中表現TALEN且實行基因體編輯。在一些實施例中，諸如質體DNA之包括一或多種TALEN基因之DNA經轉染至目標細胞中。細胞可經包括一或多種TALEN基因之一或多種質體轉染。在一些實施例中，目標細胞經遞送TALEN基因之病毒載體轉導。細胞可經一或多種病毒載體轉導，其中各病毒載體遞送一或多種TALEN基因。在一些實施例中，TALEN mRNA係藉由活體外轉錄(IVT)來製備。在一些實施例中，經活體外轉錄之TALEN mRNA經轉染至目標細胞中。細胞可經編碼一或多種TALEN基因之一或多種mRNA轉染。

【0103】 在一些實施例中，TAL核酸酶單體結合至目標核酸序列之兩個DNA半位點序列中之一個。較佳地，半位點序列係藉由間隔序列分隔開。此間距使得核酸酶催化域二聚合且在半位點序列之間的間隔序列中產生DSB。較佳地，第一半位點序列及第二半位點序列為不同序列且藉由間隔序列分隔開。

【0104】 在一些實施例中，DSB將誘導插入/缺失(indel)。如本文所使用之「插入/缺失」係指由插入、缺失或其組合導致之突變。如熟習此項技術者應瞭解，除非插入/缺失之長度為三之倍數，否則基因體序列之編碼區中之插入/缺失將導致框移突變。在一些實施例中，DSB將誘導點突變。如本文所使用之「點突變」係指取代核苷酸中之一者。較佳地，插

入/缺失或點突變係在目標核酸序列之間隔序列內。

【0105】 在一些實施例中，目標核酸序列裂解導致目標基因表現減少。在一些實施例中，目標基因表現減少為mRNA含量減少。在一些實施例中，目標基因表現減少為蛋白質含量減少或蛋白質功能減弱。術語「減少/減弱(decreased)」一般在本文中用於意謂統計學上顯著之減少量。然而，為了避免疑問，「減少/減弱」意謂與參考位準相比至少10%減少/減弱，例如與參考位準相比至少約20%、或至少約30%、或至少約40%、或至少約50%、或至少約60%、或至少約70%、或至少約75%、或至少約80%、或至少約90%減少/減弱，或至多且包括100%減少/減弱(亦即，與參考樣本相比不存在之位準)，或10%與100%之間的任何減少/減弱。參考位準可為例如未經治療之樣本或個體或經對照治療之樣本或個體的表現量。術語「統計學上顯著之」或「顯著地」係指統計學顯著性且一般意謂比標記物之正常濃度低兩個標準差(2個SD)或更多。該術語係指存在差值之統計跡象。其經定義為當虛無假設實際上為真時，作出拒絕虛無假設之決定的機率。常常使用p值作出決定。

【0106】 在一些實施例中，本發明之組合物或組合包含：第一TALEN單體，其包含第一TALE DNA結合域及第一核酸酶催化域，其中第一TALE DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之第一半位點序列；及第二TALEN單體，其包含第二TALE DNA結合域及第二核酸酶催化域，其中第二TALE DNA結合域能夠結合至目標核酸序列之第二半位點序列，其中當該第一TALE DNA結合域結合至該第一半位點序列且該第二TALE DNA結合域結合至該第二半位點序列時，該第一TALEN單體及該第二TALEN單體能夠形成裂解該目標核酸序列之二聚體。第一

TALEN單體及第二TALEN單體可經由其催化域形成二聚體。較佳地，該第一核酸酶催化域為第一FokI核酸酶催化域且該第二核酸酶催化域為第二FokI核酸酶催化域。較佳地，第一半位點序列及第二半位點序列為不同序列且藉由間隔序列分隔開。

【0107】 在一些實施例中，目標核酸序列係在編碼HBsAg及HBV聚合酶(pol)之序列內。較佳地，該目標核酸序列之該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 1之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且該目標核酸序列之該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 2之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列；或該目標核酸序列之該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 3之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且該目標核酸序列之該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 4之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，或該目標核酸序列包含與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之核酸序列至少90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列。

【0108】 在一些實施例中，第一TALE DNA結合域及第二TALE DNA結合域各自包含重複單元，且各重複單元包含決定目標核酸序列中之鹼基對之識別的具有兩個胺基酸之高變區，該高變區稱為重複可變雙殘基(RVD)。在一些實施例中，第一TALE DNA結合域及第二TALE DNA結

合域各自包含15至20個RVD，諸如15、16、17、18、19或20個RVD。

【0109】在一些實施例中，第一TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 7之胺基酸序列至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 7之胺基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列，且第二TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 8至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 8之胺基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列；或第一TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 9之胺基酸序列至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 9之胺基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列，且第二TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 10至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 10之胺基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列；且第一FokI核酸酶催化域及第二FokI核酸酶催化域各自包含與SEQ ID NO: 11至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 11之胺基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列。在一些實施例中，第一TALE DNA結合域包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列，第二TALE DNA結合域包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列，且第一FokI核酸酶催化域及第二FokI核酸酶催化域各自包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。在一些實施例中，第一TALE DNA結合域包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列，第二TALE DNA結合域包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列，且第一FokI核酸酶催化域及第二FokI核酸酶催化域各自包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。在一些實施例中，第一TALE DNA結合域由SEQ ID NO: 7

之胺基酸序列組成，第二TALE DNA結合域由SEQ ID NO: 8之胺基酸序列組成，且第一FokI核酸酶催化域及第二FokI核酸酶催化域各自由SEQ ID NO: 11之胺基酸序列組成。在一些實施例中，第一TALE DNA結合域由SEQ ID NO: 9之胺基酸序列組成，第二TALE DNA結合域由SEQ ID NO: 10之胺基酸序列組成，且第一FokI核酸酶催化域及第二FokI核酸酶催化域各自由SEQ ID NO: 11之胺基酸序列組成。

【0110】 在一些實施例中，各別地，第一類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體包含第一TALE DNA結合域及第一FokI核酸酶催化域，其中第一TALE DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之第一半位點序列，且第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且第二類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體包含第二TALE DNA結合域及第二FokI核酸酶催化域，其中第二TALE DNA結合域能夠結合至目標核酸序列之第二半位點序列，且第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，其中當第一TALE DNA結合域結合至第一半位點序列及第二TALE DNA結合域結合至第二半位點序列時，第一TALEN單體及第二TALEN單體能夠形成裂解目標核酸序列之二聚體。在一些實施例中，目標核酸序列係在基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及/或J中之一或多者中之HBV基因體內。在一些實施例中，HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G及/或H中之一或多者。

【0111】在一個態樣中，本申請案提供一種裂解HBV基因體中之目標核酸序列之方法，該方法包含使HBV基因體與本文所描述之任何組合物、組合、核酸分子、經分離宿主細胞或醫藥組合物接觸。在另一態樣中，本申請案提供一種誘導HBV基因體中之目標核酸序列之基因編輯的方法，該方法包含使HBV基因體與本文所描述之任何組合物、組合、核酸分子、經分離宿主細胞或醫藥組合物接觸。在一些實施例中，HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及J中之一或多者。在一些實施例中，HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G及H中之一或多者。

聚核苷酸及載體

【0112】在一通用態樣中，本申請案提供一種組合，該組合具有：第一核酸，較佳地第一mRNA分子，其包含編碼第一類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第一TALEN單體包含第一TALE DNA結合域及第一FokI核酸酶催化域，其中該第一TALE DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之第一半位點序列，且該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 1之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列；及第二核酸，較佳地第二mRNA分子，其包含編碼第二類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第二TALEN單體包含第二TALE DNA結合域及第二FokI核酸酶催化域，其中該第二TALE DNA結合域能夠結合至該目標核酸序列之第二半位點序列，且該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 2之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列；其中當該第一TALE DNA結合域結合至該第一半位點序列且該第二TALE DNA結合域結合至該第二半位點序列時，該第一TALEN單體及該第二TALEN單體能夠形成裂解該目標核酸序列之二聚體。

【0113】 核酸分子可包含編碼本申請案之HBV TALEN之任何非天然存在之聚核苷酸序列，該HBV TALEN可鑒於本發明使用此項技術中已知之方法來製造。聚核苷酸可呈RNA，較佳地mRNA之形式，或呈藉由重組技術(例如選殖)獲得或以合成(例如化學合成)方式產生之DNA之形式。DNA可為單股或雙股的，或可含有雙股序列及單股序列兩者之部分。DNA可例如包含基因體DNA、cDNA或其組合。聚核苷酸亦可為DNA/RNA雜交體。本申請案之聚核苷酸及載體可用於產生重組蛋白、在宿主細胞中表現蛋白質或產生病毒粒子。

【0114】 在另一通用態樣中，本申請案提供一種mRNA分子組合，該組合包含：第一mRNA分子，其包含編碼第一類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第一TALEN單體包含第一TALE DNA結合域及第一核酸酶催化域，其中該第一TALE DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之第一半位點序列；及第二mRNA分子，其包含編碼第二TALEN單體之聚核苷酸序列，該第二TALEN單體包含第二TALE DNA結合域及第二核酸酶催化域，其中該第二TALE DNA結合域能夠結合至該目標核酸序列之第二半位點序列；其中當該第一TALE DNA結合域結合至該第一半位點序列且該第二TALE DNA結合域結合至該第二半位點序列時，該第一TALEN單體及該第二TALEN單體能夠形成裂解該目標核酸序列之二聚體。

【0115】 較佳地，該第一核酸酶催化域為第一FokI核酸酶催化域且該第二核酸酶催化域為第二FokI核酸酶催化域。第一FokI核酸酶催化域及第二FokI核酸酶催化域可相同或不同。在一些實施例中，FokI核酸酶催化域包含與SEQ ID NO: 11之胺基酸序列至少約90%一致，諸如與SEQ ID NO: 11之胺基酸序列90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列。在一些實施例中，各FokI核酸酶催化域獨立地包含與SEQ ID NO: 11之胺基酸序列至少約90%一致，諸如與SEQ ID NO: 11之胺基酸序列90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列。在一些實施例中，各FokI核酸酶催化域由SEQ ID NO: 11之胺基酸序列組成。

【0116】 在一些實施例中，第一mRNA分子及第二mRNA分子各自進一步包含以下中之一或多者，較佳地全部：5'端帽、5'-UTR、編碼核定位信號之序列、編碼N端域之序列、編碼C端域之序列、3'-UTR及多腺苷尾。

【0117】 較佳地，如本文所描述之mRNA包含5'端帽。經各種基團加端帽之5'-端及其類似者為此項技術中已知的。存在於所有真核生物體(及一些病毒)中之mRNA之5'-端上之端帽結構對於活體內穩定mRNA而言至關重要。天然存在之端帽結構包含在鳥嘌呤鹼基之位置N7處甲基化之核糖-鳥苷殘基。此7-甲基鳥苷(m7G)在mRNA分子之5'-端處經由5'-鏈至5'-三磷酸酯鏈連接。5'-端上存在m7Gppp片段為mRNA成熟所必需，此係因為其保護mRNA免於核酸外切酶降解，便於將mRNA自核轉運至細胞質且在轉譯起始複合物組裝中發揮關鍵作用(Cell 9:645-653, (1976)；Nature 266:235, (1977)；Federation of Experimental Biologists Society

Letter 96:1-11, (1978)；Cell 40:223-24, (1985)；Prog. Nuc. Acid Res. 35:173-207, (1988)；Ann. Rev. Biochem. 68:913-963, (1999)；及J Biol. Chem. 274:30337-3040, (1999))。

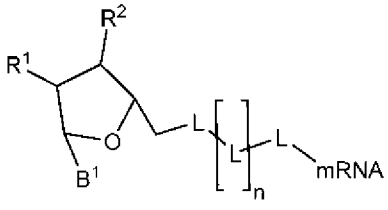
【0118】 僅攜帶端帽結構之彼等mRNA在端帽依賴性轉譯中具有活性；mRNA之「去頭(decapitation)」導致其用於蛋白質合成之模板活性幾乎完全損失(Nature, 255:33-37, (1975)；J. Biol. Chem., vol. 253:5228-5231, (1978)；及Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:1189-1193, (1975))。

【0119】 真核mRNA之另一要素為在轉錄位置1 (端帽1)處且在一些情況下在轉錄位置1及2 (端帽2)處存在2'-O-甲基核苷殘基。mRNA之2'-O-甲基化提供更高的mRNA活體內轉譯功效(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:3952-3956 (1980))且進一步改善加5'-端帽之mRNA之核酸酶穩定性。具有端帽1 (及端帽2)之mRNA為獨特標記物，使細胞識別真誠(bona fide) mRNA 5'端，且在一些情況下，排斥源自感染性遺傳元件之轉錄物(Nucleic Acid Research 43: 482-492 (2015))。

【0120】 5'端帽結構及製備包含其之mRNA之方法的一些實例在WO2015/051169A2、WO/2015/061491、US 2018/0273576及美國專利第8,093,367號、第8,304,529號及U.S. 10,487,105中給出。5'端帽可選自m7GpppA、m7GpppC；未甲基化端帽類似物(例如，GpppG)；二甲基化端帽類似物(例如，m2,7GpppG)、三甲基化端帽類似物(例如，m2,2,7GpppG)、二甲基化對稱端帽類似物(例如，m7Gpppm7G)或抗反向端帽類似物(例如，ARCA；m7, 2'OmeGpppG、m72'dGpppG、m7,3'OmeGpppG、m7,3'dGpppG及其四磷酸酯衍生物)(參見例如Jemielity, J.等人, RNA 9: 1108-1122 (2003)。5'端帽可為ARCA端帽(3'-

OMe-m7G(5')pppG)。5'端帽可為mCAP (m7G(5')ppp(5')G、N7-甲基-鳥苷-5'-三磷酸酯-5'-鳥苷)。5'端帽可耐水解。在一些實施例中，5'端帽為此項技術中已知之m7GpppAmpG。在一些實施例中，5'端帽為此項技術中已知之m7GpppG或m7GpppGm。下文提供5'端帽結構之實施例之結構式。

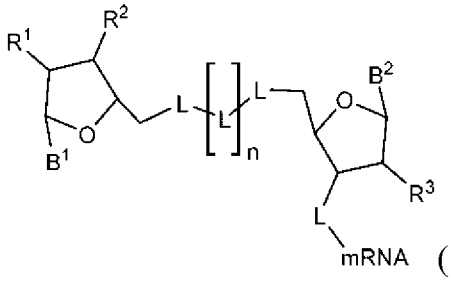
【0121】 在一些實施例中，本文所描述之mRNA包含具有下式結構(端帽I)之5'端帽：



(端帽I)

其中B^1為天然或經修飾之核鹼基；R^1及R^2各自獨立地選自鹵素、OH及OCH_3；各L獨立地選自由以下組成之群：磷酸酯、硫代磷酸酯及硼烷磷酸酯，其中各L藉由二酯鍵連接；n為0或1；且mRNA表示在其5'端處連接之本發明之mRNA。在一些實施例中，B^1為G、m^7G或A。在一些實施例中，n為0。在一些實施例中，n為1。在一些實施例中，B^1為A或m^6A且R^1為OCH_3；其中G為鳥嘌呤，m^7G為7-甲基鳥嘌呤，A為腺嘌呤且m^6A為N^6-甲基腺嘌呤。

【0122】 在一些實施例中，本文所描述之mRNA包含具有下式結構(端帽II)之5'端帽：

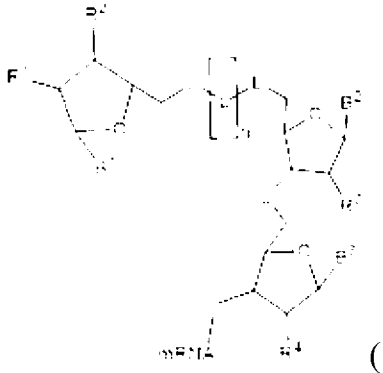


(端帽II)

其中B^1及B^2各自獨立地為天然或經修飾之核鹼基；R^1、R^2及R^3各自

獨立地選自鹵素、OH及OCH_3；各L獨立地選自由以下組成之群：磷酸酯、硫代磷酸酯及硼烷磷酸酯，其中各L藉由二酯鍵連接；mRNA表示在其5'端處連接之本發明之mRNA；且n為0或1。在一些實施例中，R^1、R^2及R^3中之至少一者為OH。在一些實施例中，B^1為G、m^7G或A。在一些實施例中，n為0。在一些實施例中，n為1。在一些實施例中，B^1為A或m^6A且R^1為OCH_3；其中G為鳥嘌呤，m^7G為7-甲基鳥嘌呤，A為腺嘌呤且m^6A為N^6-甲基腺嘌呤。

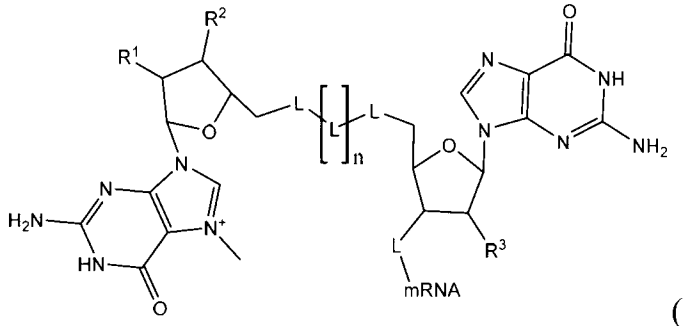
【0123】 在一些實施例中，本文所描述之mRNA包含具有下式結構(端帽III)之5'端帽：



(端帽III)

其中B^1、B^2及B^3各自獨立地為天然或經修飾之核鹼基；R^1、R^2、R^3及R^4各自獨立地選自鹵素、OH及OCH_3；各L獨立地選自由以下組成之群：磷酸酯、硫代磷酸酯及硼烷磷酸酯，其中各L藉由二酯鍵連接；mRNA表示在其5'端處連接之本發明之mRNA；n為0或1。在一些實施例中，R^1、R^2、R^3及R^4中之至少一者為OH。在一些實施例中，B^1為G、m^7G或A。在一些實施例中，B^1為A或m^6A且R^1為OCH_3；其中G為鳥嘌呤，m^7G為7-甲基鳥嘌呤，A為腺嘌呤且m^6A為N^6-甲基腺嘌呤。在一些實施例中，n為1。

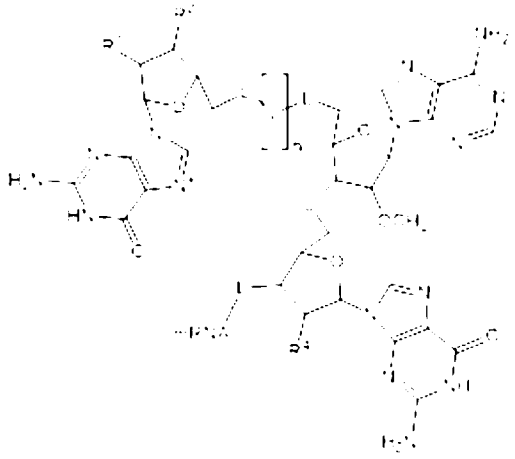
【0124】 在一些實施例中，本文所描述之mRNA包含具有下式結構(端帽IV)之m7GpppG 5'端帽類似物：



(端帽IV)

其中R^1、R^2及R^3各自獨立地選自鹵素、OH及OCH_3；各L獨立地選自由以下組成之群：磷酸酯、硫代磷酸酯及硼烷磷酸酯，其中各L藉由二酯鍵連接；mRNA表示在其5'端處連接之本發明之mRNA；且n為0或1。在一些實施例中，R^1、R^2及R^3中之至少一者為OH。在一些實施例中，5'端帽為m^7GpppG，其中R^1、R^2及R^3各自為OH，n為1，且各L為磷酸酯。在一些實施例中，n為1。在一些實施例中，5'端帽為m7GpppGm，其中R^1及R^2各自為OH，R^3為OCH_3，各L為磷酸酯，mRNA為在其5'端處連接之本發明之CFTR mRNA，且n為1。

【0125】 在一些實施例中，本文所描述之mRNA包含具有下式結構(端帽V)之m7GpppAmpG 5'端帽類似物：



(端帽V)

其中R^1、R^2及R^4各自獨立地選自鹵素、OH及OCH_3；各L獨立地選自由以下組成之群：磷酸酯、硫代磷酸酯及硼烷磷酸酯，其中各L藉由二酯鍵連接；mRNA表示在其5'端處連接之本發明之mRNA；且n為0或1。在

一些實施例中，R^1、R^2及R^4中之至少一者為OH。在一些實施例中，式端帽V化合物為m^7GpppAmpG，其中R^1、R^2及R^4各自為OH，n為1，且各L為磷酸酯。在一些實施例中，n為1。

【0126】較佳地，本文所描述之mRNA進一步包含5'非轉譯區(UTR)序列。如此項技術中所理解，5'-UTR及/或3'-UTR可影響mRNA之轉譯穩定性或效率。5'-UTR可衍生自此項技術中已知之相對穩定之mRNA分子(例如組織蛋白、微管蛋白、球蛋白、甘油醛1-磷酸去氫酶(GAPDH)、肌動蛋白或檸檬酸循環酶)以提高可轉譯寡聚物之穩定性。在其他實施例中，5'-UTR序列可包括巨細胞病毒(CMV)早發性1 (IE1)基因之部分序列。

【0127】較佳地，5'-UTR包含選自以下之5'-UTR之序列：人類IL-6、丙胺酸胺基轉移酶1、人類脂蛋白元E、人類纖維蛋白原α鏈、人類甲狀腺素運載蛋白、人類結合球蛋白、人類α-1-抗胰凝乳蛋白酶、人類抗凝血酶、人類α-1-抗胰蛋白酶、人類白蛋白、人類β球蛋白、人類補體C3、人類補體C5、SynK (衍生自集胞藻屬(Synechocystis sp.)藍綠菌(cyanobacteria)之類囊體鉀通道蛋白)、小鼠β球蛋白、小鼠白蛋白及菸草蝕刻病毒，或前述任一者之片段。較佳地，5'-UTR衍生自菸草蝕刻病毒(TEV)。較佳地，本文所描述之mRNA包含衍生自由阿拉伯芥(Arabidopsis thaliana)表現之基因的5'-UTR序列。較佳地，由阿拉伯芥表現之基因的5'-UTR序列為AT1G58420。較佳5'-UTR序列包含SEQ ID NO: 12-17。較佳地，5'-UTR序列包含SEQ ID NO: 13 (AT1G58420)。

【0128】較佳地，如本文所描述之mRNA包含3'-UTR。較佳地，3'-UTR包含選自以下之3'-UTR之序列：丙胺酸胺基轉移酶1、人類脂蛋白元

E、人類纖維蛋白原α鏈、人類結合球蛋白、人類抗凝血酶、人類α球蛋白、人類β球蛋白、人類補體C3、人類生長因子、人類海帕西啶(hepcidin)、MALAT-1、小鼠β球蛋白、小鼠白蛋白及爪蟾屬(Xenopus) β球蛋白，或前述任一者之片段。較佳地，3'-UTR衍生自爪蟾屬β球蛋白。較佳3'-UTR序列包括SEQ ID NO: 18-24。

【0129】 較佳地，如本文所描述之mRNA包含可用以保護mRNA免於核酸外切酶降解之3'尾區。該尾區可為3'多(腺苷)區及/或3'多(胞苷)區。較佳地，該尾區為3'多(腺苷)尾。如本文所使用之「3'多(腺苷)尾(3'poly(A) tail)」或「多腺苷尾(poly adenosine tail)」為尺寸可在例如以下範圍內之連續腺苷核苷酸之聚合物：10至250個連續腺苷核苷酸；60-125個連續腺苷核苷酸；90-125個連續腺苷核苷酸；95-125個連續腺苷核苷酸；95-121個連續腺苷核苷酸；100-121個連續腺苷核苷酸；110-121個連續腺苷核苷酸；112-121個連續腺苷核苷酸；114-121個連續腺苷核苷酸；及115-121個連續腺苷核苷酸。較佳地，如本文所描述之3'多腺苷尾包含90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124或125個連續腺苷核苷酸。3'多(腺苷)尾可使用此項技術中已知之各種方法添加，例如使用多(腺苷)聚合酶來將尾添加至合成或經活體外轉錄之RNA中。其他方法包括使用轉錄載體以編碼多腺苷尾或使用接合酶(例如，經由使用T4 RNA接合酶及/或T4 DNA接合酶進行之夾板接合(splint ligation))，其中多(腺苷)可接合至有義RNA之3'端。較佳地，利用以上方法中之任一者之組合。

【0130】 在一些實施例中，第一mRNA分子及第二mRNA分子各自包含5'端帽、5'-UTR、編碼核定位信號之序列、編碼N端域之序列、編碼DNA結合域之序列、編碼核酸酶催化域之序列、編碼C端域之序列、3'-UTR及多腺苷尾。在一些實施例中，第一mRNA分子及第二mRNA分子各自包含5'端帽、5'-UTR、編碼N端域之序列、編碼DNA結合域之序列、編碼核酸酶催化域之序列、編碼C端域之序列、3'-UTR及多腺苷尾。在一些實施例中，第一mRNA分子及第二mRNA分子各自包含5'端帽、5'-UTR、編碼核定位信號之序列、編碼N端域之序列、編碼DNA結合域之序列、編碼C端域之序列、3'-UTR及多腺苷尾。在一些實施例中，第一mRNA分子及第二mRNA分子各自包含5'端帽、5'-UTR、編碼N端域之序列、編碼DNA結合域之序列、編碼C端域之序列、3'-UTR及多腺苷尾。

【0131】 本申請案亦關於一種載體，該載體包含編碼HBV TALEN之核酸組合。如本文所使用之「載體」為用於將遺傳物質攜帶至另一細胞中之核酸分子，在該另一細胞中該核酸分子可經複製及/或表現。可鑒於本發明使用熟習此項技術者已知之任何載體。載體之實例包括但不限於質體、病毒載體(噬菌體、動物病毒及植物病毒)、黏質體及人工染色體(例如YAC)。較佳地，載體為DNA質體。載體可為DNA載體或RNA載體。一般熟習此項技術者可鑒於本發明經由標準重組技術構築本申請案之載體。

【0132】 本申請案之載體可為表現載體。如本文所使用之術語「表現載體」係指包含編碼能夠經轉錄之RNA之核酸的任何類型之基因構築體。表現載體包括但不限於用於重組蛋白表現之載體，諸如DNA質體或病毒載體；及用於將核酸遞送至個體中以在個體組織中表現之載體，諸如

DNA質體或病毒載體。熟習此項技術者應瞭解，表現載體之設計可視諸如待轉型宿主細胞之選擇、所需蛋白質之表現量等因素而定。

【0133】本申請案之載體可含有各種調節序列。如本文所使用之術語「調節序列」係指允許、促進或調節核酸分子之功能性調節之任何序列，該功能性調節包括核酸或其衍生物(亦即mRNA)中之一者至宿主細胞或生物體中之複製(replication/duplication)、轉錄、剪接、轉譯、穩定性及/或轉運。在本發明之上下文中，此術語涵蓋啟動子、強化子及其他表現控制元件(例如多腺苷酸化信號及影響mRNA穩定性之元件)。

【0134】在本申請案之一些實施例中，載體為非病毒載體。非病毒載體之實例包括但不限於DNA質體、細菌人工染色體、酵母人工染色體、噬菌體等。較佳地，非病毒載體為DNA質體。「DNA質體」與「DNA質體載體」、「質體DNA」或「質體DNA載體」可互換使用，係指能夠在合適的宿主細胞中自主複製之雙股且大體上圓形之DNA序列。用於表現經編碼之聚核苷酸之DNA質體通常包含複製起點、多選殖位點及可選擇標記物，該可選擇標記物例如可為抗生素抗性基因。可使用之合適的DNA質體之實例包括但不限於用於熟知表現系統(包括原核系統及真核系統兩者)中之市售表現載體，諸如pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.)，其可用於大腸桿菌中之蛋白質生產及/或表現；pYES2 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)，其可用於釀酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)酵母菌株中之生產及/或表現；MAXBAC®完全桿狀病毒表現系統(Thermo Fisher Scientific)，其可用於昆蟲細胞中之生產及/或表現；pcDNA™或pcDNA3™ (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific)，其可用於哺乳動物細胞中之高位準組成性蛋白質表

現；及pVAX或pVAX-1 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific)，其可用於大部分哺乳動物細胞中之所關注之蛋白質的高位準短暫表現。任何市售DNA質體之骨幹均可藉由使用常規技術及容易獲得之起始物質加以修飾以使宿主細胞中之蛋白質表現最佳化，以便反轉某些元件(例如複製起點及/或抗生素抗性卡匣)之取向，置換質體內源性啟動子(例如抗生素抗性卡匣中之啟動子)，及/或置換編碼經轉錄蛋白之聚核苷酸序列(例如抗生素抗性基因之編碼序列)。(參見例如Sambrook等人, Molecular Cloning a Laboratory Manual, 第二版 Cold Spring Harbor Press (1989))。

【0135】 較佳地，DNA質體為適用於哺乳動物宿主細胞中之蛋白質表現之表現載體。適用於哺乳動物宿主細胞中之蛋白質表現之表現載體包括但不限於pcDNA™、pcDNA3™、pVAX、pVAX-1、ADVAX、NTC8454等。較佳地，表現載體係基於pVAX-1，pVAX-1可進一步經修飾以使哺乳動物細胞中之蛋白質表現最佳化。pVAX-1為DNA疫苗中之常用質體，且含有較強的人類早發性巨細胞病毒(CMV-IE)啟動子、接著為牛生長激素(bGH)衍生之多腺苷酸化序列(pA)。pVAX-1進一步含有pUC複製起點及由允許細菌質體繁殖之小原核啟動子驅動的康黴素抗性基因。

【0136】 本申請案之載體亦可為病毒載體。一般而言，病毒載體為攜帶經修飾病毒DNA或RNA之經基因工程改造之病毒，該經修飾病毒DNA或RNA已呈現非感染性，但仍含有病毒啟動子及轉殖基因，由此允許經由病毒啟動子轉譯轉殖基因。因為病毒載體通常缺乏感染性序列，因此其需要輔助病毒或封裝株來進行大規模轉染。在某些實施例中，如本文所描述之載體為例如重組腺病毒、重組反轉錄病毒、諸如痘瘡病毒(例如改良型安卡拉牛痘(Modified Vaccinia Ankara，MVA))之重組痘病毒、諸

如勝利基森林病毒(Semliki forest virus)之重組α病毒、諸如重組麻疹病毒之重組副黏液病毒或另一重組病毒。可使用之病毒載體之實例包括但不限於腺病毒載體、腺相關病毒載體、痘病毒載體、腸病毒載體、委內瑞拉馬腦炎病毒(Venezuelan Equine Encephalitis virus)載體、勝利基森林病毒載體、菸草嵌紋病毒(Tobacco Mosaic Virus)載體、慢病毒載體等。在某些實施例中，如本文所描述之載體為MVA載體。該載體亦可為非病毒載體。

【0137】 在一些實施例中，病毒載體為腺相關病毒(AAV)載體。術語「AAV」包括諸如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV 5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、rh10及其雜交體、禽類AAV、牛類AAV、犬類AAV、馬類AAV、靈長類動物AAV、非靈長類動物AAV及綿羊類AAV的任何血清型之AAV及任何物種之AAV。在一些實施例中，病毒載體為例如重組腺病毒載體之腺病毒載體。重組腺病毒載體可例如衍生自人類腺病毒(HAdV或AdHu)或諸如黑猩猩或大猩猩腺病毒(ChAd、AdCh或SAdV)或恆河猴腺病毒(rhAd)之猴腺病毒。較佳地，腺病毒載體為例如重組人類腺病毒血清型26、或重組人類腺病毒血清型5、4、35、7、48等中之任一者的重組人類腺病毒載體。在其他實施例中，腺病毒載體為例如rhAd51、rhAd52或rhAd53之rhAd載體。可用於本申請案中之重組病毒載體可鑒於本發明使用此項技術中已知之方法來製備。舉例而言，鑒於遺傳密碼之簡併，可設計出編碼相同多肽之若干核酸序列。編碼本申請案之HBV TALEN之聚核苷酸可視情況經密碼子最佳化以確保在宿主細胞(例如細菌或哺乳動物細胞)中適當表現。密碼子最佳化為此項技術中廣泛應用之技術，且獲得經密碼子最佳化之聚核苷酸之方法

將為熟習此項技術者鑒於本發明所熟知。

【0138】 例如DNA質體或病毒載體(尤其AAV，諸如AAV7、AAV8、AAV9或具有肝向性之任何其他AAV，包括雜交AAV，或腺病毒載體)之本申請案之載體可包含用以建立載體之(多種)習知功能的任何調節元件，該(等)習知功能包括但不限於由載體之聚核苷酸序列編碼之(多種) HBV TALEN之複製及表現。調節元件包括但不限於啟動子、強化子、多腺苷酸化信號、轉譯終止密碼子、核糖體結合元件、轉錄終止子、選擇標記物、複製起點等。載體可包含一或多個表現卡匣。「表現卡匣」為引導細胞機制製造RNA及蛋白質之載體之一部分。表現卡匣通常包含三種組件：啟動子序列、開放閱讀框架及視情況包含多腺苷酸化信號之3'-非轉譯區(UTR)。開放閱讀框架(ORF)為含有自起始密碼子至終止密碼子之所關注之蛋白質(例如HBV TALEN)之編碼序列的閱讀框架。表現卡匣之調節元件以可操作方式連接至編碼所關注之HBV TALEN之聚核苷酸序列。如本文所使用之術語「以可操作方式連接」係以其最廣泛合理的內容採用，且係指呈功能關係之聚核苷酸元件之鍵聯。當一聚核苷酸與另一聚核苷酸處於功能關係時，其係「以可操作方式連接」。舉例而言，若啟動子影響編碼序列之轉錄，則其以可操作方式連接至編碼序列。適用於本文所描述之表現卡匣中之任何組件均可依任何組合形式且按任何次序使用，來製備本申請案之載體。

【0139】 載體可包含啟動子序列，較佳地在表現卡匣內之啟動子序列，以控制所關注之HBV TALEN之表現。術語「啟動子」係以其習知意義使用，且係指引發以可操作方式連接之核苷酸序列之轉錄的核苷酸序列。啟動子位於其所轉錄之核苷酸序列附近之相同股上。啟動子可為組成

性、可誘導或可壓制的。啟動子可為天然存在的或合成的。啟動子可衍生自包括病毒、細菌、真菌、植物、昆蟲及動物之來源。啟動子可為同源啟動子(亦即，衍生自與載體相同之基因來源)或異源啟動子(亦即，衍生自不同載體或基因來源)。舉例而言，若待採用之載體為DNA質體，則啟動子可為質體內源性的(同源性)或衍生自其他來源(異源性)。較佳地，該啟動子位於表現卡匣內編碼HBV TALEN之聚核苷酸的上游。

【0140】可使用之啟動子之實例包括但不限於來自猴病毒40(SV40)之啟動子、小鼠乳房腫瘤病毒(MMTV)啟動子、諸如人類免疫缺乏病毒(HIV)或牛免疫缺乏病毒(BIV)長末端重複序列(LTR)啟動子之慢病毒啟動子、莫洛尼病毒(Moloney virus)啟動子、禽類白血病病毒(ALV)啟動子、諸如CMV早發性(CMV-IE)啟動子之巨細胞病毒(CMV)啟動子、艾司坦-巴爾病毒(Epstein Barr virus，EBV)啟動子或勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus，RSV)啟動子。啟動子亦可為來自諸如人類肌動蛋白、人類肌凝蛋白、人類血紅素、人類肌肉肌酸或人類金屬硫蛋白之人類基因的啟動子。啟動子亦可為天然或合成的諸如肌肉或皮膚特異性啟動子之組織特異性啟動子。

【0141】載體可包含使經表現之轉錄物穩定，增強RNA轉錄物之核輸出、及/或改善轉錄-轉譯偶聯之額外聚核苷酸序列。該等序列之實例包括多腺苷酸化信號及強化子序列。多腺苷酸化信號通常位於載體之表現卡匣內所關注之蛋白質(例如HBV TALEN)之編碼序列的下游。強化子序列為在與轉錄因子結合時增強相關基因之轉錄的調節性DNA序列。強化子序列較佳地位於載體之表現卡匣內編碼HBV TALEN之聚核苷酸序列的上游，但位於啟動子序列的下游。

【0142】 可鑒於本發明使用熟習此項技術者已知之任何多腺苷酸化信號。舉例而言，多腺苷酸化信號可為SV40多腺苷酸化信號、LTR多腺苷酸化信號、牛生長激素(bGH)多腺苷酸化信號、人類生長激素(hGH)多腺苷酸化信號或人類β-球蛋白多腺苷酸化信號。

【0143】 可鑒於本發明使用熟習此項技術者已知之任何強化子序列。舉例而言，強化子序列可為人類肌動蛋白、人類肌凝蛋白、人類血紅素、人類肌肉肌酸或諸如來自CMV、HA、RSV或EBV之強化子的病毒強化子。特定強化子之實例包括但不限於土拔鼠HBV轉錄後調節元件(WPRE)、衍生自人類脂蛋白元A1前驅體(ApoAI)之內含子/外顯子序列、1型人類T細胞白血病病毒(HTLV-1)長末端重複序列(LTR)之非轉譯R-U5域、剪接強化子、合成兔β-球蛋白內含子或其任何組合。

【0144】 載體可包含編碼用於蛋白質定位之信號肽序列的聚核苷酸序列。較佳地，編碼信號肽序列之聚核苷酸序列位於例如N端區中編碼HBV TALEN之聚核苷酸序列的上游。較佳地，信號序列為可引導TALEN蛋白定位至核以便於進行DNA結合及編輯之核定位信號(NLS)序列。可鑒於本發明使用此項技術中已知之任何信號肽。舉例而言，信號肽可為SV40大T抗原NLS (PKKKRKV) (SEQ ID NO: 31)、核質蛋白NLS (KRPAATKKAGQAKKKK) (SEQ ID NO: 32)、EGL-13 NLS (MSRRRKANPTKLSENAKKLAKEVEN) (SEQ ID NO: 33)、*c-Myc*原致癌蛋白NLS (PAAKRVKLD) (SEQ ID NO: 34)或TUS蛋白NLS (KLKIKRPVK) (SEQ ID NO: 35)。

【0145】 載體可包含編碼多肽或肽親和標籤之聚核苷酸序列，該多肽或肽親和標籤例如為麩胱甘肽S-轉移酶(GST)、綠色螢光蛋白(GFP)及

諸如黃色螢光蛋白(YFP)及mCherry之其他螢光蛋白，例如麥芽糖結合蛋白、蛋白A、FLAG標籤(例如DYKDDDDK (SEQ ID NO: 36)或EYKEEEEK (SEQ ID NO: 37)、六×組胺酸(例如HHHHHH) (SEQ ID NO: 38)、myc標籤(例如EQKLISEEDL) (SEQ ID NO: 39)、流行性感冒HA標籤(例如YPYDVPDYA) (SEQ ID NO: 40)、AcV5標籤(SWKDASGWS) (SEQ ID NO: 41)、ALFA-標籤(例如SRLEEELRRRLTE) (SEQ ID NO: 42)、Avi標籤(例如GLNDIFEAQKIEWHE) (SEQ ID NO: 43)、E-標籤(例如GAPVPYPDPLEPR) (SEQ ID NO: 44)、S-標籤(例如KETAAAKFERQHMDS) (SEQ ID NO: 45)、Strep-標籤(例如Strep-標籤II：WSHPQFEK) (SEQ ID NO: 46)、T7標籤(例如MASMTGGQQMG) (SEQ ID NO: 47)、Ty1標籤(例如EVHTNQDPLD) (SEQ ID NO: 48)、V5標籤(例如GKPIPNPLLGLDST) (SEQ ID NO: 49)、VSV-G標籤(例如YTDIEMNRLGK) (SEQ ID NO: 50)或Xpress標籤(例如DLYDDDDK) (SEQ ID NO: 51)，以便於進行純化及/或偵測。親和標籤或報導融合體將所關注之多肽(例如HBV TALEN)之閱讀框架接合至編碼親和標籤之基因之閱讀框架以使得生成轉譯融合體。融合基因之表現引起包括所關注之多肽(例如HBV TALEN)及親和標籤兩者之單一多肽的轉譯。在利用親和標籤之一些情況下，編碼蛋白酶識別位點之DNA序列將在親和標籤及所關注之多肽(例如HBV TALEN)之閱讀框架之間融合。

【0146】 諸如DNA質體之載體亦可包括細菌複製起點及用於例如大腸桿菌之細菌細胞中之質體選擇及維持的抗生素抗性表現卡匣。細菌複製起點及抗生素抗性卡匣可以與編碼HBV TALEN之表現卡匣相同之取向或以相對(反向)取向位於載體中。複製起點(ORI)為作為複製起始之處之序

列，使得質體能夠在細胞內複製及存活。適用於本申請案中之ORI之實例包括但不限於ColE1、pMB1、pUC、pSC101、R6K及15A，較佳地pUC。

【0147】 用於細菌細胞中之選擇及維持之表現卡匣通常包括以可操作方式連接至抗生素抗性基因之啟動子序列。較佳地，以可操作方式連接至抗生素抗性基因之啟動子序列不同於以可操作方式連接至編碼例如HBV TALEN之所關注之蛋白質之聚核苷酸序列的啟動子序列。抗生素抗性基因可經密碼子最佳化，且抗生素抗性基因之序列組成通常針對例如大腸桿菌之細菌密碼子使用加以調整。可鑒於本發明使用熟習此項技術者已知之任何抗生素抗性基因，包括但不限於康黴素抗性基因(Kan^r)、安比西林(ampicillin)抗性基因(Amp^r)及四環素抗性基因(Tet^r)以及賦予氯黴素(chloramphenicol)、博萊黴素(bleomycin)、觀黴素(spectinomycin)、卡本西林(carbenicillin)等抗性之基因。

【0148】 編碼本申請案之HBV TALEN之聚核苷酸及表現載體可鑒於本發明藉由此項技術中已知之任何方法來製造。舉例而言，可使用熟習此項技術者所熟知之例如聚合酶鏈反應(PCR)等之標準分子生物學技術將編碼HBV TALEN之聚核苷酸引入或「選殖」至表現載體中。

【0149】 如本文所使用之術語相對於核酸或多肽序列之「一致性百分比」或「同源性」或「共有序列一致性」或「序列一致性百分比(%)」經定義為在比對序列以獲得最大一致性百分比且在必要時引入空隙以達成最大同源性百分比之後候選序列中之核苷酸或胺基酸殘基與已知聚核苷酸或多肽之一致性百分比。N端或C端插入或缺失不應解釋為影響同源性，且具有少於約30個、少於約20個或少於約10個或少於5個胺基酸殘基之核

苷酸或多肽序列中之內部缺失及/或插入不應解釋為影響同源性。可藉由BLAST (鹼基局部比對檢索工具)分析，使用經調適用於序列類似性檢索之blastp、blastn、blastx、tblastn及tblastx程式(Altschul (1997), Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402，及Karlin (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2264-2268)所採用之演算法來測定核苷酸或胺基酸序列位準下之同源性或一致性。BLAST程式所使用之方法為首先考慮查詢序列與資料庫序列之間的具有及不具有空隙之類似區段，隨後評估經鑑別之所有匹配之統計顯著性，且最後僅彙總彼等滿足預選顯著性臨限值之匹配。對於序列資料庫之類似性檢索中基本問題之論述，參見Altschul (1994), Nature Genetics 6, 119-129。直方圖、描述、比對、預期(亦即用於報導與資料庫序列匹配之統計顯著性臨限值)、截止值、矩陣及過濾器(低複雜度)的檢索參數可處於預設設定下。blastp、blastx、tblastn及tblastx所使用之預設評分矩陣為經推薦用於長度超過85 (核苷酸鹼基或胺基酸)之查詢序列的BLOSUM62矩陣(Henikoff (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919)。

【0150】 對於經設計用於比較核苷酸序列之blastn，評分矩陣由M (亦即一對匹配殘基之獎勵分數)與N (亦即錯配殘基之懲罰分數)之比率設定，其中M及N之預設值可分別為+5及-4。四個blastn參數可如下調整：Q = 10 (空隙產生罰分)；R = 10 (空隙擴展罰分)；wink = 1 (沿著查詢在每個winkth位置處生成字命中)；及gapw = 16 (設定其內生成空隙式比對之窗口寬度)。用於比較胺基酸序列之等效Blastp參數設定可為：Q = 9；R = 2；wink = 1；及gapw = 32。在GCG套裝10.0版中可用之序列之間的BESTFIT®比較可使用DNA參數GAP = 50 (空隙產生罰分)及LEN = 3 (空

隙擴展罰分)，且蛋白質比較中之等效設定可為GAP = 8及LEN = 2。

【0151】 在揭示本文中之核酸或多肽序列時，例如HBV TALEN單體、TALE DNA結合域、核酸酶催化域、目標序列、間隔序列、調節元件、非轉譯區、強化子序列、啟動子之序列亦經揭示為視為基於或衍生自原始序列的序列。因此揭示之序列包括分別與諸如SEQ ID NO: 1-55之本文所描述之任何聚核苷酸或多肽序列之全長聚核苷酸或多肽序列及其片段具有至少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%或至少85%序列一致性，例如與其具有至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%、或85-99%、或85-95%、或90-99%、或95-99%、或97-99%、或98-99%序列一致性的聚核苷酸或多肽序列。亦揭示本文所揭示之序列中之任一者之片段或部分。序列之片段或部分可包括具有至少5個、或至少7個、或至少10個、或至少20個、或至少30個、至少50個、至少75個、至少100個、至少125個、150個或更多個、或5-10個、或10-12個、或10-15個、或15-20個、或20-40個、或20-50個、或30-50個、或30-75個、或30-100個完整序列之胺基酸或核酸殘基、或至少100個、或至少200個、或至少300個、或至少400個、或至少500個、或至少600個、或至少700個、或至少800個、或至少900個、或至少1000個、或100-200個、或100-500個、或100-1000個、或500-1000個胺基酸或核酸殘基、或此等量中之任一者、但少於500個、或少於700個、或少於1000個、或少於2000個本文所揭示之SEQ ID NO: 1-55中之任一者或任何片段之連續胺基酸或核酸的序列。亦揭示該等序列之變異體及編碼該等變異體

之核酸序列，例如其中至少一個或兩個或三個或四個或五個胺基酸殘基已在N端及/或C端插入所揭示之含有插入及取代之(多個)序列之處及/或之內。所考慮之變異體可另外或替代地包括含有藉由例如同源重組或定點或PCR突變誘發產生之預定突變的變異體，以及其他物種之對應多肽或核酸，包括但不限於：本文所描述之多肽或核酸、含有插入及取代之多肽或核酸家族之對偶基因或其他天然存在之變異體；及/或其中多肽已藉由取代、化學方式、酶促或其他適當方式經除含有插入及取代之天然存在之胺基酸外的部分(例如可偵測部分，諸如酶)共價修飾的衍生物。本文所描述之核酸序列可為mRNA序列。

【0152】 如本文所使用之術語「非天然存在之」、「重組」或「經工程改造之」核酸分子或聚核苷酸序列係指已經由人工干預改變之核酸分子或非天然存在之聚核苷酸序列。作為非限制性實例，重組核酸分子：1)已例如使用化學或酶促技術(例如藉由使用化學核酸合成或藉由使用用於核酸分子之複製、聚合、核酸外切酶消化、核酸內切酶消化、接合、反轉錄、轉錄、鹼基修飾(包括例如甲基化)或重組(包括同源及位點特異性重組)之酶)活體外合成或修飾；2)包括在自然界中未結合之結合核苷酸序列；3)已使用分子選殖技術加以工程改造以使得其相對於天然存在之核酸分子序列不具有一或多個核苷酸；及/或4)已使用分子選殖技術加以操縱以使得其相對於天然存在之核酸序列具有一或多個序列變化或重排。作為非限制性實例，cDNA為重組DNA分子，正如已藉由(多個)活體外聚合酶反應生成或已與連接子連接或已整合至諸如選殖載體或表現載體之載體中的任何核酸分子。

基於脂質之調配物

【0153】 基於將核酸胞內遞送至目標細胞之療法面向胞外障礙及胞內障礙兩者。實際上，裸核酸物質由於其毒性、於血清中之低穩定性、快速腎清除、經減少之目標細胞吸收、吞噬細胞吸收及其活化免疫反應之能力而無法容易地全身性投與，以上所有特點皆妨礙其臨床發展。當外源性核酸物質(例如mRNA)進入人類生物系統中時，其經網狀內皮系統(RES)識別為外來病原體且在可能遇到血管系統內或外之目標細胞之前自血液循環清除。據報導，血流中之裸核酸之半衰期為約幾分鐘(Kawabata K, Takakura Y, Hashida M, Pharm Res. 1995年6月; 12(6):825-30)。化學修飾及適當遞送方法可減少RES吸收且保護核酸免於普遍存在之核酸酶降解，從而提高基於核酸之療法的穩定性及功效。另外，RNA或DNA為對細胞吸收不利之陰離子親水性聚合物，該等細胞在表面處亦為陰離子的。因此，基於核酸之療法之成功很大程度上視可高效地且有效地將遺傳物質遞送至目標細胞且在最低毒性之情況下獲得充分的活體內表現量的媒劑或載體之研發而定。

【0154】 此外，在內化至目標細胞中後，核酸遞送載體受到包括胞內體截留、溶酶體降解、自載體進行之核酸解封裝、跨核膜易位(對於DNA)及細胞質處之釋放(對於RNA)的胞內障礙攻擊。因此，成功的基於核酸之療法視載體將核酸遞送至細胞內部之目標位點以獲得充分位準之諸如基因表現之所需活性的能力而定。

【0155】 儘管若干基因療法已能夠成功地利用病毒遞送載體(例如AAV)，但基於脂質之調配物已由於其生物相容性及其大規模生產容易性而愈來愈被公認為係用於RNA及其他核酸化合物之最有前景之遞送系統中的一者。當帕替斯喃(Patisiran) (ALN-TTR02)為經食品及藥物管理局

(Food and Drug Administration，FDA)及歐洲委員會(European Commission，EC)兩者批准之第一siRNA治療劑時，基於脂質之核酸療法之最顯著進步中之一者出現在2018年8月。ALN-TTR02為基於所謂的穩定核酸脂質粒子(SNALP)轉染技術之siRNA調配物。儘管帕替斯喃已成功，但包括mRNA之核酸治療劑經由脂質調配物進行之遞送仍正在發展。

【0156】 根據各種實施例，用於核酸治療劑之一些此項技術中公認之脂質調配型遞送媒劑包括諸如以下之基於聚合物之載劑：聚乙二亞胺(PEI)、含類脂質調配物、脂質奈米粒子及脂質體、奈米脂質體、含神經醯胺奈米脂質體、多囊泡脂質體、蛋白脂質體、天然胞外體及以合成方式衍生之胞外體兩者、天然板層體、合成板層體及半合成板層體、奈米微粒、微胞及乳液。

【0157】 此等脂質調配物之結構及組成改變，且如快速演化領域中可預期，此項技術中已使用若干不同術語來描述單一類型之遞送媒劑。同時，用於脂質調配物之術語在整個科學文獻中通常合併(conflated)，且此不一致使用造成了與用於脂質調配物之若干術語之準確含義的混淆。在若干潛在脂質調配物中，出於本發明之目的，脂質體、陽離子脂質體及脂質奈米粒子尤其在本文中經特定地詳細描述及定義。

脂質-mRNA調配物

【0158】 如本文所揭示之mRNA、其醫藥學上可接受之鹽及/或編碼HBV TALEN之核酸組合可併入脂質調配物(亦即，基於脂質之遞送媒劑)中。

【0159】 在本發明之上下文中，基於脂質之遞送媒劑通常用以將所需mRNA分子或mRNA分子組合轉運至目標細胞或組織。基於脂質之遞送

媒劑可為此項技術中已知之任何合適的基於脂質之遞送媒劑。在一些實施例中，基於脂質之遞送媒劑為含有本發明之mRNA分子或mRNA分子組合之脂質體、陽離子脂質體或脂質奈米粒子。在一些實施例中，基於脂質之遞送媒劑包含奈米粒子或脂質分子雙層及本發明之mRNA分子或mRNA分子組合。在一些實施例中，脂質雙層較佳地進一步包含中性脂質或聚合物。術語「中性脂質」意謂在所選pH下以不帶電或中性兩性離子形式存在之脂質物種。在生理pH下，該等脂質包括例如二醯基磷脂醯膽鹼、二醯基磷脂醯乙醇胺、神經醯胺、神經鞘磷脂、腦磷脂、膽固醇、腦苷脂及二醯基甘油。在一些實施例中，脂質調配物較佳地包含液體介質。在一些實施例中，調配物較佳地進一步囊封核酸。在一些實施例中，脂質調配物較佳地進一步包含核酸及中性脂質或聚合物。在一些實施例中，脂質調配物較佳地囊封核酸。

【0160】 本說明書提供包含經囊封於脂質調配物內之一或多種治療性mRNA分子的脂質調配物。在一些實施例中，脂質調配物包含脂質體。在一些實施例中，脂質調配物包含陽離子脂質體。在一些實施例中，脂質調配物包含脂質奈米粒子。

【0161】 在一些實施例中，mRNA分子或mRNA分子組合經完全囊封於脂質調配物之脂質部分內以使得脂質調配物中之mRNA分子或mRNA分子組合在水溶液中耐核酸酶降解。術語「經完全囊封」意謂核酸-脂質粒子中之核酸(例如mRNA)在暴露於血清或顯著降解游離RNA之核酸酶分析之後不顯著降解。當經完全囊封時，在處理時較佳地小於25%之粒子中之核酸降解，該處理通常使100%之粒子中之游離核酸降解，更佳地小於10%且最佳地小於5%之核酸降解。如本文所使用之「經完全囊封」亦意

謂核酸-脂質粒子在活體內投與後不會快速分解成其組成部分。在其他實施例中，本文所描述之脂質調配物對諸如人類之哺乳動物實質上無毒。在一些實施例中，mRNA分子組合經囊封於同一脂質奈米粒子內。在一些實施例中，mRNA分子組合中之各mRNA分子經獨立地囊封於個別脂質奈米粒子中。

【0162】 本發明之脂質調配物亦通常具有約1:1至約100:1、約1:1至約50:1、約2:1至約45:1、約3:1至約40:1、約5:1至約38:1、或約6:1至約40:1、或約7:1至約35:1、或約8:1至約30:1、或約10:1至約25:1、或約8:1至約12:1、或約13:1至約17:1、或約18:1至約24:1、或約20:1至約30:1之總脂質:RNA比(質量/質量比)。在一些較佳實施例中，總脂質:RNA比(質量/質量比)為約10:1至約25:1。該比率可為所敍述範圍內之任何值或子值，包括端點值。

【0163】 本發明之脂質調配物通常具有約30 nm至約150 nm、約40 nm至約150 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約130 nm、約70 nm至約110 nm、約70 nm至約100 nm、約80 nm至約100 nm、約90 nm至約100 nm、約70至約90 nm、約80 nm至約90 nm、約70 nm至約80 nm、或約30 nm、約35 nm、約40 nm、約45 nm、約50 nm、約55 nm、約60 nm、約65 nm、約70 nm、約75 nm、約80 nm、約85 nm、約90 nm、約95 nm、約100 nm、約105 nm、約110 nm、約115 nm、約120 nm、約125 nm、約130 nm、約135 nm、約140 nm、約145 nm或約150 nm之平均直徑，且實質上無毒。該直徑可為所敍述範圍內之任何值或子值，包括端點值。另外，當核酸存在於本發明之脂質奈米粒子中時，核酸在水溶液中耐核酸酶降解。

【0164】 在較佳實施例中，脂質調配物包含mRNA分子或mRNA分子組合、陽離子脂質(例如，一或多種本文所描述之陽離子脂質或其鹽)、磷脂及抑制粒子聚集之結合脂質(例如，一或多種PEG-脂質結合物)。脂質調配物亦可包括膽固醇。術語「脂質結合物」意謂抑制脂質粒子聚集之結合脂質。該等脂質結合物包括但不限於諸如以下之PEG-脂質結合物：與二烷氧基丙基偶合之PEG (例如PEG-DAA結合物)、與二醯基甘油偶合之PEG (例如PEG-DAG結合物)、與膽固醇偶合之PEG、與磷脂醯乙醇胺偶合之PEG及與神經醯胺結合之PEG、陽離子PEG脂質、聚噁唑啉(POZ)-脂質結合物、聚醯胺寡聚物及其混合物。PEG或POZ可直接結合至脂質或可經由連接子部分連接至脂質。可使用包括例如非含酯連接子部分及含酯連接子部分的適用於使PEG或POZ與脂質偶合之任何連接子部分。在某些較佳實施例中，使用諸如醯胺或胺基甲酸酯之非含酯連接子部分。

【0165】 如本文所使用之術語「陽離子脂質」係指具有正親水性頭基之兩親脂質及其鹽；一個、兩個、三個或更多個疏水性(亦即，具有非極性基團)脂肪酸或脂肪烷基鏈；及此兩個域之間的連接子。可離子化或可質子化陽離子脂質通常在低於其pK_a之pH下質子化(亦即，帶正電)且在高於pK_a之pH下為實質上中性的。較佳可離子化陽離子脂質為pKa小於通常為約7.4之生理pH的可離子化陽離子脂質。本發明之陽離子脂質亦可稱為可滴定陽離子脂質。陽離子脂質可為具有可質子化三級胺(例如pH可滴定)頭基之「胺基脂質」。一些胺基例示性胺基脂質可包括C_{18}烷基鏈，其中各烷基鏈獨立地具有0至3個(例如，0、1、2或3個)雙鍵；及頭基與烷基鏈之間的醚、酯或縮酮鍵。該等陽離子脂質包括但不限於DSDMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMA、γ-DLenDMA、DLin-K-DMA、DLin-K-C2-DMA (亦稱為DLin-C2K-DMA、XTC2及C2K)、DLin-K-C3

-DM A、DLin-K-C4-DMA、DLen-C2K-DMA、y-DLen-C2K-DMA、DLin-M-C2-DMA (亦稱為MC2)、DLin-M-C3 -DMA (亦稱為MC3)及(DLin-MP- DMA)(亦稱為1-Bl 1)。

【0166】 如本文所使用之術語「陰離子脂質」係指在生理pH下帶負電之脂質。此等脂質包括但不限於磷脂醯甘油、心磷脂、二醯基磷脂醯絲胺酸、二醯基磷脂酸、N-十二醯基磷脂醯乙醇胺、N-丁二醯基磷脂醯乙醇胺、N-戊二醯基磷脂醯乙醇胺、離胺醯基磷脂醯甘油、棕櫚醯基油醯基磷脂醯甘油(POPG)及與中性脂質接合之其他陰離子修飾基團。

【0167】 在核酸-脂質調配物中，mRNA分子或mRNA分子組合可經完全囊封於調配物之脂質部分內，由此保護核酸免於核酸酶降解。在較佳實施例中，包含mRNA分子或mRNA分子組合之脂質調配物經完全囊封於脂質調配物之脂質部分內，由此保護核酸免於核酸酶降解。在某些情況下，脂質調配物中之mRNA分子或mRNA分子組合在37℃下使粒子暴露於核酸酶至少20、30、45或60分鐘之後未實質上降解。在某些其他情況下，脂質調配物中之mRNA分子或mRNA分子組合在37℃下在血清中培育調配物至少30、45或60分鐘或至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34或36小時之後未實質上降解。在其他實施例中，mRNA分子或mRNA分子組合與調配物之脂質部分複合。

【0168】 在核酸之情況下，完全囊封可藉由執行膜不可滲透之螢光染料排除分析來加以測定，該分析使用在與核酸締合時具有經增強之螢光的染料。囊封係藉由以下來加以測定：向脂質調配物中添加染料，量測所得螢光，且將所得螢光與在添加少量非離子清潔劑後所觀測到之螢光進行比較。清潔劑介導之脂質層破裂釋放經囊封之核酸，從而使其與膜不可滲

透之染料相互作用。核酸囊封可經計算為$E = (I_0 - I)/I_0$，其中I及I_0係指添加清潔劑之前及之後的螢光強度。

【0169】 在其他實施例中，本發明提供一種核酸-脂質組合物，其包含複數種核酸-脂質體、核酸-陽離子脂質體或核酸-脂質奈米粒子。在一些實施例中，核酸-脂質組合物包含複數種mRNA-脂質體。在一些實施例中，核酸-脂質組合物包含複數種mRNA-陽離子脂質體。在一些實施例中，核酸-脂質組合物包含複數種mRNA-脂質奈米粒子。

【0170】 在一些實施例中，脂質調配物包含經完全囊封於調配物之脂質部分內之mRNA分子或mRNA分子組合以使得約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約30%至約95%、約40%至約95%、約50%至約95%、約60%至約95%、約70%至約95%、約80%至約95%、約85%至約95%、約90%至約95%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%、或至少約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%或約99% (或其任何分率或其中之範圍)之粒子具有經囊封於其中之mRNA分子或mRNA分子組合。該量可為所敍述範圍內之任何值或子值，包括端點值。

【0171】 視脂質調配物之預期用途而定，組分比例可變化，且特定調配物之遞送效率可使用此項技術中已知之分析來量測。

【0172】 根據一些實施例，本文所描述之可表現聚核苷酸及mRNA構築體係脂質調配的。脂質調配物較佳地選自但不限於脂質體、陽離子脂質體及脂質奈米粒子。在一個較佳實施例中，脂質調配物為包含以下之陽

離子脂質體或脂質奈米粒子(LNP)：

(a)本發明之mRNA分子或mRNA分子組合，

(b)陽離子脂質，

(c)聚集減少劑(諸如聚乙二醇(PEG)脂質或經PEG修飾之脂質)，

(d)視情況選用之非陽離子脂質(諸如中性脂質)，及

(e)視情況選用之固醇。

【0173】 較佳地，囊封mRNA分子或mRNA分子組合之脂質奈米粒子包含陽離子脂質及至少一種選自由陰離子脂質、兩性離子脂質、中性脂質、類固醇、聚合物結合型脂質、磷脂、醣脂及其組合組成之群之其他脂質。

【0174】 在一些實施例中，陽離子脂質為可離子化陽離子脂質。在一個實施例中，脂質奈米粒子調配物由以下組成：(i)至少一種陽離子脂質；(ii)輔助脂質；(iii)固醇(例如膽固醇)；及(iv) PEG-脂質，其莫耳比為約20%至約40%可離子化陽離子脂質:約25%至約45%輔助脂質:約25%至約45%固醇；約0.5-5% PEG-脂質。本文在下文描述例示性陽離子脂質(包括可離子化陽離子脂質)、輔助脂質(例如中性脂質)、固醇及含配位體脂質(例如PEG-脂質)。

【0175】 特異性脂質及其相對組成%之選擇視包括所需治療作用、預期活體內遞送目標以及計劃給藥方案及頻率之若干因素而定。一般而言，對應於高效力(亦即，治療作用，諸如基因表現減弱(knockdown)活性或轉譯效率)及引起快速組織清除之可生物降解性兩者的脂質係最佳的。然而，可生物降解性對於意欲用於個體內僅一或兩次投與之調配物而言可能不太重要。另外，脂質組合物可能需要謹慎的工程改造以使得脂質調配物在活體內投與期間保持其形態及其朝向預期目標之行程，但隨後將能夠

在被吸收至目標細胞中後釋放活性劑。因此，通常需要評估若干調配物以便發現呈最佳可能脂質莫耳比以及總脂質:活性成分比之最佳可能脂質組合。

【0176】 合適的脂質組分及製造脂質奈米粒子之方法為此項技術中熟知的且描述於例如PCT/US2020/023442、U.S. 8,058,069、U.S. 8,822,668、U.S. 9,738,593、U.S. 9,139,554、PCT/US2014/066242、PCT/US2015/030218、PCT/2017/015886及PCT/US2017/067756中，該等案之內容以引用之方式併入。

陽離子脂質

【0177】 脂質調配物較佳地包括適用於形成陽離子脂質體或脂質奈米粒子之陽離子脂質。廣泛研究陽離子脂質之核酸遞送，此係因為其可結合至帶負電之膜且誘導吸收。一般而言，陽離子脂質為含有正親水性頭基、兩個(或更多個)親脂性尾或類固醇部分及此兩個域之間的連接子的兩親體。較佳地，陽離子脂質在約生理pH下攜帶淨正電荷。陽離子脂質體傳統上為用於包括質體DNA、反義寡核苷酸及siRNA/小髮夾RNA-shRNA之寡核苷酸之最常用的非病毒遞送系統。諸如DOTAP (1,2-二油醯基-3-三甲銨-丙烷)及DOTMA (N-[1-(2,3-二油醯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基-甲基硫酸銨)之陽離子脂質可藉由靜電相互作用與帶負電之核酸一起形成複合物或脂複合體，從而提供高活體外轉染效率。

【0178】 在本發明所揭示之脂質調配物中，陽離子脂質可為例如N,N-二油基-N,N-二甲基氯化銨(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化銨(DDAB)、1,2-二油醯基三甲基丙烷氯化銨(DOTAP) (亦稱為N-(2,3-二油醯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨及1,2-二油氧基-3-三甲胺基丙烷氯鹽)、N-(1-(2,3-二油氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)、N,N-

二甲基-2,3-二油氧基)丙胺(DODMA)、1,2-二亞油氧基-N,N-二甲胺基丙烷(DLinDMA)、1,2-二次亞麻氧基-N,N-二甲胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二-y-次亞麻氧基-N,N-二甲胺基丙烷(γ-DLenDMA)、1,2-二亞油基胺甲醯氧基-3-二甲胺基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亞油氧基-3-(二甲胺基)乙醯氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亞油氧基-3-(N-味啉基)丙烷(DLin-MA)、1,2-二亞油醯基-3-二甲胺基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亞油基硫基-3-二甲胺基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亞油醯基-2-亞油氧基-3-二甲胺基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亞油氧基-3-三甲胺基丙烷氯鹽(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亞油醯基-3-三甲胺基丙烷氯鹽(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亞油氧基-3-(N-甲基哌咁基)丙烷(DLin-MPZ)或3-(N,N-二亞油基胺基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油基胺基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亞油基側氧基-3-(2-N,N-二甲胺基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、2,2-二亞油基-4-二甲胺基甲基-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K-DMA)或其類似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)四氫-3aH-環戊并[d][1,3]間二氧雜環戊烯-5-胺、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲胺基)丁酸酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(雙(2-羥基十二基)胺基)乙基)(2-羥基十二基)胺基)乙基)哌咁-1-基)乙基氮烷二基)二十二-2-醇(C12-200)、2,2-二亞油基-4-(2-二甲胺基乙基)-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K-C2-DMA)、2,2-二亞油基-4-二甲胺基甲基-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K-DMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七-6,9,28 31-四烯-19-基4-(二甲胺基)丁酸酯(DLin-M-C3-DMA)、3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七-6,9,28,3 1-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(MC3醚)、4-((6Z,9Z,28Z,31 Z)-三十七-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丁-1-胺(MC4醚)或其任何組合。其他陽離子脂質包括但不限於N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化銨(DDAB)、3P-(N-

(N',N'-二甲胺基乙烷)-胺甲醯基)膽固醇(DC-Choi)、N-(1-(2,3-二油氧基)丙基)-N-2-(精胺甲醯胺基)乙基)-N,N-二甲基三氟乙酸銨(DOSPA)、二(十八烷基)醯胺基甘胺醯基羧基精胺(DOGS)、1,2-二油醯基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油醯基-3-二甲基銨丙烷(DODAP)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥乙基溴化銨(DMRIE)及2,2-二亞油基-4-二甲胺基乙基-[1,3]-二氧雜環戊烷(XTC)。另外，可使用諸如脂質體(LIPOFECTIN) (包括可獲自GIBCO/BRL之DOTMA及DOPE)及脂染胺(Lipofectamine) (包含可獲自GIBCO/BRL之DOSPA及DOPE)的商用陽離子脂質製劑。

【0179】其他合適的陽離子脂質揭示於國際公開案第WO 09/086558號、第WO 09/127060號、第WO 10/048536號、第WO 10/054406號、第WO 10/088537號、第WO 10/129709號及第WO 2011/153493號；美國專利公開案第2011/0256175號、第2012/0128760號及第2012/0027803號；美國專利第8,158,601號；及Love等人, PNAS, 107(5), 1864-69, 2010中，該等案及該文獻之內容以引用之方式併入本文中。

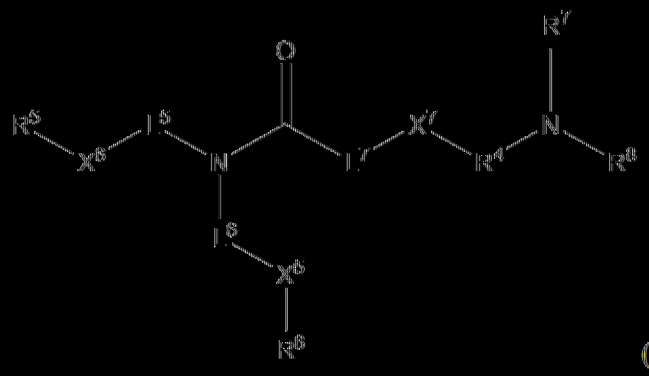
【0180】其他合適的陽離子脂質包括具有替代性脂肪酸基團及其他二烷胺基之陽離子脂質，包括其中烷基取代基不同(例如，N-乙基-N-甲胺基-及N-丙基-N-乙胺基-)之陽離子脂質。此等脂質為稱為胺基脂質之陽離子脂質之子類別的一部分。在本文所描述之脂質調配物之一些實施例中，陽離子脂質為胺基脂質。一般而言，具有不太飽和之醯基鏈之胺基脂質更易於定尺寸，尤其在必須將複合物尺寸定為小於約0.3微米時，以用於過濾器滅菌之目的。可使用含有不飽和脂肪酸之胺基脂質，其中碳鏈長度在C_{14}至C_{22}範圍內。其他骨架亦可用於分離胺基脂質之胺基及脂肪酸或脂肪

烷基部分。

[0181] 在一典實施例中，脂質調配物包含根據專利申請案PCT/EP2017/064066之式I陽離子脂質。在此上下文中，PCT/EP2017/064066之揭示內容亦以引用之方式併入本文中。

[0182] 在一典實施例中，本發明之胺基或陽離子脂質係可離子化的且具有至少一個可質子化或可去質子化基團，以使得脂質在處於或低於生理pH (例如pH 7.4)之pH下為帶正電的，且在較佳地處於或高於生理pH之第二pH下為中性的。當然，應理解，隨pH而變之質子之添加或移除為平衡過程，且提及帶電或中性脂質係指主導性物種之性質且不需要所有脂質皆以帶電或中性形式存在。具有超過一個可質子化或可去質子化基團或為兩性離子之脂質不排除在本發明中之使用之外。在某典實施例中，可質子化脂質之可質子化基團之pKa在約4至約11範圍內。在一典實施例中，可離子化陽離子脂質之pKa為約5至約7。在一典實施例中，可離子化陽離子脂質之pKa為約6至約7。

[0183] 在一典實施例中，脂質調配物包含式I可離子化陽離子脂質：



(I)

或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物，其中R^5及R^6各自獨立地選自由直鏈或分支鏈C_1-C_{31}烷基、C_2-C_{31}烯基或C_2-C_{31}炔基及膽固醇基組成之群；L^5及L^6各自獨立地選自由直鏈C_1-C_{20}烷基及C_2-C_{20}烯基組成之群；X^5

為-C(O)O-，由此形成-C(O)O-R^6，或X^5為-OC(O)-，由此形成-OC(O)-R^6；X^6為-C(O)O-，由此形成-C(O)O-R^5，或X^6為-OC(O)-，由此形成-OC(O)-R^5；X^7為S或O；L^7不存在或為低碳數烷基；R^4為直鏈或分支鏈C_1-C_6烷基；且R^7及R^8各自獨立地選自由氫及直鏈或分支鏈C_1-C_6烷基組成之群。

【0184】在一些實施例中，X^7為S。

【0185】在一些實施例中，X^5為-C(O)O-，由此形成-C(O)O-R^6，且X^6為-C(O)O-，由此形成-C(O)O-R^5。

【0186】在一些實施例中，R^7及R^8各自獨立地選自由甲基、乙基及異丙基組成之群。

【0187】在一些實施例中，L^5及L^6各自獨立地為C_1-C_{10}烷基。在一些實施例中，L^5為C_1-C_3烷基，且L^6為C_1-C_5烷基。在一些實施例中，L^6為C_1-C_2烷基。在一些實施例中，L^5及L^6各自為直鏈C_7烷基。在一些實施例中，L^5及L^6各自為直鏈C_9烷基。

【0188】在一些實施例中，R^5及R^6各自獨立地為烯基。在一些實施例中，R^6為烯基。在一些實施例中，R^6為C_2-C_9烯基。在一些實施例中，烯基包含單一雙鍵。在一些實施例中，R^5及R^6各自為烷基。在一些實施例中，R^5為分支鏈烷基。在一些實施例中，R^5及R^6各自獨立地選自由C_9烷基、C_9烯基及C_9炔基組成之群。在一些實施例中，R^5及R^6各自獨立地選自由C_{11}烷基、C_{11}烯基及C_{11}炔基組成之群。在一些實施例中，R^5及R^6各自獨立地選自由C_7烷基、C_7烯基及C_7炔基組成之群。在一些實施例中，R^5為-CH($(CH_2)_pCH_3$)$_2$或-CH($(CH_2)_pCH_3$)($(CH_2)_{p-1}CH_3$)，其中p為4-8。在一些實施例中，p為5且L^5為C_1-C_3烷基。在一些實施例中，p為6且L^5為C_3烷基。在一些實施例中，p為7。在一些實施例中，p為8且L^5為C_1-C_3烷

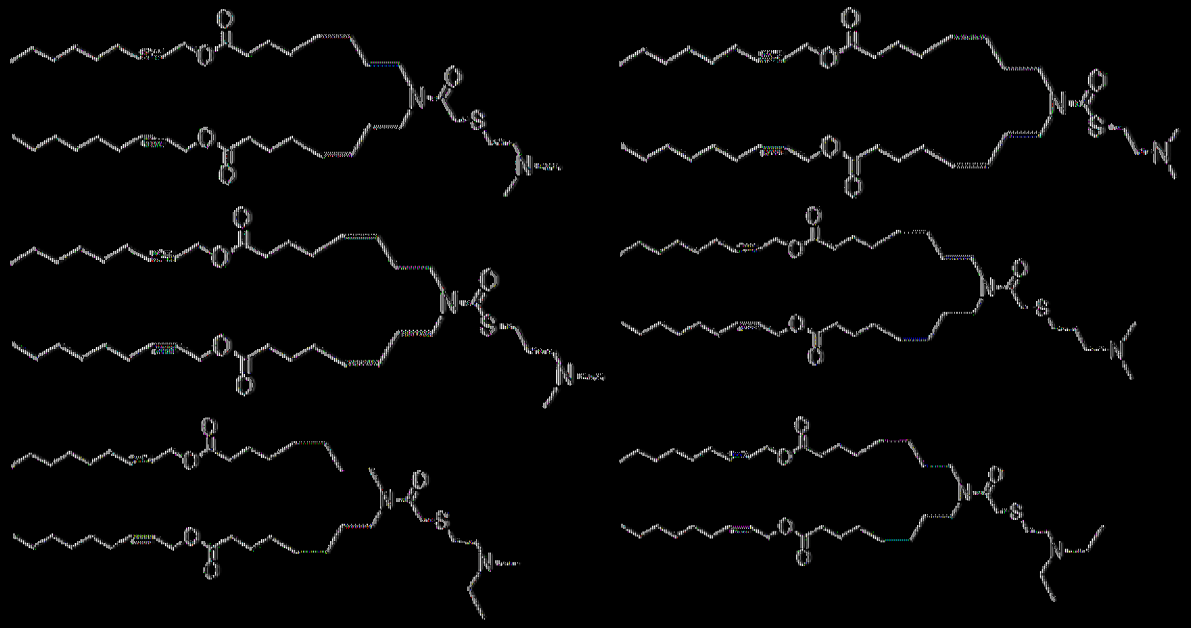
基。在一些實施例中，R^5是$CH((CH_2)_pCH_3)((CH_2)_{p-1}CH_3)$組成，其中p為7或8。

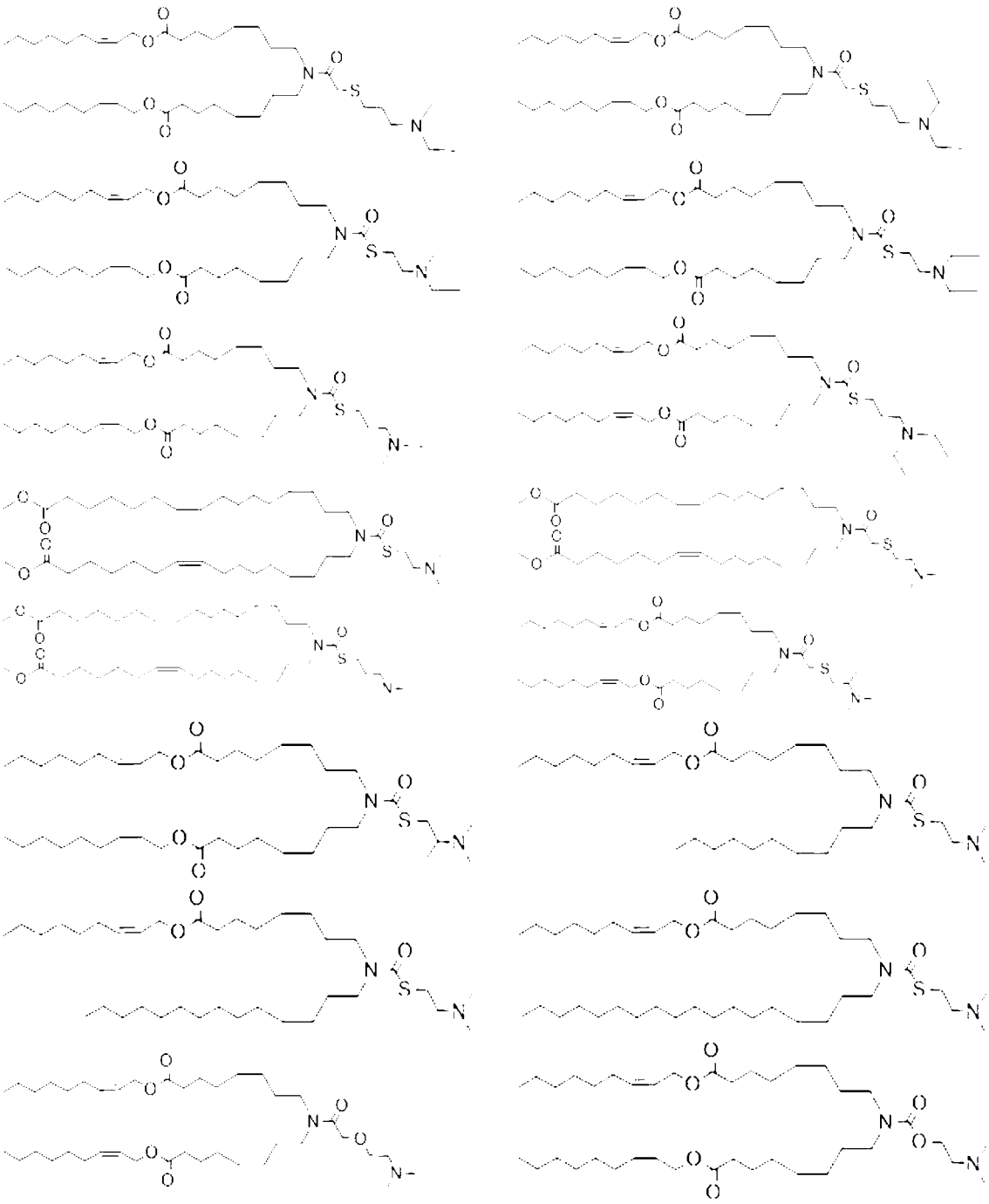
[0189] 在一些實施例中，R^4為伸乙基或伸丙基。在一些實施例中，R^4為伸正丙基或伸異丁基。

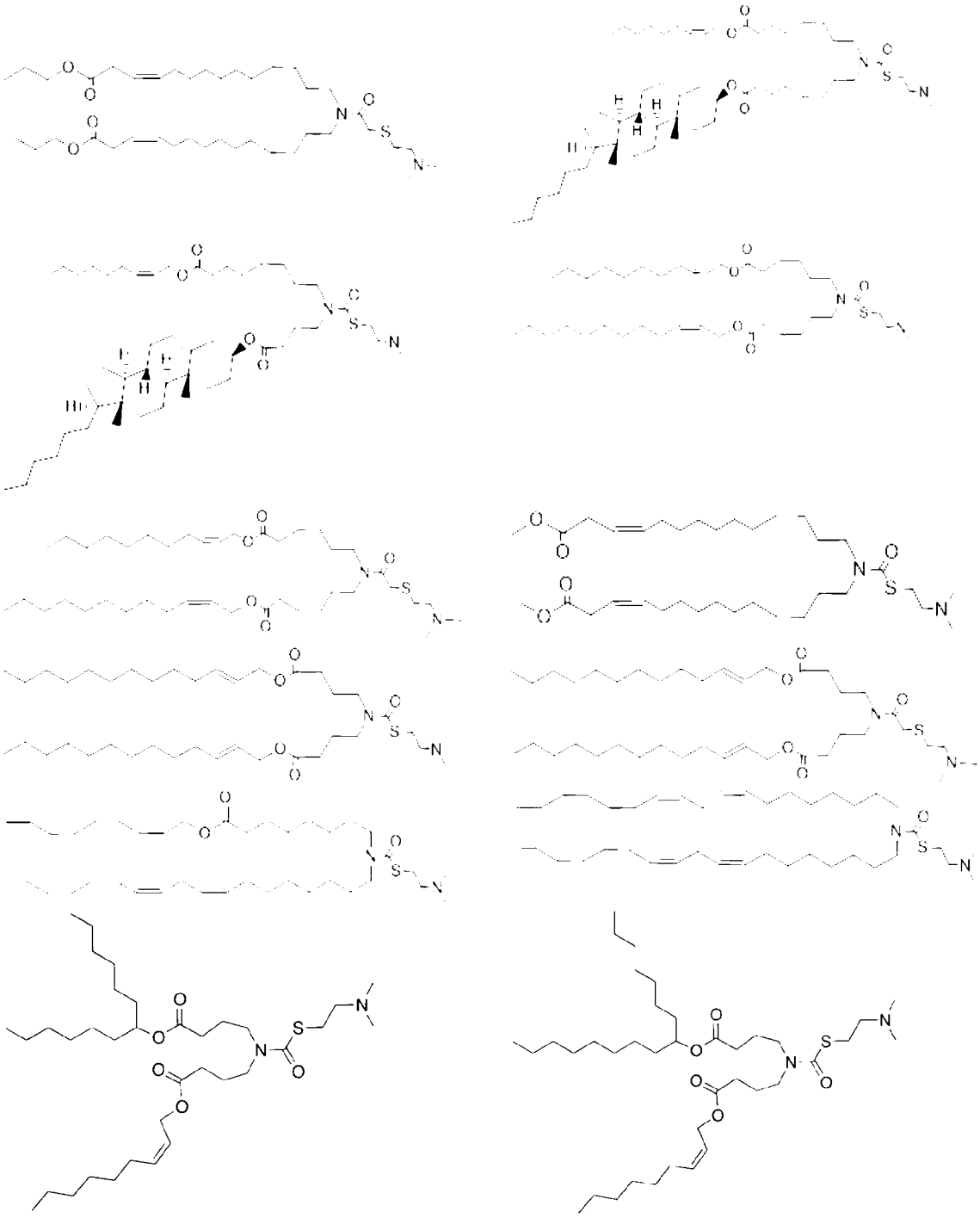
[0190] 在一些實施例中，L^7不存在，R^4為伸乙基，X^7為S，R^7及R^8各自為甲基。在一些實施例中，L^7不存在，R^4為伸正丙基，X^7為S，R^7及R^8各自為甲基。在一些實施例中，L^7不存在，R^4為伸乙基，X^7為S，R^7及R^8各自為乙基。

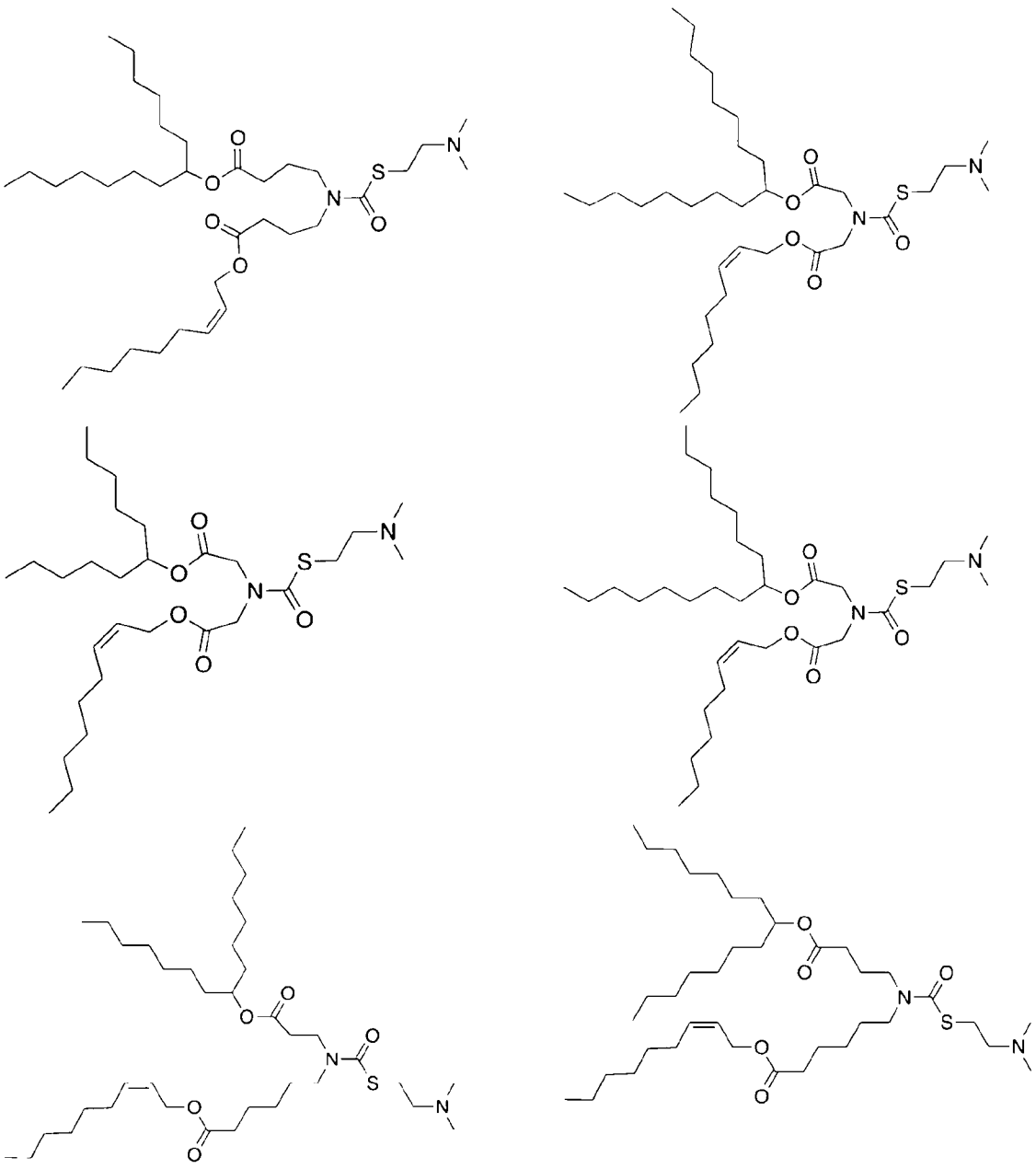
[0191] 在一些實施例中，X^7為S，X^5為C(O)O，由此形成C(O)O-R^6，X^6為C(O)O，由此形成C(O)O-R^5，L^5及L^6各自獨立地為直鏈C_3-C_7烷基，L^7不存在，R^5為$CH((CH_2)_pCH_3)_2$，且R^6為C_7-C_{12}烯基。在一些另外實施例中，p為6且R^6為C_9烯基。

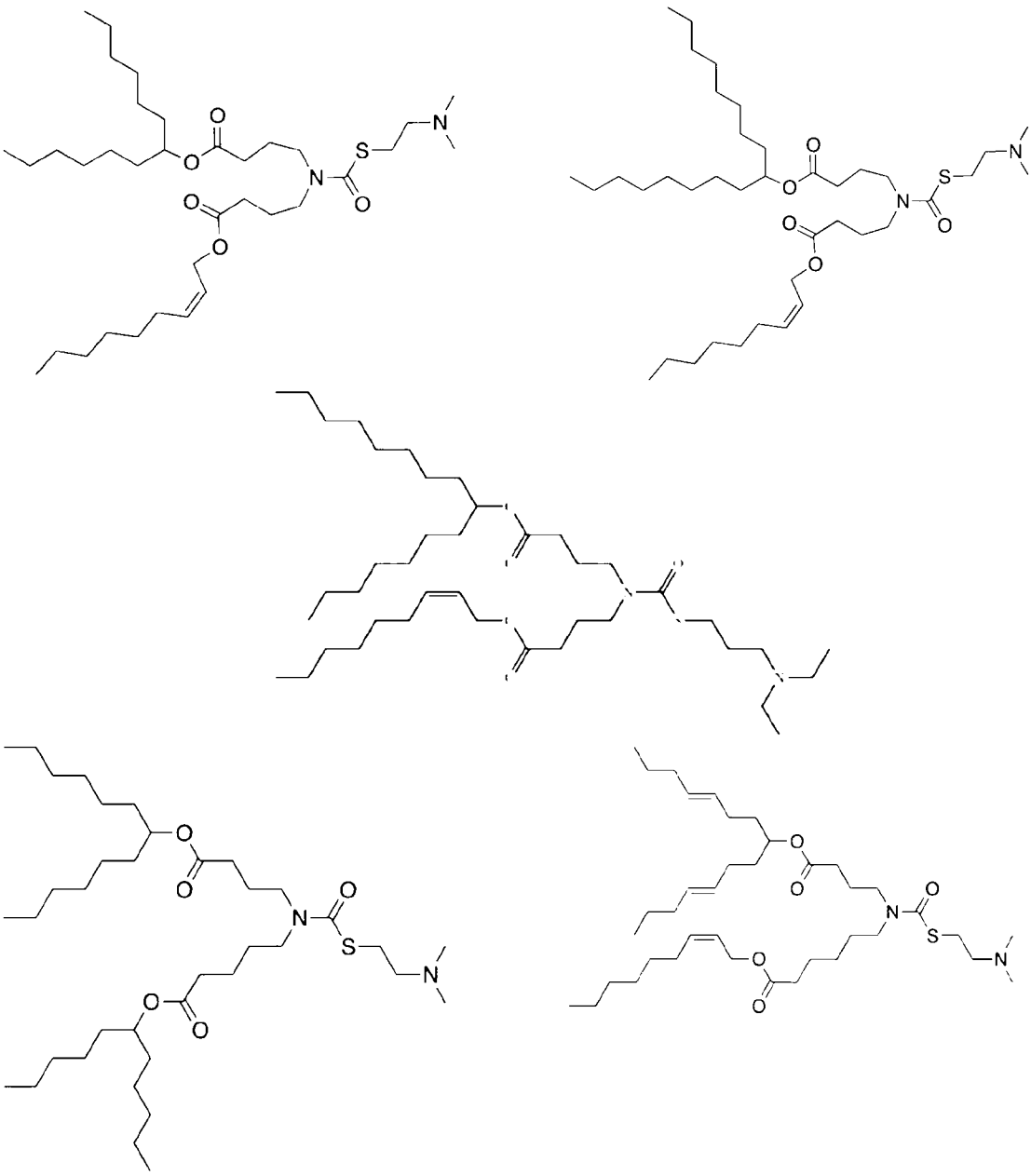
[0192] 在一些實施例中，脂質調配物包含選自由以下組成之群之可離子化陽離子脂質：

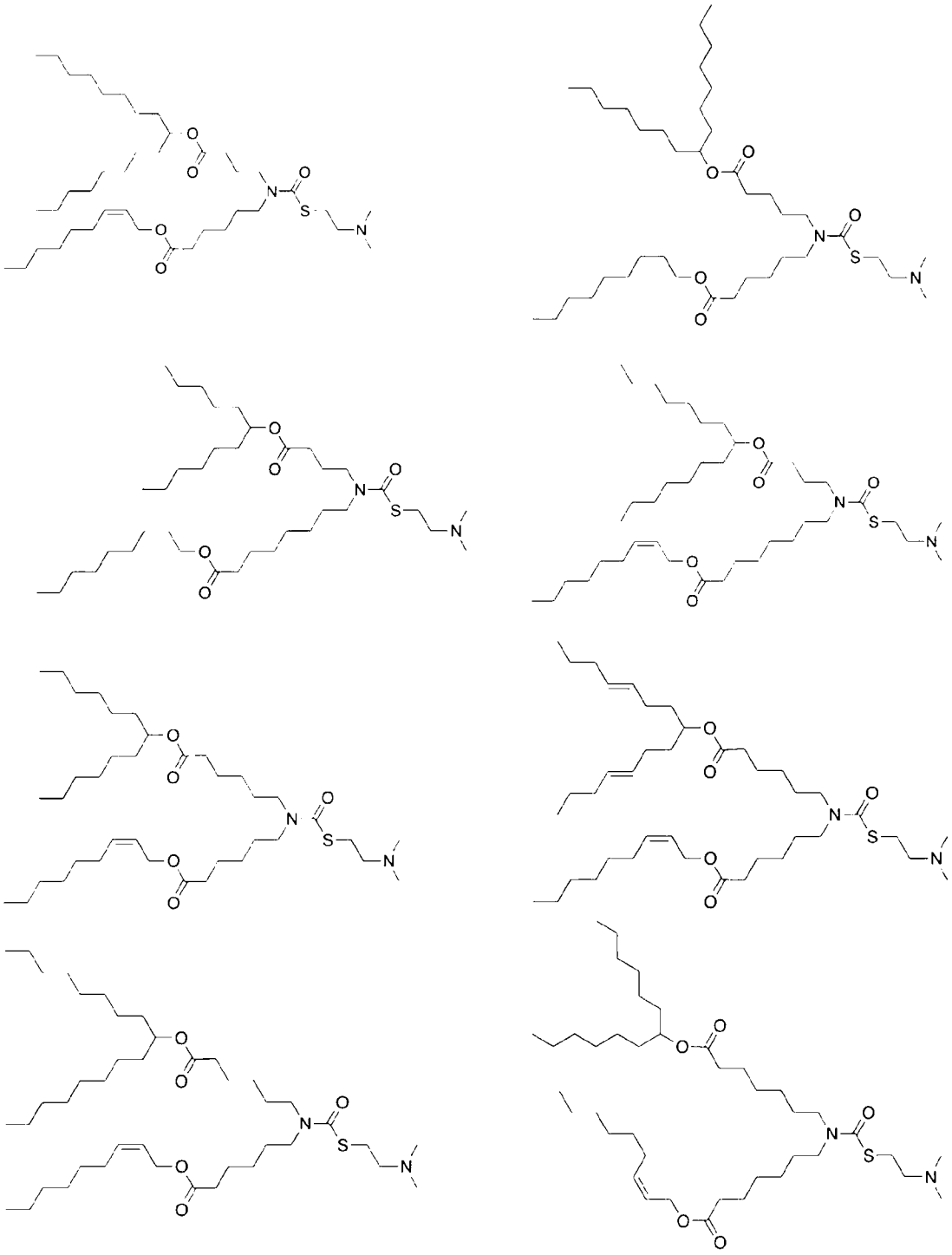


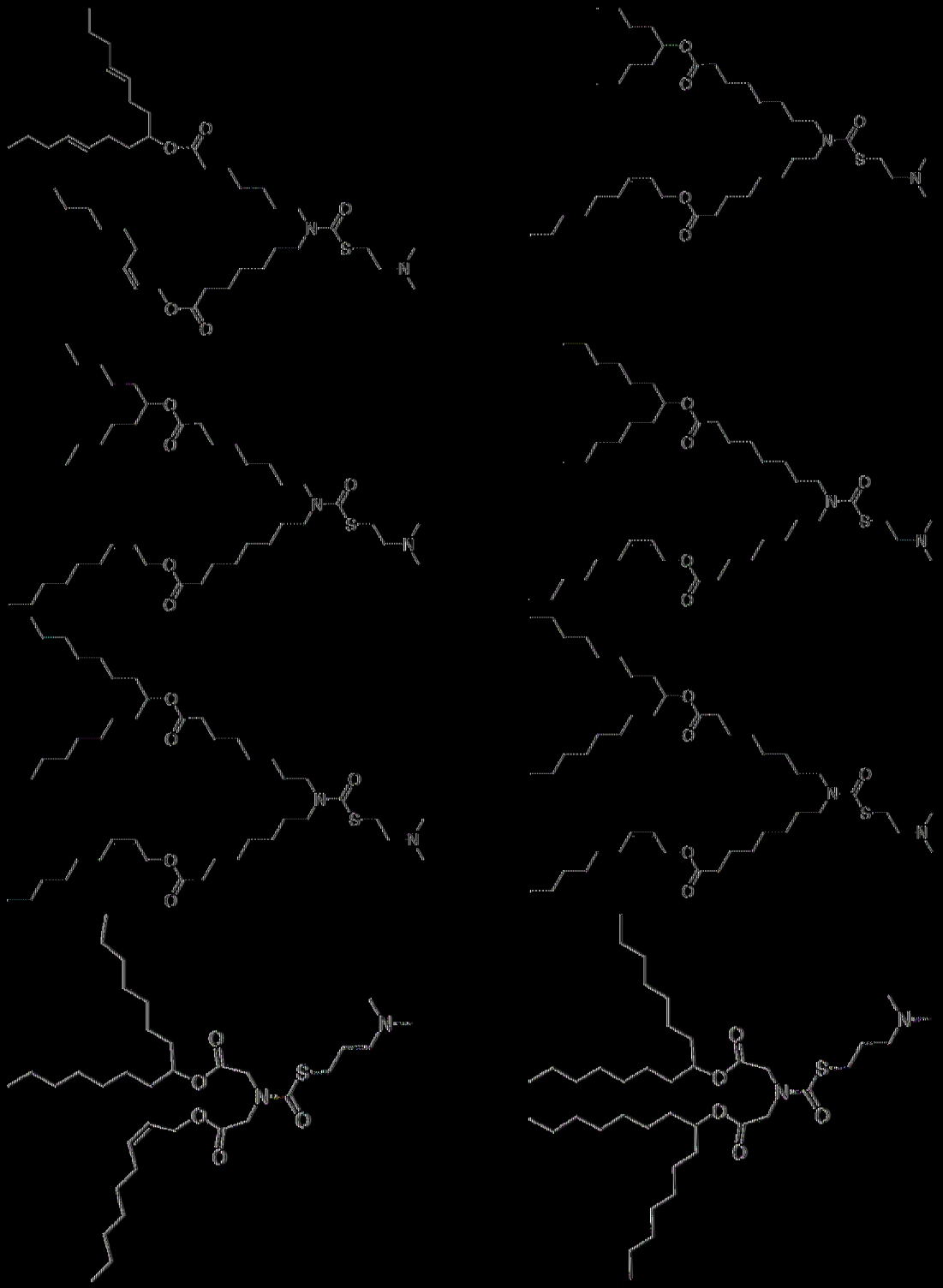


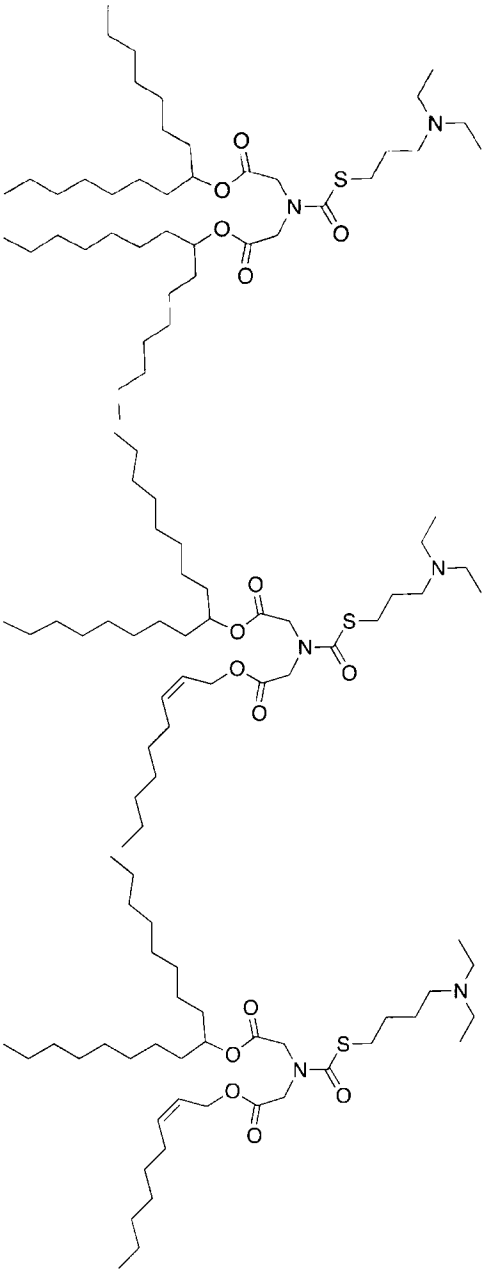


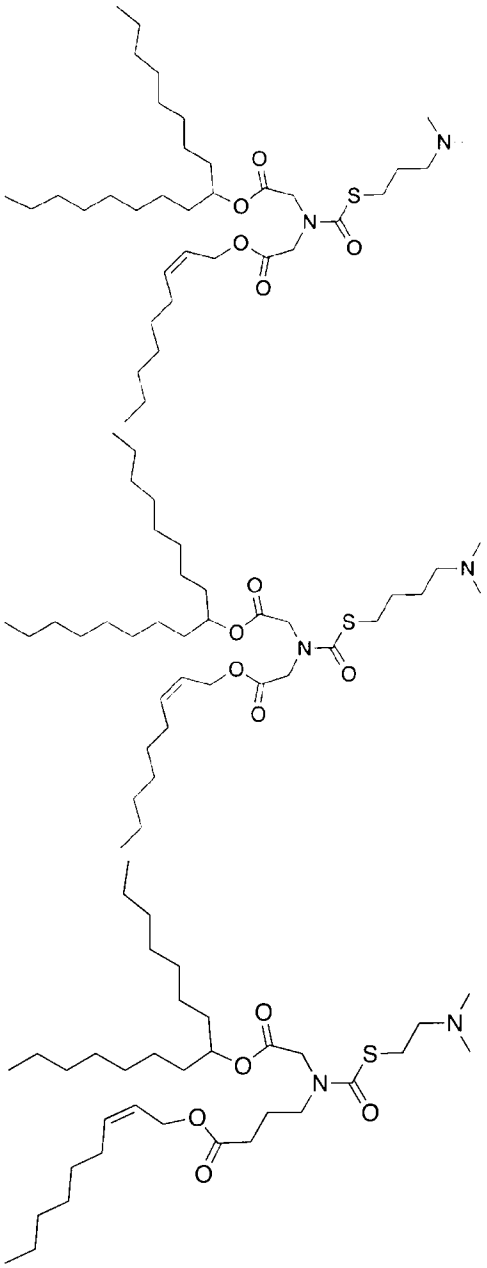


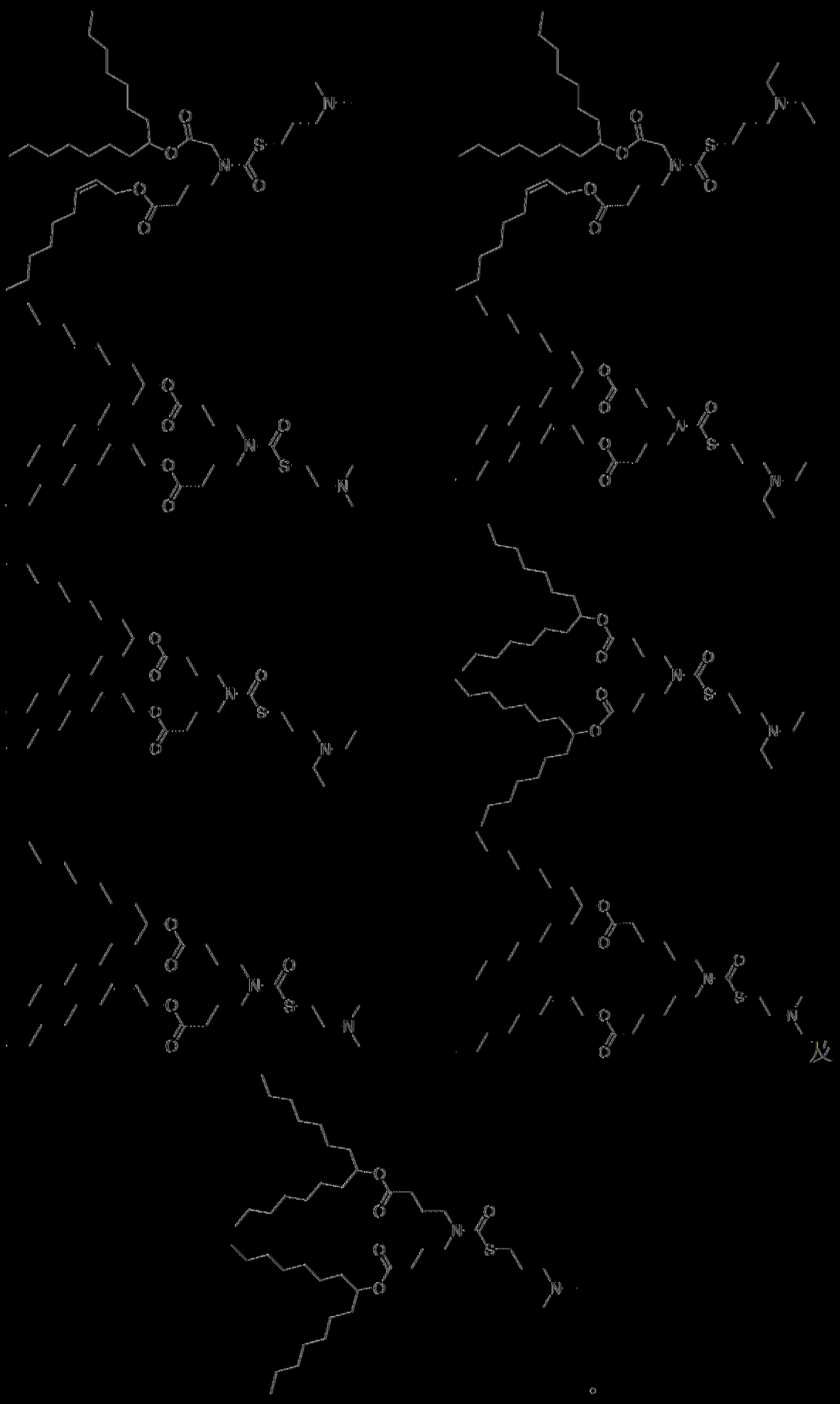












【0193】 在一些實施例中，可明確排除本文所敍述之任何一或多種脂質。

輔助脂質及固醇

【0194】 本發明之mRNA-脂質調配物可包含輔助脂質，該輔助脂質可稱為中性脂質、中性輔助脂質、非陽離子脂質、非陽離子輔助脂質、陰離子脂質、陰離子輔助脂質或兩性離子脂質。已發現，若調配物中存在輔助脂質，則脂質調配物，尤其陽離子脂質體及脂質奈米粒子具有經增加之細胞吸收。(Curr. Drug Metab. 2014; 15(9):882-92)。舉例而言，一些研究指示，比陽離子脂質更促融(亦即，便於融合)之諸如1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷脂醯膽鹼(DOPC)、二-油醯基-磷脂醯基-乙醇胺(DOPE)及1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)之中性脂質及兩性離子脂質可能會影響脂質-核酸複合物之多型性特點，促進自板層相過渡至六方相，且因此誘導融合及細胞膜破裂。(Nanomedicine (Lond). 2014年1月; 9(1):105-20)。另外，使用輔助脂質可幫助減少使用許多普遍陽離子脂質之諸如毒性及免疫原性之任何潛在有害影響。

【0195】 適用於本發明之脂質調配物之非陽離子脂質之非限制性實例包括諸如以下之磷脂：卵磷脂、磷脂醯乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、神經鞘磷脂、卵神經鞘磷脂(egg sphingomyelin，ESM)、腦磷脂、心磷脂、磷脂酸、腦苷脂、二鯨蠟基磷酸酯、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二油醯基磷脂醯丙三醇(DOPG)、二棕櫚醯基磷脂醯甘油(DPPG)、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、棕櫚醯油醯基-磷脂醯膽鹼(POPC)、棕櫚醯油醯基-磷脂醯乙醇胺(POPE)、棕櫚醯油醯基

-磷脂醯甘油(POPG)、二油醯基磷脂醯乙醇胺4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)、二棕櫚醯基-磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻醯基-磷脂醯乙醇胺(DMPE)、二硬脂醯基-磷脂醯乙醇胺(DSPE)、單甲基-磷脂醯乙醇胺、二甲基-磷脂醯乙醇胺、二反油醯基-磷脂醯乙醇胺(DEPE)、硬脂醯基油醯基-磷脂醯乙醇胺(SOPE)、溶血磷脂醯膽鹼、二亞油醯基磷脂醯膽鹼及其混合物。亦可使用其他二醯基磷脂醯膽鹼及二醯基磷脂醯乙醇胺磷脂。此等脂質中之醯基較佳為例如月桂醯基、肉豆蔻醯基、棕櫚醯基、硬脂醯基或油醯基之衍生自具有C_{10}-C_{24}碳鏈之脂肪酸的醯基。

【0196】 非陽離子脂質之額外實例包括諸如膽固醇及其衍生物之固醇。一項研究得出結論，作為輔助脂質之膽固醇增加與核酸介接之脂質層之電荷間距，使得該電荷分佈與核酸之電荷分佈更緊密地匹配。(J. R. Soc. Interface. 2012年3月7日; 9(68): 548-561)。膽固醇衍生物之非限制性實例包括諸如以下之極性類似物：5α-膽甾烷醇、5α-糞甾醇、膽固醇基-(2'-羥基)-乙醚、膽固醇基-(4'-羥基)-丁醚及6-酮膽甾烷醇；諸如以下之非極性類似物：5α-膽甾烷、膽甾烯酮、5α-膽甾烷酮、5α-膽甾烷酮及癸酸膽固醇酯；及其混合物。在較佳實施例中，膽固醇衍生物為諸如膽固醇基-(4'-羥基)-丁醚之極性類似物。

【0197】 在一些實施例中，脂質調配物中存在之輔助脂質包含以下或由以下組成：一或多種磷脂與膽固醇或其衍生物之混合物。在其他實施例中，脂質調配物中存在之輔助脂質包含以下或由以下組成：一或多種磷脂，例如無膽固醇脂質調配物。在又其他實施例中，脂質調配物中存在之輔助脂質包含以下或由以下組成：膽固醇或其衍生物，例如無磷脂脂質調

配物。

【0198】 輔助脂質之其他實例包括諸如以下之非含磷脂質：硬脂胺、十二胺、十六胺、棕櫚酸乙醯酯、蓖麻油酸甘油酯、硬脂酸十六酯、肉豆蔻酸異丙酯、兩性丙烯酸聚合物、三乙醇胺-月桂基硫酸鹽、烷基-芳基硫酸鹽聚乙氧基化脂肪酸醯胺、二(十八基)二甲基溴化銨、神經醯胺及神經鞘磷脂。

【0199】 在一些實施例中，輔助脂質占脂質調配物中存在之總脂質的約20 mol%至約50 mol%、約22 mol%至約48 mol%、約24 mol%至約46 mol%、約25 mol%至約44 mol%、約26 mol%至約42 mol%、約27 mol%至約41 mol%、約28 mol%至約40 mol%、或約29 mol%、約30 mol%、約31 mol%、約32 mol%、約33 mol%、約34 mol%、約35 mol%、約36 mol%、約37 mol%、約38 mol%或約39 mol% (或其任何分率或其中之範圍)。

【0200】 在一些實施例中，調配物中之總輔助脂質包含兩種或更多種輔助脂質，且總量輔助脂質占脂質調配物中存在之總脂質的約20 mol%至約50 mol%、約22 mol%至約48 mol%、約24 mol%至約46 mol%、約25 mol%至約44 mol%、約26 mol%至約42 mol%、約27 mol%至約41 mol%、約28 mol%至約40 mol%、或約29 mol%、約30 mol%、約31 mol%、約32 mol%、約33 mol%、約34 mol%、約35 mol%、約36 mol%、約37 mol%、約38 mol%或約39 mol% (或其任何分率或其中之範圍)。在一些實施例中，輔助脂質為DSPC與DOTAP之組合。在一些實施例中，輔助脂質為DSPC與DOTMA之組合。

【0201】 脂質調配物中之膽固醇或膽固醇衍生物可占脂質調配物中

存在之總脂質的至多約40 mol%、約45 mol%、約50 mol%、約55 mol%或約60 mol%。在一些實施例中，膽固醇或膽固醇衍生物占脂質調配物中存在之總脂質的約15 mol%至約45 mol%、約20 mol%至約40 mol%、約30 mol%至約40 mol%、或約35 mol%、約36 mol%、約37 mol%、約38 mol%、約39 mol%或約40 mol%。

【0202】 脂質調配物中存在之輔助脂質百分比為目標量，且調配物中存在之輔助脂質實際量可變化例如± 5 mol%。

【0203】 含有陽離子脂質化合物或可離子化陽離子脂質化合物之脂質調配物按莫耳計可為約20-40%陽離子脂質化合物、約25-40%膽固醇、約25-50%輔助脂質及約0.5-5%聚乙二醇(PEG)脂質，其中該百分比係調配物中存在之總脂質的百分比。在一些實施例中，組合物為約22-30%陽離子脂質化合物、約30-40%膽固醇、約30-40%輔助脂質及約0.5-3% PEG-脂質，其中該百分比係調配物中存在之總脂質的百分比。

脂質結合物

【0204】 本文所描述之脂質調配物可進一步包含脂質結合物。結合脂質適用於防止粒子聚集。合適的結合脂質包括但不限於PEG-脂質結合物、陽離子聚合物-脂質結合物及其混合物。此外，脂質遞送媒劑可用於藉由將配位體(例如抗體、肽及碳水化合物)連接至其表面或所連接PEG鏈之末端進行之特異性靶向(Front. Pharmacol. 2015年12月1日; 6:286)。

【0205】 在一較佳實施例中，脂質結合物為PEG-脂質。在脂質調配物中包括聚乙二醇(PEG)作為塗層或表面配位體係一種稱為聚乙二醇化之技術，其幫助保護奈米粒子免受免疫系統影響且幫助其逃避RES吸收(Nanomedicine (Lond). 2011年6月; 6(4):715-28)。已廣泛使用聚乙二醇

化來經由物理、化學及生物學機制使脂質調配物及其有效負載物穩定。類清潔劑PEG脂質(例如PEG-DSPE)可進入脂質調配物以在表面上形成水合層及空間障壁。基於聚乙二醇化程度，表面層一般可分成兩種類型：類刷層及類蕈層。對於經PEG-DSPE穩定之調配物，PEG將呈低聚乙二醇化程度(通常小於5 mol%)之蕈構形且由於PEG-DSPE之含量增加超過一定位準而將轉變成刷構形(J. Nanomaterials. 2011;2011:12)。已顯示，聚乙二醇化增加引起脂質調配物之循環半衰期顯著地延長(Annu. Rev. Biomed. Eng. 2011年8月15日; 13:507-30；J. Control Release. 2010年8月3日; 145(3):178-81)。

【0206】 PEG-脂質之合適實例包括但不限於與二烷氧基丙基偶合之PEG (PEG-DAA)、與二醯基甘油偶合之PEG (PEG-DAG)、與諸如磷脂醯乙醇胺之磷脂偶合之PEG (PEG-PE)、與神經醯胺結合之PEG、與膽固醇結合之PEG或其衍生物及其混合物。

【0207】 PEG為具備具有兩個末端羥基之乙烯PEG重複單元的線性水溶性聚合物。PEG係根據其分子量進行分類且包括以下：單甲氧基聚乙二醇(MePEG-OH)、單甲氧基聚乙二醇-丁二酸酯(MePEG-S)、單甲氧基聚乙二醇-丁二酸丁二醯亞胺酯(MePEG-S-NHS)、單甲氧基聚乙二醇-胺(MePEG-NH_2)、單甲氧基聚乙二醇-三氟乙磺酸酯(MePEG-TRES)、單甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基(MePEG-IM)以及該等含有末端羥基代替末端甲氧基之化合物(例如HO-PEG-S、HO-PEG-S-NHS、HO-PEG-NH_2)。

【0208】 本文所描述之PEG-脂質結合物之PEG部分可包含在約550道爾頓至約10,000道爾頓範圍內之平均分子量。在某些情況下，PEG部分具有約750道爾頓至約5,000道爾頓(例如約1,000道爾頓至約5,000道爾

頓、約1,500道爾頓至約3,000道爾頓、約750道爾頓至約3,000道爾頓、約750道爾頓至約2,000道爾頓)之平均分子量。在較佳實施例中，PEG部分具有約2,000道爾頓或約750道爾頓之平均分子量。該平均分子量可為所敘述範圍內之任何值或子值，包括端點值。

【0209】 在某些情況下，PEG單體可視情況經烷基、烷氧基、醯基或芳基取代。PEG可直接結合至脂質或可經由連接子部分連接至脂質。可使用包括例如非含酯連接子部分及含酯連接子部分的適用於使PEG與脂質偶合之任何連接子部分。在一較佳實施例中，連接子部分為非含酯連接子部分。合適的非含酯連接子部分包括但不限於醯胺基(-C(O)NH-)、胺基(-NR-)、羰基(-C(O)-)、胺基甲酸酯(-NHC(O)O-)、脲(-NHC(O)NH-)、二硫化物(-S-S-)、醚(-O-)、丁二醯基(-(O)CCH$_2$CH$_2$C(O)-)、丁二醯胺基(-NHC(O)CH$_2$CH$_2$C(O)NH-)、醚以及其組合(諸如含有胺基甲酸酯連接子部分及醯胺基連接子部分兩者之連接子)。在一較佳實施例中，使用胺基甲酸酯連接子來使PEG與脂質偶合。

【0210】 在其他實施例中，使用含酯連接子部分來使PEG與脂質偶合。合適的含酯連接子部分包括例如碳酸酯(-OC(O)O-)、丁二醯基、磷酸酯(-O-(O)POH-O-)、磺酸酯及其組合。

【0211】 具有鏈長不同且飽和度不同之各種醯基鏈基團之磷脂醯乙醇胺可與PEG結合以形成脂質結合物。該等磷脂醯乙醇胺為市售的或可使用熟習此項技術者已知之習知技術來分離或合成。含有碳鏈長度在C$_{10}$至C$_{20}$範圍內之飽和或不飽和脂肪酸之磷脂醯乙醇胺係較佳的。亦可使用具有單不飽和脂肪酸或二不飽和脂肪酸以及飽和脂肪酸與不飽和脂肪酸之混合物的磷脂醯乙醇胺。合適的磷脂醯乙醇胺包括但不限於二肉豆蔻醯基-

磷脂醯乙醇胺(DMPE)、二棕櫚醯基-磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二油醯基-磷脂醯乙醇胺(DOPE)及二硬脂醯基-磷脂醯乙醇胺(DSPE)。

【0212】 在一些實施例中，PEG-DAA結合物為PEG-二癸氧基丙基(C_{10})結合物、PEG-二月桂氧基丙基(C_{12})結合物、PEG-二肉豆蔻氧基丙基(C_{14})結合物、PEG-二棕櫚氧基丙基(C_{16})結合物或PEG-二硬脂醯氧基丙基(C_{18})結合物。在此等實施例中，PEG較佳地具有約750至約2,000道爾頓之平均分子量。在特定實施例中，PEG之末端羥基經甲基取代。

【0213】 除前述物質之外，亦可使用其他親水性聚合物代替PEG。可代替PEG使用之合適聚合物之實例包括但不限於聚乙烯吡咯啶酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羥丙基、甲基丙烯醯胺、聚甲基丙烯醯胺及聚二甲基丙烯醯胺、聚乳酸、聚乙醇酸及諸如羥甲基纖維素或羥乙基纖維素之衍生纖維素。

【0214】 在一些實施例中，脂質結合物(例如PEG-脂質)占脂質調配物中存在之總脂質的約0.1 mol%至約2 mol%、約0.5 mol%至約2 mol%、約1 mol%至約2 mol%、約0.6 mol%至約1.9 mol%、約0.7 mol%至約1.8 mol%、約0.8 mol%至約1.7 mol%、約0.9 mol%至約1.6 mol%、約0.9 mol%至約1.8 mol%、約1 mol%至約1.8 mol%、約1 mol%至約1.7 mol%、約1.2 mol%至約1.8 mol%、約1.2 mol%至約1.7 mol%、約1.3 mol%至約1.6 mol%或約1.4 mol%至約1.6 mol% (或其任何分率或其中之範圍)。在其他實施例中，脂質結合物(例如PEG-脂質)占脂質調配物中存在之總脂質的約0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%或5% (或其任何分率或其中之範圍)。該量可為所敍述

範圍內之任何值或子值，包括端點值。

【0215】 在一些較佳實施例中，PEG-脂質為PEG550-PE。在一些較佳實施例中，PEG-脂質為PEG750-PE。在一些較佳實施例中，PEG-脂質為PEG2000-DMG。

【0216】 本發明之脂質調配物中存在之脂質結合物(例如PEG-脂質)百分比為目標量，且調配物中存在之脂質結合物實際量可變化例如± 0.5 mol%。一般熟習此項技術者應瞭解，脂質結合物之濃度可視所採用之脂質結合物及脂質調配物變得促融之速率而變化。

用於脂質調配物之細胞吸收之作用機制

【0217】 用於胞內遞送核酸之脂質調配物，尤其脂質體、陽離子脂質體及脂質奈米粒子經設計以藉由經由利用目標細胞之胞吞機制穿透目標細胞來進行細胞吸收，其中將脂質遞送媒劑之內容物遞送至目標細胞之細胞溶質。(Nucleic Acid Therapeutics, 28(3):146-157, 2018)。特定言之，在本文所描述之靶向肝細胞之mRNA-脂質調配物之情況下，mRNA-脂質調配物經由受體介導之胞吞作用進入肝細胞中。在胞吞之前，使脂質遞送媒劑表面處之諸如PEG-脂質之功能化配位體自表面脫落，從而觸發內化至目標細胞中。在胞吞期間，細胞之質膜之某一部分包圍載體且將其吞噬至囊泡中，隨後該囊泡自細胞膜夾止，進入細胞溶質中且最終經歷內溶酶體路徑。對於含可離子化陽離子脂質遞送媒劑，隨著胞內體老化而增加之酸性產生在表面上具有強正電荷之媒劑。遞送媒劑與胞內體膜之間的相互作用隨後引起膜融合事件，從而引起有效負載物之細胞溶質遞送。對於mRNA有效負載物，細胞自身之內部轉譯過程隨後將mRNA分子或mRNA分子組合轉譯成經編碼之蛋白質(例如HBV TALEN)。經編碼之蛋白質可

進一步經歷轉譯後加工，該轉譯後加工包括轉運至細胞內之靶向細胞器或位置。在本文所描述之HBV TALEN之情況下，HBV TALEN蛋白易位至核中，在該核中可編輯HBV基因體。

【0218】 藉由控制脂質結合物之組成及濃度，吾人可控制自脂質調配物中更換脂質結合物之速率且繼而控制脂質調配物變得促融之速率。另外，包括例如pH、溫度或離子強度之其他變數可用於改變及/或控制脂質調配物變得促融之速率。可用於控制脂質調配物變得促融之速率的其他方法將在熟習此項技術者閱讀本發明後對其變得顯而易見。此外，藉由控制脂質結合物之組成及濃度，吾人可控制脂質體或脂質粒度。

脂質調配物製造

【0219】 存在許多不同的製備包含例如mRNA分子或mRNA分子組合之核酸之脂質調配物的方法。(Curr. Drug Metabol. 2014, 15, 882-892；Chem. Phys. Lipids 2014, 177, 8-18；Int. J. Pharm. Stud. Res. 2012, 3, 14-20)。本文簡單描述薄膜水合、雙重乳化、反相蒸發、微流體製備、雙重不對稱離心、乙醇注射、清潔劑透析、藉由乙醇稀釋自發地形成囊泡及囊封於預先形成之脂質體中的技術。

薄膜水合

【0220】 在薄膜水合(TFH)或Bangham方法中，將脂質溶解於有機溶劑中，隨後經由使用旋轉式蒸發器進行蒸發，從而引起薄脂質層形成。在藉由含有待裝載之化合物之緩衝水溶液進行層水合之後，形成多層囊泡(MLV)，可藉由擠壓通過膜或藉由音波處理起始MLV來減小MLV尺寸以產生小或大單層囊泡(LUV及SUV)。

雙重乳化

【0221】 脂質調配物亦可經由雙重乳化技術來製備，雙重乳化技術涉及將脂質溶解於水/有機溶劑混合物中。將含有水滴之有機溶液與過量水性介質混合，引起水包油包水(W/O/W)雙重乳液形成。在機械劇烈振盪之後，水滴之一部分破裂，得到大單層囊泡(LUV)。

反相蒸發

【0222】 反相蒸發(REV)方法亦允許吾人達成裝載有核酸之LUV。在此技術中，藉由將磷脂溶解於有機溶劑及水性緩衝劑中來形成雙相系統。隨後，短暫地音波處理所得懸浮液直至混合物變成單相清分散液。在減壓下蒸發有機溶劑之後達成脂質調配物。此技術已用於囊封包括核酸之不同的親水性大分子及小分子。

微流體製備

【0223】 微流體方法不同於其他散裝技術，其給予控制脂質水合方法之可能性。該方法可根據操縱流之方式而分類成連續流微流體及基於液滴之微流體。在以連續流模式操作之微流體流體動力學集中(MHF)方法中，將脂質溶解於異丙醇中，異丙醇水動力地集中在兩個水性緩衝劑流之間的微通道交叉接面中。囊泡尺寸可藉由調節流動速率來加以控制，由此控制脂質溶液/緩衝液稀釋過程。該方法可用於藉由使用由三個入口及一個出口埠組成之微流體裝置來產生寡核苷酸(ON)脂質調配物。

雙重不對稱離心

【0224】 雙重不對稱離心(DAC)不同於更常用的離心，此係因為其圍繞其自身豎軸使用額外旋轉。由於生成所兩個重疊移動，因此達成有效均質化：如在普通離心機中向外推動樣本，且隨後由於額外旋轉而朝向小瓶中心推動樣本。藉由混合脂質與NaCl-溶液，達成黏性囊泡磷脂凝膠

(VPC)，隨後將其稀釋，獲得脂質調配物分散液。脂質調配物尺寸可藉由最佳化DAC速度、脂質濃度及均質化時間來加以調節。

乙醇注射

【0225】 乙醇注射(EI)方法可用於囊封核酸。此方法經由使用針將其中溶解了脂質之乙醇溶液快速注射至含有待囊封之核酸的水性介質中。當磷脂分散在整個介質中時，自發地形成囊泡。

清潔劑透析

【0226】 清潔劑透析方法可用於囊封核酸。簡言之，將脂質及質體溶解於具有適當離子強度之清潔劑溶液中，在藉由透析移除清潔劑之後，形成穩定的脂質調配物。隨後，藉由離子交換層析法移除未經囊封之核酸且藉由蔗糖密度梯度離心移除空囊泡。該技術對陽離子脂質含量及透析緩衝液之鹽濃度高度敏感，且該方法亦難以按比例調整。

藉由乙醇稀釋自發地形成囊泡

【0227】 亦可經由藉由乙醇稀釋自發地形成囊泡之方法產生穩定的脂質調配物，其中逐步或逐滴乙醇稀釋藉由將溶解於乙醇中之脂質受控添加至含有核酸之快速混合水性緩衝液中來瞬時形成裝載有核酸之囊泡。

囊封於預先形成之脂質體中

【0228】 核酸截留亦可經由以下兩種不同的方法以預先形成之脂質體為起始物獲得：(1)使陽離子脂質體與核酸簡單混合，得到稱為「脂複合體」之靜電複合物，其中該等靜電複合物可成功地用於轉染細胞培養物，但其特徵在於其囊封效率低及活體內表現不佳；及(2)脂質體去穩定化，向陽離子囊泡之懸浮液中緩慢添加純乙醇達至40% v/v之濃度，接著逐滴添加核酸，達成經裝載之囊泡；然而，表徵囊封方法之兩個主要步驟

亦為敏感性的，且必須減小粒子尺寸。

【0229】在某些實施例中，脂質及脂質奈米粒子、包含脂質之醫藥組合物、製造脂質或調配包含脂質及核酸分子之醫藥組合物之方法及使用醫藥組合物治療或預防疾病之方法的實例描述於諸如以下之美國或國際專利申請公開案中：US2017/0190661、US2006/0008910、US2015/0064242、US2005/0064595、WO/2019/036030、US2019/0022247、WO/2019/036028、WO/2019/036008、WO/2019/036000、US2016/0376224、US2017/0119904、WO/2018/200943、WO/2018/191657、WO/2018/118102、US20180169268、WO2018118102、WO2018119163、US2014/0255472及US2013/0195968，該等案中之各者之相關內容特此以全文引用之方式併入。

細胞及多肽

【0230】本申請案亦提供包含本文所描述之聚核苷酸及載體中之任一者的細胞，較佳地經分離細胞。該等細胞可例如用於產生重組蛋白或用於產生病毒粒子。在一些實施例中，該等細胞可用於產生HBV TALEN。如本文所使用之術語「經分離」係指自最初發現細胞之生物體移除之細胞或此類細胞之後代。在一些實施例中，包含本文所描述之聚核苷酸或載體之細胞可處於個體中或為個體之一部分，而非為經分離的。在此等實施例中，個體細胞可用於活體內產生重組蛋白或產生病毒粒子。在一些實施例中，活體外培養細胞，例如在存在其他細胞之情況下。在一些實施例中，之後將細胞引入分離出該細胞之第二生物體(或繁衍該細胞之細胞)中或再引入該生物體中。

【0231】包含本申請案之HBV TALEN或編碼HBV TALEN之核酸的宿主細胞亦形成本發明之一部分。HBV TALEN可經由重組DNA技術產生，該重組DNA技術涉及在宿主細胞或基因轉殖動物或植物中表現分子，該等宿主細胞例如為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、腫瘤細胞株、BHK細胞、諸如HEK293細胞、PER.C6細胞之人類細胞株或酵母、細菌、真菌、昆蟲細胞及其類似細胞。在某些實施例中，該等細胞係來自多細胞生物體，在某些實施例中，該等細胞具有脊椎動物或無脊椎動物來源。在某些實施例中，該等細胞為諸如人類細胞之哺乳動物細胞或昆蟲細胞。在某些實施例中，該等細胞為原代細胞，例如肝細胞，更特定言之受感染肝細胞、感染HBV之肝細胞或具有HBV cccDNA之肝細胞。一般而言，在宿主細胞中產生諸如本發明之HBV TALEN之重組蛋白包含將編碼呈可表現格式之蛋白質的異源核酸分子引入宿主細胞中，在有利於表現核酸分子之條件下培養細胞，及允許在該細胞中表現蛋白質。編碼呈可表現格式之蛋白質的核酸分子可呈表現卡匣形式，且通常需要諸如(多種)強化子、啟動子、多腺苷酸化信號及其類似物之能夠引起核酸表現的序列。熟習此項技術者瞭解，可使用各種啟動子來獲得於宿主細胞中之基因表現。啟動子可為組成性或調節型的，且可獲自包括病毒、原核或真核來源之各種來源，或為經人工設計的。可添加另外的調節序列。許多啟動子可用於表現(多種)轉殖基因，且為技術人員所知，例如此等啟動子可包含病毒、哺乳動物、合成啟動子及其類似啟動子。用於在真核細胞中獲得表現之合適啟動子之非限制性實例為CMV啟動子(US 5,385,839)，例如CMV早發性啟動子，例如包含來自CMV早發性基因強化子/啟動子之nt. -735至+95的CMV早發性啟動子。例如牛類生長激素多腺苷信號(US 5,122,458)之多腺苷酸

化信號可存在於(多種)轉殖基因之後。可替代地，若干種廣泛使用之表現載體為此項技術中及自商業來源可獲得的，例如Invitrogen之pcDNA及pEF載體系列、來自BD Sciences之pMSCV及pTK-Hyg、來自Stratagene之pCMV-Script等，其可用於以重組方式表現所關注之蛋白質或獲得合適啟動子及/或轉錄終止子序列、多腺苷序列及其類似物。

【0232】 細胞培養物可為任何類型之細胞培養物，包括貼壁細胞培養物，例如附著於培養容器表面或微載體之細胞，以及懸浮培養物。大部分大型懸浮培養物係作為分批或分批進料過程操作，此係因為其操作最簡單且其可按比例擴大。如今，基於灌注原理之連續方法變得更常見且亦為合適的。合適的培養基亦為技術人員熟知且一般可大量獲自商業來源或根據標準方案訂製。培養可例如在器皿、滾瓶或生物反應器中使用分批、分批進料、連續系統及其類似者進行。適用於培養細胞之條件為已知的(參見例如Tissue Culture, Academic Press, Kruse及Paterson編者(1973)，及R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, 第四版(Wiley-Liss公司, 2000, ISBN 0-471-34889-9))。細胞培養基可自各種供應商獲得，且合適的培養基可經常規地選擇以供宿主細胞表現所關注之蛋白質，此處為HBV TALEN。合適的培養基可含有或可不含有血清。

【0233】 因此，本申請案之實施例亦關於製造本申請案之HBV TALEN之方法。該方法包含用包含以可操作方式連接至啟動子之編碼本申請案之HBV TALEN之聚核苷酸的表現載體轉染宿主細胞，使經轉染之細胞在適用於表現HBV TALEN之條件下生長，及視情況純化或分離於該細胞中表現之HBV TALEN。HBV TALEN可藉由包括親和層析法、粒徑排阻層析法等之此項技術中已知之任何方法自細胞分離或收集。用於表現

重組蛋白之技術將為一般熟習此項技術者鑒於本發明所熟知。亦可在不純化或分離經表現之蛋白質之情況下，例如藉由分析經編碼HBV TALEN之表現載體轉染且在適用於表現HBV TALEN之條件下生長之細胞的上清液來研究經表現之HBV TALEN。

【0234】 因此，亦提供包含與SEQ ID NO: 25、26、27或28中之一或多者之胺基酸序列至少90%一致之胺基酸序列的非天然存在之多肽或重組多肽。在一些實施例中，具有TALE DNA結合域之非天然存在之多肽或重組多肽包含SEQ ID NO: 25、26、27或28中之一或多者之胺基酸序列。在一些實施例中，具有TALE DNA結合域之非天然存在之多肽或重組多肽組合包含SEQ ID NO: 25及SEQ ID NO: 26之胺基酸序列。在一些實施例中，具有TALE DNA結合域之非天然存在之多肽或重組多肽組合包含SEQ ID NO: 27及SEQ ID NO: 28之胺基酸序列。如上下文所描述，本申請案亦涵蓋編碼此等序列之經分離核酸分子、包含以可操作方式連接至啟動子之此等序列的載體及包含多肽、聚核苷酸或載體之組合物。

【0235】 在本申請案之一實施例中，重組多肽包含分別與SEQ ID NO: 25、26、27或28中之一或多者之胺基酸序列至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 25、26、27或28中之一或多者90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，重組多肽組合包含分別與SEQ ID NO: 25及26之胺基酸序列具有至少90%一致性，諸如與SEQ ID NO: 25及26具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、

99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，重組多肽組合包含分別與SEQ ID NO: 27及28之胺基酸序列具有至少90%一致性，諸如與SEQ ID NO: 27及28具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致性的胺基酸序列。較佳地，非天然存在之多肽或重組多肽由SEQ ID NO: 25、26、27或28中之一或多者組成。較佳地，非天然存在之多肽或重組多肽組合由SEQ ID NO: 25及26或SEQ ID NO: 27及28組成。

組合物

【0236】本申請案亦關於包含本申請案之一或多種HBV TALEN、組合、編碼一或多種HBV TALEN之聚核苷酸(包括RNA及DNA，較佳地mRNA)、載體、LNP及/或宿主細胞的組合物，更尤其醫藥組合物。本文所描述之本申請案之HBV TALEN、組合、核酸、載體、LNP及/或宿主細胞中之任一者可用於本申請案之組合物或醫藥組合物中。

【0237】本申請案提供例如包含本文所描述之任何核酸分子、載體、組合、LNP或宿主細胞以及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。醫藥學上可接受之載劑為無毒的且不應干擾活性成分之功效。醫藥學上可接受之載劑可包括一或多種諸如以下之賦形劑：黏合劑、崩解劑、膨潤劑、懸浮劑、乳化劑、潤濕劑、潤滑劑、調味劑、甜味劑、防腐劑、染料、增溶劑及包覆劑。該載劑或其他材料之確切性質可視例如肌內、皮內、皮下、經口、靜脈內、經皮膚、黏膜內(例如腸)、鼻內或腹膜內途徑之投與途徑而定。對於例如懸浮液及溶液之液體可注射製劑，合適的載劑及添加

劑包括水、二醇、油、醇、防腐劑、著色劑及其類似物。對於例如散劑、膠囊、囊劑、膠囊錠及錠劑之固體口服製劑，合適的載劑及添加劑包括澱粉、糖、稀釋劑、成粒劑、潤滑劑、黏合劑、崩解劑及其類似物。對於鼻噴霧劑/吸入劑混合物，水溶液/懸浮液可包含水、二醇、油、軟化劑、穩定劑、潤濕劑、防腐劑、芳族物、調味劑及其類似物作為合適的載劑及添加劑。

【0238】 本申請案之醫藥組合物可在適用於向個體投與之任何物質中調配以便於投與且提高功效，該投與包括但不限於經口(經腸)投與及非經腸注射。非經腸注射包括靜脈內注射或輸注、皮下注射、皮內注射及肌內注射。本申請案之醫藥組合物亦可經調配用於包括經黏膜、經眼、經直腸、長效植入、舌下投與、在舌下方、自口腔黏膜繞過門脈循環、吸入或鼻內之其他投與途徑。

【0239】 在本申請案之一較佳實施例中，本申請案之醫藥組合物經調配用於非經腸注射，較佳地皮下注射、皮內注射或肌內注射，更佳地肌內注射。

【0240】 根據本申請案之實施例，供投與之醫藥組合物通常將包含含於例如水性載劑之醫藥學上可接受之載劑中之緩衝溶液，諸如緩衝鹽水及其類似物，例如磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。該等組合物亦可視需要含有諸如pH調節劑及緩衝劑之用於接近生理條件之醫藥學上可接受之物質。舉例而言，包含質體DNA之本申請案之醫藥組合物可含有磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)作為醫藥學上可接受之載劑。質體DNA可依例如0.5 mg/mL至5 mg/mL，諸如0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL或5 mg/mL，較佳地1 mg/mL之濃度存在。

【0241】 在一些實施例中，包含脂質奈米粒子之本申請案之醫藥組合物可依例如約20 μg/mL至約200 μg/mL，諸如20 μg/mL、30 μg/mL、40 μg/mL、50 μg/mL、60 μg/mL、70 μg/mL、80 μg/mL、90 μg/mL、100 μg/mL、110 μg/mL、120 μg/mL、130 μg/mL、140 μg/mL、150 μg/mL、160 μg/mL、170 μg/mL、180 μg/mL、190 μg/mL或200 μg/mL之濃度投與。在一些實施例中，包含脂質奈米粒子之本申請案之醫藥組合物可依低於20 μg/mL之濃度投與。在一些實施例中，包含脂質奈米粒子之本申請案之醫藥組合物可依高於200 μg/mL之濃度投與。

【0242】 本申請案亦提供製造本申請案之醫藥組合物之方法。製造醫藥組合物之方法包含使本申請案之編碼HBV TALEN之經分離聚核苷酸、載體及/或LNP與一或多種醫藥學上可接受之載劑混合。一般熟習此項技術者將熟悉用於製備該等組合物之習知技術。

治療方法

【0243】 本申請案提供治療肝炎之方法。在一些實施例中，該方法係治療有需要之個體之B型肝炎病毒(HBV)，特定言之HBV感染，該方法包含向個體投與有效量之本申請案之醫藥組合物。一些實施例係關於治療HBV/HDV雙重感染之方法。一些實施例係關於減少HBV表面抗原之方法。一些實施例係關於減少或根除HBV cccDNA之方法。一些實施例係關於靶向整合HBV DNA之方法。本文所描述之本申請案之醫藥組合物中之任一者可用於本申請案之方法中。本申請案亦提供減輕個體之HBV感染及/或減少個體之HBV複製的方法，該等方法包含向個體投與本申請案之醫藥組合物。如本文關於病毒感染或複製所使用之術語「減少/減弱(reducing/reduced)」一般意謂與諸如未經治療之個體或投與對照治療之

個體之參考位準相比統計學上顯著減弱之感染量及/或統計學上顯著減少之複製量。然而，為了避免疑問，「減少/減弱」意謂與參考位準相比至少10%減少/減弱，例如與參考位準相比至少約20%、或至少約30%、或至少約40%、或至少約50%、或至少約60%、或至少約70%、或至少約75%、或至少約80%、或至少約90%減少/減弱，或至多且包括100%減少/減弱(亦即，與參考位準相比不存在之位準)，或10%與100%之間的任何減少/減弱。感染及/或複製位準可由一般熟習此項技術者鑒於本發明確定。

【0244】 如本文所使用之術語「治療(treat/treated/treating)」係指治療性治療及防治性或預防性措施兩者，其中目的在於防止(部分或完全)或減緩(例如減輕或推遲發作)非所需生理病況、病症或疾病，或獲得諸如已變得異常或將變得異常之參數、值、功能或結果之部分或完全恢復或對其衰減之抑制的有益或所需臨床結果。出於本發明之目的，有益或所需臨床結果包括但不限於緩解症狀；減輕病況、病症或疾病之程度或活動力或發展速率；穩定(亦即，不惡化)病況、病症或疾病狀態；延遲病況、病症或疾病之發作或減緩其惡化；改善病況、病症或疾病狀態；及緩解病況、病症或疾病(無論部分還是完全)，無論其是否轉換為立即減輕實際臨床症狀，或增強或改善病況、病症或疾病。治療力圖引發臨床上顯著反應而無過量副作用。治療亦包括存活期與未接受治療情況下之預期存活期相比延長。

【0245】 如本文所使用之術語「感染」係指致病原侵入宿主。當致病原能夠侵入宿主且在宿主內複製或繁殖時，致病原視為「感染性」的。感染物之實例包括例如HBV、HDV以及腺病毒、朊病毒、細菌、真菌、原蟲及其類似物之某些物種的病毒。「HBV感染」特指HBV侵入宿主生

物體，諸如宿主生物體之細胞及組織。在一些實施例中，感染係HBV及HDV雙重感染。

【0246】 如本文所使用之「治療有效量」或「有效量」意謂足以誘導有需要之個體之所需作用或反應之組合物、聚核苷酸或載體的量。有效量可為足以提供針對諸如HBV感染之疾病之治療作用的量。有效量可視以下而變化：各種因素，諸如個體之身體狀況、年齡、體重、健康狀況等；特定應用，例如治療性治療；及需要免疫之特定疾病，例如病毒性感染。有效量可易於由一般熟習此項技術者鑒於本發明來測定。治療有效量可以實驗方式，例如藉由分析化合物之血液濃度來確定，或在理論上藉由一般熟習此項技術者鑒於本發明計算生物可用性來確定。

【0247】 在本申請案之特定實施例中，有效量係指足以達成以下作用中之一種、兩種、三種、四種或更多種之組合物或組合之量：(i)降低或改善HBV感染或其相關症狀之嚴重程度；(ii)縮減HBV感染或其相關症狀之持續時間；(iii)防止HBV感染或其相關症狀惡化；(iv)使得HBV感染或其相關症狀消退；(v)防止HBV感染或其相關症狀發展或發作；(vi)防止HBV感染或其相關症狀復發；(vii)使患有HBV感染之個體住院減少；(viii)縮短患有HBV感染之個體之住院時長；(ix)延長患有HBV感染之個體之存活期；(x)消除個體之HBV感染；(xi)抑制或減少個體之HBV複製；及/或(xii)增強或改善另一療法之(多種)防治或治療作用。

【0248】 治療有效量亦可為以下情況之化合物之量：足以減少與臨床血清轉化演化一致之HBsAg含量；及/或達成與個體免疫系統減少受感染肝細胞相關之持續HBsAg清除；誘導HBV-抗原特異性活化T細胞群體；及/或在治療期間或之後達成可偵測HBsAg減少，該可偵測HBsAg隨

後較佳地在治療結束之後6個月或更長時間時存留，最佳地存留一生。目標指數之實例包括低於例如100 IU/mL HBsAg之臨限值的血清HBsAg含量及/或相比例如治療開始時更大數目或更高多功能性之HBV特異性CD8 T細胞反應。目標指數之額外實例包括但不限於低於定量下限值(LLoQ)之血清HBV RNA含量；及/或比正常上限值低3倍或在個體為男性個體之情況下低於129 U/L或在個體為女性個體之情況下低於108 U/L之血清ALT濃度，更尤其在個體為男性個體之情況下低於120 U/L或在個體為女性個體之情況下低於105 U/L之血清ALT濃度，更尤其在個體為男性個體之情況下低於90 U/L或在個體為女性個體之情況下低於57 U/L之血清ALT濃度；及/或HBeAg陰性血清；及/或100 IU/mL或更低，更尤其視為經標準化之10 IU/mL或更低之血清HBsAg含量；及/或HB血清轉化；及/或低於LLoQ之核心相關抗原(crAg)。在一些較佳實施例中，有效量為足以使個體之HBsAg、HBeAg、HBV DNA、HBV cccDNA或整合HBV DNA中之一或多者之表現量降低的量。在一些實施例中，該表現量為肝細胞含量、核或細胞含量、肝含量、血清含量或血漿含量。在一些較佳實施例中，有效量為足以使個體之HBsAg、HBeAg及HBV DNA中之一或多者之血清及/或血漿含量降低的量。

【0249】 作為一般指導，當關於核酸分子或載體使用時，有效量可在約0.1 mg/kg核酸分子或載體至約5 mg/kg核酸分子或載體範圍內，諸如約0.1 mg/kg、約0.25 mg/kg、約0.5 mg/kg、約0.75 mg/kg、約1.0 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2.0 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3.0 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4.0 mg/kg、約4.5 mg/kg或約5.0 mg/kg核酸分子或載體。較佳地，核酸分子或載體之有效量為約0.25 mg/kg至約3 mg/kg。當關於醫藥

組合物中之核酸分子或載體使用時，有效量可在總計約0.01 mg/mL至約2 mg/mL核酸分子或載體之濃度範圍內，諸如0.01 mg/mL、0.02 mg/mL、0.03 mg/mL、0.04 mg/mL、0.05 mg/mL、0.06 mg/mL、0.07 mg/mL、0.08 mg/mL、0.09 mg/mL、0.1 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mL、0.75 mg/mL、1 mg/mL、1.5 mg/mL或2 mg/mL核酸分子或載體。較佳地，分子或載體之有效量少於1 mg/mL，更佳地少於0.05 mg/mL。有效量可來自一種核酸分子或載體或來自多種核酸分子或載體。有效量可在單種組合物或多種組合物，諸如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10種組合物(例如錠劑、膠囊或可注射劑或適於皮內遞送，例如適於使用皮內遞送貼片皮內遞送的任何組合物)中投與，其中多種膠囊或注射劑之投與一起向個體提供有效量。舉例而言，當使用兩種DNA質體時，有效量可為3-4 mg/mL，其中各質體為1.5-2 mg/mL。有效量可以單次治療有效劑量形式投與或以一系列治療有效劑量，諸如1、2、3、4、5次或更多次劑量形式投與，或其中該系列之劑量一起向個體提供治療有效量。當投與多次劑量時，各劑量可為相同量及/或濃度或不同量及/或濃度。一般熟習此項技術者將易於理解且實踐給藥策略最佳化。

【0250】 包含兩種核酸分子或載體，例如編碼第一HBV TALEN之第一載體及編碼第二HBV TALEN之第二載體的組合可藉由混合兩種載體或核酸分子且將混合物遞送至單一解剖部位來向個體投與。可替代地，可執行兩次獨立投與，各投與遞送單一載體或核酸分子。在該等實施例中，無論兩種載體或核酸分子係在單次投與中以混合物形式還是在兩次獨立投與中投與，第一載體或核酸分子及第二載體或核酸分子可以10:1至1:10重量比，諸如10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、

1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10重量比投與。較佳地，第一載體及第二載體或第一核酸分子及第二核酸分子係以1:1重量比投與。

【0251】 較佳地，根據本申請案之方法治療之個體為感染肝炎之個體，較佳地感染HBV之個體，尤其患有慢性HBV感染之個體。在一些實施例中，個體雙重感染HBV及HDV。急性HBV感染之特徵在於先天性免疫系統之有效活化加上後續廣泛適應性反應(例如HBV特異性T細胞、中和抗體)，此通常引起成功的對複製之抑制或受感染肝細胞之移除。相比之下，該等反應由於高病毒及抗原負荷而減弱或減少，例如HBV外膜蛋白大量產生且可以相對於感染性病毒1,000倍過量釋放於亞病毒粒子中。

【0252】 慢性HBV感染分階段加以描述，該等階段之特徵在於病毒負荷、肝酶含量(壞死性發炎活動性)、HBeAg或HBsAg負荷或針對此等抗原之抗體存在。cccDNA含量保持相對恆定，每個細胞大致10至50個複本，即使病毒血症可能顯著變化。cccDNA物種之持續性導致慢性。更具體言之，慢性HBV感染階段包括：(i)免疫耐受階段，其特徵在於高病毒負荷及正常或最低限度地增加之肝酶；(ii)免疫活化HBeAg陽性階段，其中觀測到較低或下降位準之病毒複製及顯著地增加之肝酶；(iii)非活動性HBsAg攜帶階段，其為伴隨可追蹤HBeAg血清轉化之低病毒負荷及正常血清中肝酶含量的低複製狀態；及(iv) HBeAg陰性階段，其中定期發生病毒複製(再活化)同時伴隨肝酶含量波動，前核心及/或基礎核心啟動子中之突變係常見的，以使得受感染細胞無法產生HBeAg。較佳地，有效量係指足以治療慢性HBV感染之本申請案之組合物或組合的量。

【0253】 在一些實施例中，患有慢性HBV感染之個體正在經歷核苷類似物(NUC)治療，且受NUC抑制。如本文所使用之「受NUC抑制」係

指個體具有不可偵測之HBV病毒含量及穩定的丙胺酸胺基轉移酶(ALT)含量達至少六個月。核苷/核苷酸類似物治療之實例包括諸如恩替卡韋(entacavir)及替諾福韋(tenofovir)之HBV聚合酶抑制劑。較佳地，患有慢性HBV感染之個體不會患上晚期肝纖維化或硬化。該個體通常具有小於3之針對纖維化之METAVIR分數及小於9 kPa之肝纖維化掃描(fibroscan)結果。METAVIR分數為常用於藉由B型肝炎患者之肝生物檢體之組織病理學評估來評估發炎及纖維化程度的評分系統。該評分系統分派兩個經標準化數值：一個反映發炎程度且一個反映纖維化程度。

【0254】 咸信，消除或減輕慢性HBV可允許對包括病毒誘發之硬化及肝細胞癌之嚴重肝病進行早期疾病攔截。因此，本申請案之方法亦可用作治療HBV誘發之疾病的療法。HBV誘發之疾病之實例包括但不限於硬化、癌症(例如肝細胞癌)及纖維化，尤其特徵在於針對纖維化之METAVIR分數為3或更高之晚期纖維化。在該等實施例中，有效量為足以達成12個月內HBsAg之持續減少及臨床疾病(例如硬化、肝細胞癌等)之明顯減輕的量。

【0255】 片語「誘導免疫反應」在關於本文所描述之方法使用時涵蓋提供用於治療例如HBV之病原體之治療性免疫。在一實施例中，「誘導免疫反應」意謂在有需要之個體中產生免疫，例如以提供針對諸如HBV感染或HBV與HDV雙重感染之疾病之治療作用。在某些實施例中，「誘導免疫反應」係指引起或改善例如HBV特異性CD4+及CD8+ T細胞反應之細胞免疫。在某些實施例中，此T細胞反應可引起患有CHB之經治療患者的功能性治癒。在某些實施例中，「誘導免疫反應」係指引起或改善針對HBV感染或HBV與HDV雙重感染之體液免疫反應。在某些實施例

中，「誘導免疫反應」係指引起或改善針對HBV感染或HBV與HDV雙重感染之細胞及體液免疫反應。

【0256】 如本文所使用之術語「功能性治癒」或「FC」係指患有CHB之個體之狀態，其中在個體停止所有HBV治療至少6個月後，個體之血清保持不含可偵測HBV DNA及HBsAg。舉例而言，在結束HBV治療之後6個月，FC個體之血清具有不可偵測HBV DNA且呈HBsAg陰性。FC個體之HBsAg減少可伴隨或不伴隨HBsAg血清轉化。在一些實施例中，FC持續至少1年，較佳地至少2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年或10年。最佳地，FC持續一生。

【0257】 如本文所使用之術語「T細胞功能恢復」係指耗竭及因其他原因無功能性之HBV特異性T細胞再活化，以使得其能夠執行其正常效應功能。所恢復之HBV特異性T細胞反應之實例包括但不限於：殺滅或非細胞溶解性控制感染HBV之肝細胞、殺滅具有表現HBsAg之整合HBV DNA的肝細胞及一旦達成FC，則對隨時間推移再活化之受感染細胞執行監視及殺滅。淨作用在於保持血清不含諸如HBV DNA、HBsAg及其他HBV蛋白之病毒產物。

【0258】 在一些實施例中，所揭示之mRNA分子可與一或多種用於治療及/或抑制複製肝炎感染(例如HBV及/或HDV)之額外藥劑組合使用。額外藥劑可為一或多種免疫調節劑。額外藥劑包括但不限於干擾素、核苷/核苷酸類似物、衣殼組裝調節劑、序列特異性寡核苷酸(諸如反義寡核苷酸及/或siRNA)、進入抑制劑及/或治療性HBV疫苗。在一些實施例中，所揭示之mRNA分子與細胞介素組合投與。在一些實施例中，所揭示之mRNA分子與胸腺素α-1組合投與。在一些實施例中，所揭示之mRNA分

子與針對肝炎感染之標準照護治療組合投與。針對HBV感染之標準照護治療可包括諸如以下之病毒聚合酶抑制劑：核苷酸/核苷酸類似物(例如拉米夫定(Lamivudine)、替比夫定(Telbivudine)、恩替卡韋、阿德福韋(Adefovir)、替諾福韋及克列夫定(Clevudine)、替諾福韋艾拉酚胺(Tenofovir alafenamide，TAF)、CMX157及AGX-1009)及干擾素(例如Peg-IFN-2a及IFN-a-2b、干擾素λ、重組干擾素α 2b、IFN-a)。在一些實施例中，所揭示之mRNA分子與選自由以下組成之群之干擾素組合投與：干擾素α-2a；干擾素α-2b；干擾素α-N3；干擾素β-1a；干擾素β-1b；干擾素γ-1b；干擾素λ-1；干擾素λ-2；干擾素λ-3；聚乙二醇化干擾素α-2a；聚乙二醇化干擾素α-2b；聚乙二醇化干擾素λ-1；及聚乙二醇化干擾素λ-2。在一些實施例中，所揭示之mRNA分子與一或多種TLR7促效劑組合投與。在一些實施例中，所揭示之mRNA分子與一或多種TLR8促效劑組合投與。在一些實施例中，所揭示之mRNA分子與GS-962O (4-胺基-2-丁氧基-8-3-(吡咯啶-1-基甲基)苯基)甲基-5,7-二氫喋啶-6-酮)或GS-9688 (賽爾甘托莫特(Selgantolimod))組合投與。在一些實施例中，所揭示之mRNA分子與布樂韋肽(Bulevirtide)組合投與。

【0259】 在一些實施例中，所揭示之mRNA分子與一或多種寡核苷酸在同時(共投與)或依序給藥之後組合投與。寡核苷酸可包括siRNA、ASO、間隔體(Gapmer)及/或核酸聚合物(NAP)。在一些實施例中，所揭示之mRNA分子與一或多種諸如病毒複製抑制劑之抗病毒劑組合投與。在一些實施例中，所揭示之mRNA分子與HBV衣殼組裝調節劑(CAM)組合投與。HBV CAM分子可包括JNJ 6379、NVR 3-778、AB-423、GLS-4、Bayer 41-4109、HAP-1及AT-1。在一些實施例中，所揭示之寡核苷酸構

築體與一或多種諸如TLR促效劑之免疫調節劑組合投與。TLR促效劑可包括GS-9620、GS-9688、ARB-1598、ANA975、RG7795(ANA773)、MEDI9197、PF-3512676及IMO-2055。在一些實施例中，所揭示之mRNA分子與HBV疫苗組合投與。HBV疫苗可包括Heplislav、ABX203及INO-1800。

【0260】 在一個態樣中，siRNA組分包含一或多種siRNA劑。本文所揭示之各siRNA劑包括至少一有義股及一反義股。有義股及反義股可彼此部分、實質上或完全互補。本文所描述之siRNA劑有義股及反義股之長度各自可為16至30個核苷酸長。在一些實施例中，有義股及反義股獨立地為17至26個核苷酸長。在一些實施例中，有義股及反義股獨立地為19至26個核苷酸長。在一些實施例中，有義股及反義股獨立地為21至26個核苷酸長。在一些實施例中，有義股及反義股獨立地為21至24個核苷酸長。有義股及反義股可為相同長度或不同長度。本文所揭示之HBV siRNA劑已經設計以包括反義股序列，該等反義股序列與在大部分已知血清型之HBV中保守之HBV基因體中之序列至少部分互補。在遞送至表現HBV之細胞之後，本文所描述之siRNA劑活體內或活體外抑制一或多種HBV基因之表現。在一些實施例中，siRNA分子可為JNJ 3989、VIR-2218或ARB-1467。

【0261】 siRNA劑包括有包括第一序列之有義股(亦稱為隨從股)及包括第二序列之反義股(亦稱為導引股)。本文所描述之HBV siRNA劑之有義股包括與HBV mRNA中至少16個連續核苷酸之核苷酸序列具有至少約85%一致性的核心延伸段。在一些實施例中，與HBV mRNA中之序列具有至少約85%一致性的有義股核心核苷酸延伸段為16、17、18、19、

20、21、22或23個核苷酸長。HBV siRNA劑之反義股包含在具有至少16個連續核苷酸之核心延伸段上與HBV mRNA中之序列及對應有義股具有至少約85%互補性的核苷酸序列。在一些實施例中，與HBV mRNA中之序列或對應有義股具有至少約85%互補性的反義股核心核苷酸序列為16、17、18、19、20、21、22或23個核苷酸長。

【0262】 根據本申請案之實施例之方法進一步包含向有需要之個體投與另一抗HBV劑(諸如核苷類似物或其他抗HBV劑)以及本申請案之醫藥組合物。舉例而言，另一抗HBV劑可為包括但不限於以下之小分子或抗體：免疫檢查點抑制劑(例如抗PD1、抗TIM-3等)、類鐸受體促效劑(例如TLR7促效劑及/或TLR8促效劑)、RIG-1促效劑、IL-15超促效劑(Altor Bioscience)、突變IRF3及IRF7基因佐劑、STING促效劑(Aduro)、FLT3L基因佐劑、IL-12基因佐劑、IL-7-hyFc；結合HBV env之CAR-T (S-CAR細胞)；衣殼組裝調節劑；cccDNA抑制劑、HBV聚合酶抑制劑(例如恩替卡韋及替諾福韋)。一種或其他抗HBV活性劑可為例如小分子、抗體或其抗原結合片段、多肽、蛋白質或核酸。

遞送方法

【0263】 本申請案之醫藥組合物及組合可鑒於本發明藉由此項技術中已知之任何方法投與個體，該投與包括但不限於非經腸投與(例如肌內、皮下、靜脈內或皮內注射)、經口投與、經皮投與及經鼻投與。較佳地，醫藥組合物及組合係非經腸(例如藉由靜脈內注射、肌內注射或皮內注射)或經皮投與。

【0264】 在醫藥組合物或組合包含一或多種DNA質體之本申請案之一些實施例中，投與可藉由透過皮膚注射，例如肌內或皮內注射，較佳地

肌內注射來進行。肌內注射可與電穿孔組合，亦即，施加電場以便於將DNA質體遞送至細胞中。如本文所使用之術語「電穿孔」係指使用跨膜電場脈衝在生物膜中誘導顯微性路徑(孔)。在活體內電穿孔期間，向細胞施加適當幅度及持續時間之電場，從而誘導短暫的細胞膜滲透性增強狀態，由此使得細胞能夠吸收無法獨自跨越細胞膜之分子。藉由電穿孔產生該等孔便於諸如質體、寡核苷酸、siRNA、藥物等之生物分子穿過細胞膜之一側到達另一側。已顯示，用於遞送DNA之活體內電穿孔使宿主細胞對質體之吸收顯著地增加，同時亦會在注射部位導致輕度至中度發炎。因此，與習知注射相比，利用皮內或肌內電穿孔使轉染效率顯著地提高(例如分別至多1,000倍及100倍)。

【0265】 在一典型實施例中，電穿孔與肌內注射組合。然而，亦有可能將電穿孔與例如皮內注射、皮下注射等之其他非經腸投與形式組合。

【0266】 經由電穿孔投與本申請案之醫藥組合物、組合或疫苗可使用電穿孔裝置來實現，該等電穿孔裝置可經組態以將有效引起細胞膜中形成可逆孔之能量脈衝遞送至所需哺乳動物組織。電穿孔裝置可包括電穿孔組件及電極總成或把手總成。電穿孔組件可包括以下電穿孔裝置組件中之一或多者：控制器、電流波形生成器、阻抗測試儀、波形記錄器、輸入元件、狀態報導元件、通訊埠、記憶體組件、電源及電源開關。電穿孔可使用活體內電穿孔裝置來實現。可便於遞送本申請案之組合物及免疫原性組合，尤其包含DNA質體之組合物及免疫原性組合的電穿孔裝置及電穿孔方法之實例包括CELLECTRA®(Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA)、Elgen電穿孔器(Inovio Pharmaceuticals公司)、Tri-Grid™遞送系統(Ichor Medical Systems公司, San Diego, CA 92121)及美國專利第

7,664,545號、美國專利第8,209,006號、美國專利第9,452,285號、美國專利第5,273,525號、美國專利第6,110,161號、美國專利第6,261,281號、美國專利第6,958,060號及美國專利第6,939,862號、美國專利第7,328,064號、美國專利第6,041,252號、美國專利第5,873,849號、美國專利第6,278,895號、美國專利第6,319,901號、美國專利第6,912,417號、美國專利第8,187,249號、美國專利第9,364,664號、美國專利第9,802,035號、美國專利第6,117,660號及國際專利申請公開案WO2017172838中所描述之電穿孔裝置及電穿孔方法，以上所有案皆以全文引用之方式併入本文中。本申請案亦考慮使用脈衝電場來遞送本申請案之組合物及組合，如例如美國專利第6,697,669號中所描述，該案以全文引用之方式併入本文中。

【0267】 在醫藥組合物或組合包含一或多種DNA質體之本申請案之其他實施例中，投與方法係經皮的。經皮投與可與表皮磨蝕組合以便於將DNA質體遞送至細胞。舉例而言，可使用皮膚貼片進行表皮磨蝕。在移除皮膚貼片後，組合物或組合可沈積於經磨蝕之皮膚上。

【0268】 遞送方法不限於上文所描述之實施例，且可使用任何胞內遞送方式。本申請案之方法所考慮之其他胞內遞送方法包括但不限於脂質體囊封、脂複合體、奈米粒子等。舉例而言，編碼本申請案之一或多種HBV TALEN之mRNA可經調配於包含一或多種脂質分子，較佳地帶正電之脂質分子之組合物中。在一些實施例中，編碼本發明之一或多種HBV TALEN之mRNA可使用一或多種脂質體、脂複合體及/或脂質奈米粒子來調配。在一些實施例中，本文所描述之脂質體或脂質奈米粒子調配物可包含多陽離子組合物。在一些實施例中，包含多陽離子組合物之調配物可用於活體內及/或離體遞送本文所描述之HBV TALEN。

實施例

【0269】 實施例1包含一種治療有需要之個體之肝炎感染之方法，該方法包含向該個體投與包含以下之mRNA分子組合：

(1) 第一mRNA分子，其包含編碼第一類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第一TALEN單體包含第一TALE DNA結合域及第一核酸酶催化域，其中該第一TALE DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之第一半位點序列；及

(2) 第二mRNA分子，其包含編碼第二TALEN單體之聚核苷酸序列，該第二TALEN單體包含第二TALE DNA結合域及第二核酸酶催化域，其中該第二TALE DNA結合域能夠結合至該目標核酸序列之第二半位點序列；

其中當該第一TALE DNA結合域結合至該第一半位點序列且該第二TALE DNA結合域結合至該第二半位點序列時，該第一TALEN單體及該第二TALEN單體能夠形成裂解該目標核酸序列之二聚體，

較佳地，該第一核酸酶催化域為第一FokI核酸酶催化域且該第二核酸酶催化域為第二FokI核酸酶催化域。

【0270】 實施例1a包含如實施例1之方法，其中該第一FokI核酸酶催化域與該第二FokI核酸酶催化域相同。

【0271】 實施例1b包含如實施例1之方法，其中該第一FokI核酸酶催化域與該第二FokI核酸酶催化域不同。

【0272】 實施例2包含如實施例1至1b中任一例之方法，其中該目標核酸序列係在編碼HBsAg及HBV聚合酶(pol)之序列內。

【0273】 實施例2a包含如實施例2之方法，其中該目標核酸序列之

該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 1之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且該目標核酸序列之該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 2之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列。

【0274】 實施例2b包含如實施例2之方法，其中該目標核酸序列之該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 3之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且該目標核酸序列之該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 4之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列。

【0275】 實施例2c包含如實施例2之方法，其中該目標核酸序列包含與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之核酸序列至少90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列。

【0276】 實施例3包含如實施例1至2c中任一例之方法，其中該第一mRNA分子及該第二mRNA分子各自進一步包含5'端帽、5'-UTR、編碼核定位信號之序列、編碼N端域之序列、編碼C端域之序列、3'-UTR及多腺苷尾中之一或多者，較佳地全部。

【0277】 實施例3a包含如實施例3之方法，其中該第一mRNA分子及該第二mRNA分子各自包含5'端帽、5'-UTR、編碼N端域之序列、編碼

C端域之序列、3'-UTR及多腺苷尾。

【0278】 實施例3b包含如實施例3之方法，其中該第一mRNA分子及該第二mRNA分子各自包含5'端帽、5'-UTR、編碼核定位信號之序列、編碼N端域之序列、編碼C端域之序列、3'-UTR及多腺苷尾。

【0279】 實施例4包含如實施例1至3b中任一例之方法，其中各別地，該第一TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 9至少90%一致之胺基酸序列，該第二TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 10至少90%一致之胺基酸序列，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自包含與SEQ ID NO: 11至少90%一致之胺基酸序列。

【0280】 實施例4a包含如實施例4之方法，其中該第一TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 7至少90%一致之胺基酸序列，該第二TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 8至少90%一致之胺基酸序列，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自包含與SEQ ID NO: 11至少90%一致之胺基酸序列。

【0281】 實施例4a1包含如實施例4a之方法，其中該第一TALE DNA結合域包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列，該第二TALE DNA結合域包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。

【0282】 實施例4a2包含如實施例4a之方法，其中該第一TALE DNA結合域由SEQ ID NO: 7之胺基酸序列組成，該第二TALE DNA結合域由SEQ ID NO: 8之胺基酸序列組成，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自由SEQ ID NO: 11之胺基酸序列組成。

【0283】 實施例4b包含如實施例4之方法，其中該第一TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 9至少90%一致之胺基酸序列，該第二TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 10至少90%一致之胺基酸序列，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自包含與SEQ ID NO: 11至少90%一致之胺基酸序列。

【0284】 實施例4b1包含如實施例4b之方法，其中該第一TALE DNA結合域包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列，該第二TALE DNA結合域包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。

【0285】 實施例4b2包含如實施例4b之方法，其中該第一TALE DNA結合域由SEQ ID NO: 9之胺基酸序列組成，該第二TALE DNA結合域由SEQ ID NO: 10之胺基酸序列組成，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自由SEQ ID NO: 11之胺基酸序列組成。

【0286】 實施例5包含如實施例1至4b2中任一例之方法，其中該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及J中之一或多者。

【0287】 實施例5a包含如實施例5之方法，其中該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G及H中之一或多者。

【0288】 實施例6包含如實施例1至5a中任一例之方法，該方法進一步包含向該個體投與第二治療性組合物，較佳地包含抗HBV劑之第二治療性組合物。

【0289】 實施例7包含如實施例1至6中任一例之方法，其中該個體患有HBV感染，較佳地慢性HBV感染。

【0290】 實施例8包含如實施例1至7中任一例之方法，其中該個體

雙重感染HBV及HDV。

【0291】 實施例9包含一種組合物，該組合物包含經囊封於脂質奈米粒子中之包含以下之mRNA分子組合：

(3) 第一mRNA分子，其包含編碼第一類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第一TALEN單體包含第一TALE DNA結合域及第一核酸酶催化域，其中該第一TALE DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之第一半位點序列；及

(4) 第二mRNA分子，其包含編碼第二TALEN單體之聚核苷酸序列，該第二TALEN單體包含第二TALE DNA結合域及第二核酸酶催化域，其中該第二TALE DNA結合域能夠結合至該目標核酸序列之第二半位點序列；

其中當該第一TALE DNA結合域結合至該第一半位點序列且該第二TALE DNA結合域結合至該第二半位點序列時，該第一TALEN單體及該第二TALEN單體能夠形成裂解該目標核酸序列之二聚體，

較佳地，該第一核酸酶催化域為第一FokI核酸酶催化域且該第二核酸酶催化域為第二FokI核酸酶催化域。

【0292】 實施例9a包含如實施例9之組合物，其中該第一FokI核酸酶催化域與該第二FokI核酸酶催化域相同。

【0293】 實施例9b包含如實施例9之組合物，其中該第一FokI核酸酶催化域與該第二FokI核酸酶催化域不同。

【0294】 實施例9c包含如實施例9至9b中任一例之組合物，其中各mRNA分子經個別地囊封於脂質奈米粒子中。

【0295】 實施例9d包含如實施例9至9b中任一例之組合物，其中多

個mRNA分子經囊封於個別脂質奈米粒子中。

【0296】 實施例10包含如實施例9至9d中任一例之組合物，其中該目標核酸序列係在編碼HBsAg及HBV聚合酶(pol)之序列內。

【0297】 實施例10a包含如實施例10之組合物，其中該目標核酸序列之該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 1之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且該目標核酸序列之該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 2之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列。

【0298】 實施例10b包含如實施例10之組合物，其中該目標核酸序列之該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 3之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且該目標核酸序列之該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 4之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列。

【0299】 實施例10c包含如實施例10之組合物，其中該目標核酸序列包含與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之核酸序列至少90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列。

【0300】 實施例11包含如實施例9至10c中任一例之組合物，其中該第一mRNA分子及該第二mRNA分子各自進一步包含5'端帽、5'-UTR、編

碼核定位信號之序列、編碼N端域之序列、編碼C端域之序列、3'-UTR及多腺苷尾中之一或多者。

【0301】 實施例12包含如實施例9至11中任一例之組合物，其中各別地，該第一TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 9至少90%一致之胺基酸序列，該第二TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 10至少90%一致之胺基酸序列，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自包含與SEQ ID NO: 11至少90%一致之胺基酸序列。

【0302】 實施例12a包含如實施例12之組合物，其中該第一TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 7至少90%一致之胺基酸序列，該第二TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 8至少90%一致之胺基酸序列，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自包含與SEQ ID NO: 11至少90%一致之胺基酸序列。

【0303】 實施例12a1包含如實施例12a之組合物，其中該第一TALE DNA結合域包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列，該第二TALE DNA結合域包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。

【0304】 實施例12a2包含如實施例12a之組合物，其中該第一TALE DNA結合域由SEQ ID NO: 7之胺基酸序列組成，該第二TALE DNA結合域由SEQ ID NO: 8之胺基酸序列組成，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自由SEQ ID NO: 11之胺基酸序列組成。

【0305】 實施例12b包含如實施例12之組合物，其中該第一TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 9至少90%一致之胺基酸序列，該第二

TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 10至少90%一致之胺基酸序列，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自包含與SEQ ID NO: 11至少90%一致之胺基酸序列。

【0306】 實施例12b1包含如實施例12b之組合物，其中該第一TALE DNA結合域包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列，該第二TALE DNA結合域包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。

【0307】 實施例12b2包含如實施例12b之組合物，其中該第一TALE DNA結合域由SEQ ID NO: 9之胺基酸序列組成，該第二TALE DNA結合域由SEQ ID NO: 10之胺基酸序列組成，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自由SEQ ID NO: 11之胺基酸序列組成。

【0308】 實施例13包含如實施例9至12b2中任一例之組合物，其中該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及J中之一或多者。

【0309】 實施例13a包含如實施例13之組合物，其中該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G及H中之一或多者。

【0310】 實施例14包含如實施例9至13a中任一例之組合物，其中囊封該mRNA分子組合之該等脂質奈米粒子包含陽離子脂質及至少一種選自由陰離子脂質、兩性離子脂質、中性脂質、類固醇、聚合物結合型脂質、磷脂、醣脂及其組合組成之群之其他脂質。

【0311】 實施例15包含一種組合，該組合具有：

(1)第一核酸，較佳地第一mRNA分子，其包含編碼第一類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第一TALEN單體包含

第一TALE DNA結合域及第一FokI核酸酶催化域，其中該第一TALE DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之第一半位點序列，且該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 1之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列；及

(2)第二核酸，較佳地第二mRNA分子，其包含編碼第二類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第二TALEN單體包含第二TALE DNA結合域及第二FokI核酸酶催化域，其中該第二TALE DNA結合域能夠結合至該目標核酸序列之第二半位點序列，且該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 2之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列；

其中當該第一TALE DNA結合域結合至該第一半位點序列且該第二TALE DNA結合域結合至該第二半位點序列時，該第一TALEN單體及該第二TALEN單體能夠形成裂解該目標核酸序列之二聚體。

【0312】 實施例15a包含如實施例15之組合，其中該第一半位點序列包含SEQ ID NO: 1之核酸序列且該第二半位點序列包含SEQ ID NO: 2之核酸序列。

【0313】 實施例15b包含如實施例15之組合，其中該第一半位點序列由SEQ ID NO: 1之核酸序列組成且該第二半位點序列由SEQ ID NO: 2之核酸序列組成。

【0314】 實施例16包含如實施例15至15b中任一例之組合，其中該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及J中之一或多者。

【0315】 實施例16a包含如實施例16之組合，其中該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G及H中之一或多者。

【0316】 實施例17包含一種組合物，該組合物包含如實施例15至16b中任一例之組合，其中該第一核酸及該第二核酸分開或共同經囊封於脂質奈米粒子中。

【0317】 實施例18包含一種核酸分子，該核酸分子編碼如實施例15至15b中任一例之第一mRNA分子及第二mRNA分子中之至少一者。

【0318】 實施例19包含一種經分離宿主細胞，該經分離宿主細胞包含如實施例18之核酸分子。

【0319】 實施例20包含如實施例19之經分離宿主細胞，其中該宿主細胞為肝細胞。

【0320】 實施例21包含一種醫藥組合物，該醫藥組合物包含如實施例9至14或17中任一例之組合物、如實施例15至16a中任一例之組合、如實施例18之核酸分子或如實施例19或20之經分離宿主細胞及醫藥學上可接受之載劑。

【0321】 實施例22包含一種裂解HBV基因體中之目標核酸序列之方法，該方法包含使該HBV基因體與如實施例9至14或17中任一例之組合物、如實施例15至16a中任一例之組合、如實施例18之核酸分子、如實施例19或20之經分離宿主細胞或如實施例21之醫藥組合物接觸。

【0322】 實施例23包含一種誘導HBV基因體中之目標核酸序列之基因編輯的方法，該方法包含使該HBV基因體與如實施例9至14或17中任一例之組合物、如實施例15至16a中任一例之組合、如實施例18之核酸分子、如實施例19或20之經分離宿主細胞或如實施例21之醫藥組合物接

觸。

【0323】 實施例24包含如實施例22或23之方法，其中該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及J中之一或多者。

【0324】 實施例24a包含如實施例24之方法，其中該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G及H中之一或多者。

【0325】 實施例25包含一種治療有需要之個體之肝炎感染之方法，該方法包含向該個體投與如實施例21之醫藥組合物。

【0326】 實施例26包含一種減輕個體之HBV感染及/或減少個體之HBV複製的方法，該方法包含向該個體投與如實施例21之醫藥組合物。

【0327】 實施例27包含如實施例25或26之方法，該方法進一步包含向該個體投與第二治療性組合物，較佳地包含抗HBV劑之第二治療性組合物。

【0328】 實施例28包含如實施例25至27中任一例之方法，其中該個體患有HBV感染，較佳地慢性HBV感染。

【0329】 實施例29包含如實施例25至28中任一例之方法，其中該個體雙重感染HBV及HDV。

【0330】 實施例30包含如實施例25至29中任一例之方法，其中該個體之HBsAg、HBeAg、HBV DNA、HBV cccDNA或整合HBV DNA中之一或多者之表現量降低。

【0331】 實施例30a包含如實施例30之方法，其中該個體之HBsAg、HBeAg及HBV DNA中之一或多者之血清及/或血漿含量降低。

【0332】 實施例31包含如實施例30之方法，其中該表現量為肝細胞含量、核或細胞含量、肝含量、血清含量或血漿含量。

【0333】 實施例32包含一種產生TALEN之方法，該方法包含活體外或活體內轉錄如實施例18之核酸分子。

【0334】 實施例33包含如實施例21之醫藥組合物，該醫藥組合物係用於治療有需要之個體之B型肝炎病毒(HBV)誘發之疾病，較佳地其中該個體患有慢性HBV感染。

【0335】 實施例33a包含如實施例33之醫藥組合物以及另一治療劑，較佳地另一抗HBV劑。

【0336】 實施例34包含如實施例33或33a之醫藥組合物，其中該HBV誘發之疾病選自由晚期纖維化、硬化及肝細胞癌(HCC)組成之群。

用於實例1-6之材料及方法

細胞及培養

【0337】 將低溫保存之HepG2.2.15細胞(福克斯蔡斯癌症中心(Fox Chase Cancer Center))解凍且在含有10% FBS且補充有抗生素、2 mM L-麩醯胺酸及G418之達爾伯克氏改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium，DMEM) (Invitrogen)中培養。將細胞在經膠原蛋白I塗佈之燒瓶及盤上培養。

【0338】 將低溫保存之原代人類肝細胞(PHH) (Lonza，批號8317)解凍且在含有10% FBS及包括HEPES、L-脯胺酸、胰島素、表皮生長因子、地塞米松(dexamethasone)、抗壞血酸-2-磷酸鹽及2% DMSO (Sigma)之補充混合液的達爾伯克氏改良伊格爾培養基(DMEM) (Invitrogen)中培養。

HBV接種物

【0339】 收集基因型(GT) D HBV接種物且自組成性表現GT D HBV

之HepG2.2.15人類肝胚細胞瘤細胞(Genbank U95551)之上清液中濃縮。來自患者血清之GT A (PS 3.57)、B (PS 3.4)、C (PS 3.7)及D (PS 3.56) HBV接種物係購自American Red Cross。

HBV DNA質體

【0340】先前自感染HBV之患者之血清(Genbank AY220698，Fudan University，China)選殖含有處於CMV啟動子控制下之1.1x基因型B HBV基因體的質體DNA。來自基因型A (Genbank AF305422)、C (Genbank AB033550)、D (Genbank V01460)、E (Genbank AB274971)、F (Genbank AB036912)、G (Genbank AF160501)及H (Genbank AB375159)之HBV序列為以1.1x基因體形式合成之基因，且包括在5'端處之CMV啟動子之一部分。藉由定序來確認基因合成段且使用限制位點SalI及NdeI (Genewiz，USA)將其次選殖至pCMV-HBV質體中。

HBV TALEN mRNA

【0341】將TALEN DNA序列選殖至具有T7啟動子之質體中以用於活體外轉錄。使用BspQI限制位點線性化質體且將其活體外轉錄。簡言之，將三磷酸核苷酸(NTP)及T7 RNA聚合酶與線性化模板在緩衝水溶液中組合且將其培育。使用管柱層析法純化所得mRNA轉錄物，使用酶促反應自mRNA移除DNA及雙股RNA污染物，濃縮mRNA，且更換緩衝液。

使用HepG2.2.15細胞轉染HBV TALEN mRNA

【0342】在轉染之日，將編碼右或左TALEN蛋白之mRNA在OptiMEM培養基中以1:1比率組合，之後與脂染胺MessengerMAX轉染試劑(Invitrogen)混合。亦在不存在HBV TALEN mRNA之情況下製備轉染混合物作為無TALEN對照。將轉染混合物置放於96孔盤孔上以反向轉染

以30,000/孔之密度接種於轉染混合物之頂部上且維持在37℃下隔夜之所生長之HepG2.2.15細胞，之後移除含有轉染混合物之培養基且補給新鮮細胞培養基。將經轉染細胞維持在30℃下，且在轉染後第3天更換另一培養基。在轉染後第6天監測基因編輯及經分泌HBsAg。

使用PHH進行之HBV感染及HBV TALEN mRNA轉染

【0343】 在HBV感染前至少一天，將PHH以240,000個細胞/孔之密度接種於經膠原蛋白塗佈之24孔盤中。在含有4% PEG-8000 (Sigma)之培養基中以200基因體當量/細胞用HBV接種物感染PHH。次日，移除HBV接種物，且使cccDNA及病毒複製建立至少5天，之後轉染編碼HBV TALEN之mRNA。在轉染之日，將編碼右或左TALEN蛋白之mRNA在OptiMEM培養基中以1:1比率組合，之後與脂染胺messenger Max轉染試劑(Invitrogen)混合。亦在不存在HBV TALEN mRNA之情況下製備轉染混合物作為無TALEN對照。在37℃下用或不用HBV TALEN mRNA轉染感染HBV之PHH隔夜，之後移除含有轉染混合物之培養基且補給新鮮PHH培養基。將經轉染細胞維持在30℃下，且在轉染後第3天更換另一培養基。在轉染後第6天監測基因編輯及經分泌HBsAg及HBeAg。

於細胞培養物中之HBV TALEN蛋白及HBV抗原偵測

【0344】 在轉染後6小時藉由免疫螢光來偵測HBV TALEN蛋白於經轉染PHH中之表現。用灌注固定劑(Electron Microscopy Sciences，VWR)固定細胞，藉由使用1% Triton-X 100使其滲透且用3%正常山羊血清(NGS)/PBS將其阻斷。藉由使用含有3% NGS之一級肽標籤特異性抗體執行免疫染色，接著用1:1000稀釋於含有3% NGS之PBS中之山羊抗小鼠Alexa Fluor 488 (Invitrogen)進行二次染色。核染色係聯合二次染色進

行，其中1:1000稀釋之DAPI (ThermoFisher)與二級抗體混合。藉由使用分別對應於HBsAg及HBeAg之定量偵測之化學發光免疫分析套組(Autobio Diagnostics)，監測來自感染HBV之PHH或HepG2.2.15細胞之上清液的HBsAg及HBeAg含量。在Opera系統(Perkin Elmer)上執行免疫螢光染色及成像。

HBV cccDNA基因編輯偵測

【0345】在HBV TALEN mRNA轉染後第6天，在室溫下用含有50 mM Tris-HCl，pH 7.5、150 mM NaCl、1% NP40之溶解緩衝液處理PHH達10分鐘。短暫離心細胞以分離核，藉由使用NucleoSpin Tissue套組(Macherey-Nagel)自該核提取基因體及HBV DNA。為了自cccDNA移除松環形式之HBV DNA，在37℃下用10個單位之T5核酸外切酶(New England Biolabs)處理所提取之DNA達60分鐘。隨後，藉由在90℃下加熱5分鐘使T5核酸外切酶失活。藉由使用正向引子5'-CCT AGG ACC CCT TCT CGT GT (SEQ ID NO: 29)及反向引子5'-ACT GAG CCA GGA GAA ACG GG (SEQ ID NO: 30)以及Platinum高保真PCR超混合液(Invitrogen)，使用95℃ 1次循環10分鐘、95℃ 45次循環30秒(變性步驟)、64℃ 30秒(黏接步驟)、72℃ 30秒(延伸步驟)、接著在72℃下最終延伸10分鐘之循環條件來擴增HBsAg編碼區內之靶向HBV序列。將10× NEB2緩衝液及水添加至10 μL PCR反應物中達到1×之最終濃度且在95℃下變性10分鐘，且隨後藉由首先使溫度以3℃/秒降低至85℃且隨後以0.3℃/秒進一步降低至25℃來再黏結。藉由添加5個單位之T7E1核酸酶(New England Biolabs)裂解錯配DNA序列且在37℃下培育1小時。藉由電泳，使用Novex 10% TBE凝膠(Thermo Fisher)且用SYBR綠(Thermo Fisher)染

色以使用FluorChem M成像器(Protein Simple)藉由UV進行觀測來分析經消化產物及未經消化產物。另外，提交擴增子用於次世代定序(Genewiz)以測定TALEN目標區域內之變化。

脂質奈米粒子內之編碼HBV TALEN之mRNA調配

【0346】 藉由混合於乙醇中之脂質(陽離子脂質:DSPC:膽固醇:PEG-DMG)與編碼溶解於檸檬酸鹽緩衝液中之所需多肽的mRNA來製備經脂質囊封之mRNA粒子。瞬時用磷酸鹽緩衝液稀釋混合材料。藉由使用再生纖維素膜(100 kD MWCO)用磷酸鹽緩衝液透析或藉由使用經改質之聚醚碸(mPES)中空纖維膜(100 kD MWCO)進行切向流過濾(TFF)來移除乙醇。一旦完全移除乙醇，則用含有50 mM NaCl及9%蔗糖，pH 7.3之HEPES(4-(2-羥乙基)-1-哌啉乙磺酸)緩衝液更換緩衝液。濃縮調配物，接著使用PES過濾器進行0.2 μm過濾。隨後，藉由Ribogreen螢光分析量測調配物中之mRNA濃度，其後藉由用含有50 mM NaCl、9%蔗糖，pH 7.3、含有甘油之HEPES緩衝液進行稀釋來將濃度調節至最終所需濃度。接著，經由0.2 μm過濾器過濾最終調配物且將其填充至玻璃小瓶中，塞住，加蓋且置放在-70±5℃下。針對冷凍調配物之mRNA含量及囊封百分比藉由Ribogreen分析、針對mRNA完整性藉由片段分析器、針對脂質含量藉由高效液相層析法(HPLC)、針對粒度藉由在Malvern Zetasizer Nano ZS上之動態光散射、針對pH及重量莫耳滲透濃度對冷凍調配物進行表徵。

感染AAV-HBV之小鼠模型

【0347】 藉由靜脈內尾註射用1 × 10^11之AAV腺病毒感染性粒子-1.3× HBV (FivePlus)感染C57Bl6雄性小鼠(Taconic)。在感染後四週，收集血清且對其進行分析以定量HBsAg及HBeAg含量。選擇具有4個或更多

個對數之HBsAg之小鼠用於活體內功效研究。

血清中之HBV抗原及HBV DNA偵測及定量

【0348】 藉由使用化學發光免疫分析套組(Autobio Diagnostics)來量測AAV-HBV小鼠之小鼠血清中之HBsAg及HBeAg含量。將血清1:100及1:250稀釋於PBS中以分別用於HBeAg及HBsAg CLIA偵測。

【0349】 遵循QIAamp DNA小型套組(Qiagen，目錄號51306)之說明書，亦即針對病毒DNA之附件方案，自5 µl血清提取HBV DNA。簡言之，在56℃下在蛋白酶K緩衝液中培育10 min之後，使樣本與100%乙醇混合且將其施用至QIAmp小型旋轉管柱。如說明書中所指示，離心旋轉管柱且洗滌，且使經分離DNA再懸浮於30 µl水中。

【0350】 使用2× TaqMan快速發展混合物(Thermo Fisher，目錄號4444557)與20× sAg探針(Thermo Fisher，分析Id Vi03453406_s1 TaqMan基因表現分析(FAM)染料標籤及分析濃度FAM-MGB)之混合物擴增經純化血清HBV DNA，且使用QuantStudio 6 Flex qPCR機器及使用50℃ 1次循環2分鐘及95℃ 2分鐘、95℃ 45次循環10秒(變性步驟)、60℃ 20秒(黏接步驟)、72℃ 30秒(延伸步驟)伴隨1.6℃/秒之上升速度之循環條件運行。對於定量，使用藉由AATC進行之合成HBV DNA之已知數目之複本的連續稀釋並行運行標準曲線(定量合成B型肝炎病毒DNA (ATCC® VR-3232SD™))。提取資料且使用QuantStudio軟體分析，而使用GraphPad軟體執行統計分析。

小鼠肝組織中之HBV DNA基因編輯偵測

【0351】 對於基因編輯分析，使用來自*Quick*-DNA小量製備增強版套組(ZymoResearch目錄號D4068)之試劑及方案自速凍小鼠肝提取HBV

DNA。首先，將速凍小鼠肝組織置放於蛋白酶K消化緩衝液中且藉由兩種機械破裂，使用用於軟組織之0.5 ml來自Precellys溶解套組之試管(Precellys，目錄號P000933-LYSK0-A)在Precellys演化均質機(Precellys，Bertin Instruments)中均質化，且隨後藉由消化，在55℃下培育樣本20分鐘。隨後，如所指示，藉由旋轉管柱清理，在*Quick*-DNA小量製備增強版套組中純化HBV DNA。在50 µl DNA溶離緩衝液中溶離基因體DNA且定量。

【0352】藉由PCR，使用混合於25 µl PCR反應物中之5 ng/µl經純化DNA及2× SuperFI Platinum主混合物(Invitrogen，目錄號12358250)；正向引子5'- ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CG-3' (SEQ ID NO: 29)及反向引子5'- GAC TGG AGT TCA GAC GTG TGC TCT TCC GAT CTG TCC GAA GGT TTG GTA CAG C -3' (SEQ ID NO: 30)及使用98℃ 1次循環2分鐘、95℃ 35次循環15秒(變性步驟)、60℃ 15秒(黏接步驟)、72℃ 30秒(延伸步驟)、接著在72℃下最終延伸5分鐘之循環條件來擴增HBV DNA目標序列。用NucleoSpin®凝膠及PCR清理套組(Macherey-Nagel)遵循套組說明書清理PCR產物，在NE緩衝液中溶離，定量且視需要稀釋至20 ng/µl以用於NGS定序。提交樣本用於擴增子定序(Amplicon-EZ)及在Genewiz處之分析。

實例

實例1：TALEN目標位點及TALEN結構

【0353】使用公開可獲得的生物資訊工具來預測共同HBV基因體序列內之潛在TALEN目標位點。TALEN目標位點選自編碼HBsAg/pol以減少HBsAg分泌及病毒複製之基因內(圖1A)。TALEN 28及TALEN 33靶向

長度分別為50及53個鹼基對之HBV基因體區，包括左臂TALEN序列、右臂TALEN序列及兩臂之間的間隔序列(圖1B)。所有TALEN蛋白皆由mRNA分子編碼，該等mRNA分子包括端帽、5'非轉譯區(UTR)、編碼標籤肽之序列、編碼核定位信號之序列、編碼TALEN N端域之序列、編碼具有含有重複可變雙殘基(RVD)之重複域之TALEN DNA結合域的序列、編碼C端域之序列、編碼FokI核酸酶之序列、3' UTR及多腺苷尾。視情況而言，可製造構築體，該等構築體包括端帽、5'非轉譯區(UTR)、編碼核定位信號之序列、編碼TALEN N端域之序列、編碼具有含有重複可變雙殘基(RVD)之重複域之TALEN DNA結合域的序列、編碼C端域之序列、編碼FokI核酸酶之序列、3' UTR及多腺苷尾。用於靶向四個DNA核苷酸鹼基之TALEN 28及TALEN 33 RVD為NN (靶向A及G)、NI (靶向T)、NG (靶向C)及HD (靶向G) (圖1C)。

實例2：TALEN目標位點為保守的且TALEN顯示寬功能基因型覆蓋度

【0354】 在包括所有不同HBV基因型之數百個HBV基因體序列中執行TALEN 28及33左臂及右臂之HBV目標序列之保守分析。跨越不同基因型之HBV目標序列之比對顯示極高保守性，對於TALEN 28及TALEN 33為97-100% (分別為下表1及表2)。對於TALEN 28及TALEN 33之右臂所靶向之序列，兩個位置顯示基因型A及C之錯配(下表1及表2)。

表1.跨越HBV基因型A至H之TALEN 28之左臂及右臂的類似性百分比分析

TALEN 28左目標序列(針對HBV基因型之類似性%)																				
HBV GT	分離株數目	**T**	**G**	**C**	**T**	**G**	**C**	**T**	**A**	**T**	**G**	**C**	**C**	**T**	**C**	**A**	**T**	**C**	**T**	**T**	**C**
總計	6341																				
A	855	100.0	99.9	100.0	99.8	100.0	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9	99.8	100.0	99.9	100.0	100.0	99.9	100.0	100.0
B	1749	99.9	99.8	100.0	99.8	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9	99.8	99.8	99.9	99.8	99.9	99.9	99.7	99.9	99.9	99.2	100.0
C	2179	99.9	99.9	99.9	99.8	100.0	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.7	99.9	99.9	99.0	100.0	100.0	99.8	100.0
D	954	100.0	100.0	100.0	100.0	97.5	99.9	99.8	99.9	100.0	99.9	99.9	100.0	100.0	99.9	100.0	98.8	100.0	100.0	99.9	99.9
E	290	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
F	248	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0	100.0	100.0	100.0
G	40	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
H	26	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	96.2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

TALEN 28右目標序列(針對HBV基因型之類似性%)																	
HBV GT	分離株數目	C	T	G	G	A	C	T	A	T	C	A	A	G	G	T	A
總計	6341																
A	855	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	1.3	99.9	93.1	91.2	99.9	100.0	97.5	99.1	99.8	99.9	99.8
B	1749	99.8	99.9	99.9	99.9	99.9	99.5	99.9	98.7	99.3	99.9	99.8	97.6	99.9	99.9	99.9	99.9
C	2179	93.5	99.7	100.0	100.0	99.8	99.2	100.0	98.3	9.9	98.7	98.4	98.2	99.8	100.0	100.0	99.9
D	954	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	99.9	99.4	99.0	100.0	98.5	97.1	100.0	100.0	99.9	99.9
E	290	100.0	99.7	100.0	100.0	99.0	100.0	100.0	99.7	100.0	100.0	99.3	96.9	100.0	100.0	99.7	100.0
F	248	94.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	92.3	100.0	99.6	97.6	100.0	100.0	100.0	100.0
G	40	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.5	100.0	100.0	100.0	100.0
H	26	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

表2.跨越HBV基因型A至H之TALEN 33之左臂及右臂的類似性百分比分析

TALEN 33左目標序列(針對HBV基因型之類似性%)																			
HBV GT	分離株數目	T	C	C	T	G	C	T	G	C	T	A	T	G	C	C	T	C	A	T
總計	6341	99.9	99.9	100.0	99.9	99.9	100.0	99.8	99.6	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	100.0	99.8	99.9	99.9	99.4
A	855	99.9	100.0	100.0	100.0	99.9	100.0	99.8	100.0	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9	99.8	100.0	99.9	100.0
B	1749	99.9	100.0	99.9	99.9	99.8	100.0	99.8	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9	99.8	99.8	99.9	99.8	99.9	99.9	99.7
C	2179	99.8	99.8	100.0	99.9	100.0	99.9	99.8	100.0	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.7	99.9	99.9	99.0
D	954	99.8	100.0	99.9	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	99.9	99.8	99.9	100.0	99.9	99.9	100.0	100.0	99.9	100.0	98.8
E	290	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.3	99.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
F	248	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6
G	40	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
H	26	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	96.2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

TALEN 33右目標序列(針對HBV基因型之類似性%)																			
HBV GT	分離株數目	C	T	T	C	T	G	G	A	C	T	A	T	C	A	A	G	G	T	A
總計	6341	99.9	100.0	99.6	97.5	99.8	100.0	100.0	99.8	86.2	100.0	98.0	67.2	99.5	99.1	97.7	99.8	99.9	99.9	99.9
A	855	99.8	100.0	98.2	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	1.3	99.9	93.1	91.2	99.9	100.0	97.5	99.1	99.8	99.9	99.8
B	1749	99.9	100.0	99.9	99.8	99.9	99.9	99.9	99.9	99.5	99.9	98.7	99.3	99.9	99.8	97.6	99.9	99.9	99.9	99.9
C	2179	100.0	100.0	99.8	93.5	99.7	100.0	100.0	99.8	99.2	100.0	98.3	9.9	98.7	98.4	98.2	99.8	100.0	100.0	99.9
D	954	99.9	99.8	99.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	99.9	99.4	99.0	100.0	98.5	97.1	100.0	100.0	99.9	99.9
E	290	100.0	100.0	100.0	100.0	99.7	100.0	100.0	99.0	100.0	100.0	99.7	100.0	100.0	99.3	96.9	100.0	100.0	99.7	100.0
F	248	100.0	100.0	100.0	94.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	92.3	100.0	99.6	97.6	100.0	100.0	100.0	100.0
G	40	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.5	100.0	100.0	100.0	100.0
H	26	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

【0355】 為了以圖形方式表示TALEN 28及TALEN 33所靶向之序列保守性，基於不同HBV基因體中各靶向核苷酸之豐度生成保守性標誌，其中保守性愈高，(多個)豐富核苷酸之尺寸愈大。TALEN 28及TALEN 33左臂顯示跨越所有靶向核苷酸之極高保守性(圖2A及圖3A)。對於TALEN 28及TALEN 33兩者之右臂所靶向之HBV序列，發現顯示兩個替代性鹼基(C或T)之兩個位置(用於TALEN 28之位置6及9，圖2B；用於TALEN 33之位置9及12，圖3B)，此視HBV基因型而定。

【0356】 為了理解HBV目標序列之變化可如何影響TALEN功效，使用生物化學分析評估TALEN 28及TALEN 33基因型覆蓋度。將來自8種不同基因型之HBV序列選殖至質體中且將其TALEN 28及TALEN 33目標序列進行比對，顯示了基因型A及C之單一錯配(圖4A及圖4B)。使用網狀紅血球活體外轉譯系統(Promega)活體外轉譯來自TALEN 28及TALEN 33 mRNA之左臂及右臂且將其與含有不同HBV基因型之序列的線性化質體一起培育。使用聚丙烯醯胺凝膠分析含有HBV目標序列之質體的TALEN消化且藉由在未切割DNA中不存在之新DNA片段之存在對其進行偵測。TALEN 28及TALEN 33顯示所測試之所有HBV基因型(A至H)的DNA裂解，因此展現寬基因型覆蓋度(圖4C)。藉由用不同基因型(A、B、C及D)之HBV感染原代人類肝細胞且用TALEN 33 mRNA轉染該等細胞來驗證在生物化學分析中觀測到之TALEN 33的基因型覆蓋度。在所有經TALEN 33 mRNA轉染之樣本中觀測到HBV DNA破裂(圖8，表3)。

表3. TALEN 33誘導感染HBV GT A至D之PHH之cccDNA破裂*

GT A (PS 3.57) HBsAg目標序列	讀段
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTATTGGTTCTTCTGGATTATCAAGGTA	40692
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA	2017
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCT--TTGGTTCTTCTGGATTATCAAGGTA	1934
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTC-TATTGGTTCTTCTGGATTATCAAGGTA	1069
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTA-TGGTTCTTCTGGATTATCAAGGTA	1000
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTC---TTGGTTCTTCTGGATTATCAAGGTA	856

GT B (PS 3.4) HBsAg目標序列	讀段
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA	66704
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCT--TTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA	4073
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTC---TTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA	2355
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTG-TGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA	2162
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTC----TGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA	1679
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTC-TGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA	1074

GT C (PS 3.7) HBsAg目標序列	讀段
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTACCAAGGTA	60493
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTC-TGTTGGTTCTTCTGGACTACCAAGGTA	4323
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCT--TTGGTTCTTCTGGACTACCAAGGTA	3384
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTC---TTGGTTCTTCTGGACTACCAAGGTA	2863
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTC----TGGTTCTTCTGGACTACCAAGGTA	1087

GT D (PS 3.56) HBsAg目標序列	讀段
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA	24933
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCT--TTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA	3649
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTC---TTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA	3191
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTC----TGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA	1790
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTC-TGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA	1672
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTG-TGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA	1286
TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTT----GTTCTTCTGGACTATCAAGGTA	497

HBV基因#	TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA
Pol	P A A M P H L L V G S S G L S R
HBsAg#	L L L C L I F L L V L L D Y Q G

* 藉由靶向擴增子之次世代定序來檢驗TALEN 33誘導之靶向cccDNA序列破裂。左及右TALEN靶向序列加粗且間隔序列帶下劃線。指示通常偵測到之破裂及對應數目個定序讀段。虛線表示缺失且鹼基取代顯示為較大字體。

在TALEN 33目標序列內之HBV Pol及HBsAg之開放閱讀框架。

實例3：HepG2.2.15細胞中之HBV TALEN HBsAg減少及基因編輯

【0357】在組成性表現HBV之HepG2.2.15細胞株中測試TALEN mRNA之功效。簡言之，自線性化TALEN質體活體外轉錄TALEN mRNA。使用脂染胺試劑將TALEN mRNA轉染至HepG2.2.15細胞中。在24小時之後，可藉由免疫螢光，使用TALEN蛋白特異性抗體，在經轉染細胞中偵測TALEN表現(圖5A)。在轉染之後6天，將TALEN 28及TALEN 33 mRNA以不同濃度轉染至HepG2.2.15細胞中，且評估細胞培養基中之HBsAg含量。細胞培養基中之HBsAg含量減少為劑量依賴性的(圖5B)。高濃度mRNA之轉染對細胞活力具有負面影響(圖5C)。在mRNA轉染之後6天，藉由次世代定序評估相同樣本中之HBV DNA編輯活性。藉由測定間隔區中之插入及缺失之豐度來定量TALEN 28及TALEN 33基因編輯活性(圖5D)。如圖5D中所示，基因編輯活性為劑量依賴性的且與HBsAg減少相關。

實例4：原代人類肝細胞(PHH)中之HBV TALEN HBsAg減少及基因編輯

【0358】使原代人類肝細胞感染5天，之後用TALEN 28或TALEN 33 mRNA對其進行轉染。在轉染後3天更換培養基之後，收集HBV cccDNA及細胞培養基用於基因編輯及抗病毒分析(對於TALEN 28及TALEN 33，分別為圖6A及圖7A)。在轉染不同量之mRNA之後24小時，藉由免疫螢光偵測TALEN 28表現(圖6C)。與未經轉染細胞中之HBsAg及HBeAg含量相比，在TALEN 28 mRNA轉染後6天偵測到細胞培養基中之HBsAg及HBeAg含量之強力減少(圖6C)。藉由T7E1消化分析在自相同經治療細胞及未經治療細胞提取之HBV cccDNA中分析HBV DNA裂解活性(圖6D)。如圖6D中所示，可在經轉染細胞中偵測到對應於經編輯HBV

DNA之DNA。相比之下，未經轉染細胞中不存在經編輯DNA (圖6D)。為了確認由TALEN 28引入之HBV cccDNA修飾之性質，藉由NGS定序靶向HBV DNA區。所偵測到之大部分修飾對應於所預測FokI裂解位點之缺失(圖6E)，從而確認了TALEN 28修飾HBV cccDNA之功效。

【0359】 對TALEN 33執行相同分析(圖7A)。首先，在mRNA轉染後6小時，藉由免疫螢光染色確認PHH中之TALEN蛋白表現(圖7B)。在轉染後6天(感染HBV基因型D後11天)，評估受感染細胞中之TALEN 33功效。TALEN 33 mRNA轉染在經治療PHH之細胞培養基中減少HBsAg及HBeAg兩者之含量(圖7C)。在自相同PHH樣本提取HBV cccDNA之後，T7核酸內切酶1消化分析確認經TALEN 33 mRNA轉染之細胞中存在經修飾HBV DNA (圖7D)。此外，TALEN 33 mRNA轉染能夠使來自感染A、B、C或D基因型之HBV的PHH細胞之HBV cccDNA破裂，如藉由T7E1消化分析(圖8)以及利用NGS進行之基因編輯定量(表3)所示。此等結果確認TALEN mRNA轉染減少HBV病毒標記物分泌至細胞培養基中及藉由基因編輯修飾不同基因型之HBV DNA的能力。

實例5：在AAV HBV小鼠模型中LNP-TALEN活體內減少HBV標記物

【0360】 為了評估活體內TALEN mRNA治療功效，向AAV-HBV小鼠注射不同濃度之經調配於脂質奈米粒子(LNP)或作為陰性對照之PBS中的TALEN 28及TALEN 33 mRNA。在第0天(D0)單次劑量之後，在注射0.5 mg/kg及1 mg/kg之小鼠中，血清HBsAg含量自給藥後第7天開始顯著下降，且在注射0.25 mg/kg之小鼠中下降至較低程度(圖9A)。維持HBsAg減少直至所評估之最後時間點，亦即在給藥後第71天。在最高劑量(1 mg/kg)之LNP-TALEN 28及33下，HBsAg減少達到2個對數之HBsAg，接

近用於定量之CLIA系統之定量下限值。與HBsAg含量減少並行，在所有測試劑量下，亦即在0.25 mg/kg、0.5 mg/kg及1 mg/kg之劑量下之治療後第7天之前，直至第71天，血清中之HBV DNA含量亦顯著地減少(圖9B)。維持血清中之HBsAg及HBV DNA標記物減少直至給藥後第71天，此與不可逆減少一致。為了驗證經治療AAV-HBV小鼠之TALEN蛋白之HBV DNA修飾活性，自肝組織提取總DNA且藉由NGS定序HBV TALEN目標位點。NGS資料分析顯示，TALEN 28及TALEN 33在HBV DNA目標序列中誘導插入/缺失修飾，且所偵測到之經修飾DNA之量隨LNP-TALEN劑量增加而增加(圖9C)。在不受理論限制之情況下，因為TALEN誘導之HBV DNA修飾不可逆，因此血清HBsAg或HBV DNA含量反彈之可能性降低。

實例6：與核苷抑制劑相比，在單一LNP-TALEN治療後HBV血清標記物活體內減少係不可逆的

【0361】為了比較核苷抑制劑治療劑與LNP-TALEN治療，使用AAV-HBV小鼠模型。選擇血清含量高於4個對數之HBsAg及HBV DNA之小鼠，且用每天投與、持續七天(QD)之核苷抑制劑恩替卡韋(ETV，0.01 mg/kg)、以2 mg/kg單次IV注射形式投與之靶向HBV之LNP-TALEN 33或以2 mg/kg單次IV注射形式投與之非靶向HBV之TALEN TTR加以治療。單次注射LNP-TALEN 33使血漿HBsAg (圖10A)及HBV DNA (圖10B)含量永久地減少超過91天。在非靶向HBV之LNP-TALEN TTR治療之情況下未偵測到對HBV血清標記物之影響(圖10A、10B)。ETV治療在治療期期間僅減少血漿HBV DNA含量但不減少HBsAg含量(圖10A及10B)，且在治療結束(第7天)時，看到病毒反彈(圖10B)。

序列表

SEQ ID NO:	名稱	序列
1	TALE 28左DNA結合目標序列	TGCTGCTATGCCTCATCTTC
2	TALE 28右DNA結合目標序列	CTGGACTATCAAGGTA
3	TALE 33左DNA結合目標序列	TCCTGCTGCTATGCCTCAT
4	TALE 33右DNA結合目標序列	CTTCTGGACTATCAAGGTA
5	TALE 28 DNA結合目標序列	TGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA
6	TALE 33 DNA結合目標序列	TCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTATTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTA
7	TALE 28左DNA結合序列	LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGG
8	TALE 28右DNA結合序列	LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNN

9	TALE 33左DNA結合序列	LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGG
10	TALE 33右DNA結合序列	LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGG
11	FokI核酸酶	QLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINFRS
12	TEV 5'UTR	UCAACACAACAUAUACAAAACAAACGAAUCUCAAGCAAUCAAGCAUUCUACUUCUAUUGCAGCAAUUUAAAUCAUUUCUUUUAAAGCAAAAGCAAUUUUCUGAAAAUUUUCACCAUUUACGAACGAUAG
13	AT1G58420 5'UTR	AUUAUUACAUCAAAACAAAAAGCCGCCA
14	ARC5-2 5'UTR	CUUAAGGGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUACCAUGGUGCCCCAGGCCCUGCUCUUGGUCCCGCUGCUGGUGUUCCCCCUCUGCUUCGGCAAGUUCCCCAUCUACACCAUCCCCGACAAGCUGGGGCCGUGGAGCCCCAUCGACAUCCACCACCUGUCCUGCCCCAACAACCUCGUGGUCGAGGACGAGGGCUGCACCAACCUGAGCGGGUUCUCCCUAC
15	HCV 5'UTR	UGAGUGUCGUACAGCCUCCAGGCCCCCCCCUCCCGGGAGAGCCAUAGUGGUCUGCGGAACCGGUGAGUACACCGGAAUUGCCGGGAAGACUGGGUCCUUUCUUGGAUAAACCCACUCUAUGCCCGGCCAUUUGGGCGUGCCCCCGCAAGACUGCUAGCCGAGUAGUGUUGGGUUGCG

16	人類白蛋白 5'UTR	AAUUAUUGGUUAAAGAAGUAUAUUAGUGCUAAUUUCCCUC CGUUUGUCCUAGCUUUUCUCUUCUGUCAACCCCACACGCC UUUGGCACA
17	EMCV 5'UTR	CUCCCUCCCCCCCCCCUAACGUUACUGGCCGAAGCCGCUUG GAAUAAGGCCGGUGUGCGUUUGUCUAUAUGUUAUUUUCCA CCAUAUUGCCGUCUUUUGGCAAUGUGAGGGCCCGGAAACC UGGCCCUGUCUUCUUGACGAGCAUUCCUAGGGGUCUUUCC CCUCUCGCCAAAGGAAUGCAAGGUCUGUUGAAUGUCGUGA AGGAAGCAGUUCCUCUGGAAGCUUCUUGAAGACAAACAAC GUCUGUAGCGACCCUUUGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCU GGCGACAGGUGCCUCUGCGGCCAAAAGCCACGUGUAUAAG AUACACCUGCAAAGGCGGCACAACCCCAGUGCCACGUUGU GAGUUGGAUAGUUGUGGAAAGAGUCAAAUGGCUCUCCUCA AGCGUAUUCAACAAGGGGCUGAAGGAUGCCCAGAAGGUAC CCCAUUGUAUGGGAUCUGAUCUGGGGCCUCGGUGCACAUG CUUUACGUGUGUUUAGUCGAGGUUAAAAAACGUCUAGGCC CCCCGAACCACGGGGACGUGGUUUUCCUUUGAAAAACACG AUGAUAAU
18	XBG 3'UTR	CUAGUGACUGACUAGGAUCUGGUUACCACUAAACCAGCCU CAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCA ACUUACACUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAU UCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAU
19	人類結合球蛋白3'UTR	UGCAAGGCUGGCCGGAAGCCCUUGCCUGAAAGCAAGAUUU CAGCCUGGAAGAGGGCAAAGUGGACGGGAGUGGACAGGAG UGGAUGCGAUAAGAUGUGGUUUGAAGCUGAUGGGUGCCA GCCCUGCAUUGCUGAGUCAAUCAAUAAAGAGCUUUCUUUU GACCCAU
20	人類脂蛋白元E 3'UTR	ACGCCGAAGCCUGCAGCCAUGCGACCCCACGCCACCCCGUG CCUCCUGCCUCCGCGCAGCCUGCAGCGGGAGACCCUGUCCC CGCCCCAGCCGUCCUCCUGGGGUGGACCCUAGUUUAAUAA AGAUUCACCAAGUUUCACGCA
21	HCV 3'UTR	UAGAGCGGCAAACCCUAGCUACACUCCAUAGCUAGUUUCU UUUUUUUUUGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU UUUUUUUUUUCCUUUCUUUUCCUUCUUUUUUUCCUCUUUU CUUGGUGGCUCCAUCUUAGCCCUAGUCACGGCUAGCUGUG AAAGGUCCGUGAGCCGCAUGACUGCAGAGAGUGCCGUAAC UGGUCUCUCUGCAGAUCAUGU
22	小鼠白蛋白 3'UTR	ACACAUCACAACCACAACCUUCUCAGGCUACCCUGAGAAA AAAAGACAUGAAGACUCAGGACUCAUCUUUUCUGUUGGUG UAAAAUCAACACCCUAAGGAACACAAAUUUCUUUAAACAU UUGACUUCUUGUCUCUGUGCUGCAAUUAAUAAAAAAUGGA AAGAAUCUAC
23	人類α球蛋白 3'UTR	GCUGGAGCCUCGGUAGCCGUUCCUCCUGCCCGCUGGGCCU CCCAACGGGCCCUCCUCCCCUCCUUGCACCGGCCCUUCCUG GUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCAGCA
24	EMCV 3'UTR	UAGUGCAGUCACUGGCACAACGCGUUGCCCGGUAAGCCAA UCGGGUAUACACGGUCGUCAUACUGCAGACAGGGUUCUUC UACUUUGCAAGAUAGUCUAGAGUAGUAAAAUAAAUAGUA UAAG

25	TALEN 28左蛋白	MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGGSGPKKKRKVGIHGVPA AVDLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIV ALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGAR ALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAW RNALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAH GLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA IASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLL PVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL TPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIAS NGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQAL ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPV LCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP EQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASH DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLC QAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQ VVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGRPALESIV AQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLPHAPA LIKRTNRRIPERTSHRVAGSQLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHE YIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPD GAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQ TRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLN HITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINFR S
26	TALEN 28右蛋白	MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGGSGPKKKRKVGIHGVPA AVDLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIV ALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGAR ALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAW RNALTGAPLNLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAH GLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA IASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLL PVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL TPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIAS NGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVL CQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPE QVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHD GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETV QRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGRPALESIVAQLSRPDPA LAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRRIP ERTSHRVAGSQLVKSELEEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNS TQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPID YGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNE WWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAV LSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINFRS

27	TALEN 33左蛋白	MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGGSGPKKKRKVGIHGVPA AVDLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIV ALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGAR ALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAW RNALTGAPLNLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAH GLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA IASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLL PVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL TPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA SHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQA LETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV LCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP EQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASH DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVL CQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPE QVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNG GGRPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAV KKGLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAGSQLVKSELEEKKSELR HKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGK HLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADE MQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKG NYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRR KFNNGEINFRS
28	TALEN 33右蛋白	MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGGSGPKKKRKVGIHGVPA AVDLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIV ALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGAR ALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAW RNALTGAPLNLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAH GLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA IASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLL PVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL TPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIAS NGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVL CQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPE QVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHD GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETV QRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQ AHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQV VAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGG RPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKK GLPHAPALIKRTNRRIPERTSHRVAGSQLVKSELEEKKSELRHK LKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHL GGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQ RYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNY KAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKF NNGEINFRS
29	正向引子	CCTAGGACCCCTTCTCGTGT

30	反向引子	ACTGAGCCAGGAGAAACGGG
31	SV40大T抗原NLS	PKKKRKV
32	核質蛋白NLS	KRPAATKKAGQAKKKK
33	EGL-13 NLS	MSRRRKANPTKLSENAKKLAKEVEN
34	*c-Myc*原致癌蛋白NLS	PAAKRVKLD
35	TUS蛋白NLS	KLKIKRPVK
36	FLAG標籤	DYKDDDDK
37	FLAG標籤	EYKEEEEK
38	六×組胺酸	HHHHHH
39	myc標籤	EQKLISEEDL
40	流行性感冒HA標籤	YPYDVPDYA
41	AcV5標籤	SWKDASGWS
42	ALFA-標籤	SRLEEELRRRLTE
43	Avi標籤	GLNDIFEAQKIEWHE
44	E-標籤	GAPVPYPDPLEPR
45	S-標籤	KETAAAKFERQHMDS
46	Strep-標籤	WSHPQFEK
47	T7標籤	MASMTGGQQMG
48	Ty1標籤	EVHTNQDPLD
49	V5標籤	GKPIPNPLLGLDST
50	VSV-G標籤	YTDIEMNRLGK
51	Xpress標籤	DLYDDDDK
52	TALE 28具有N端之左DNA結合序列	VDLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGG

53	TALE 28具有N端之右DNA結合序列	VDLRTLGYSQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGG
54	TALE 33具有N端之左DNA結合序列	VDLRTLGYSQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGG
55	TALE 33具有N端之右DNA結合序列	VDLRTLGYSQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGG

【0362】 在不背離本發明之範疇及精神之情況下，熟習此項技術者容易地顯而易知，可對本文所揭示之發明作出不同取代及修改。

【0363】 本說明書中提及之所有專利及公開案指示熟習本發明所關於之技術者之位準。

【0364】 本文說明性地描述之本發明可在不存在本文未特定揭示之任何一或多個元件、一或多個限制之情況下適當地實踐。因此，舉例而言，在本文中之各種情況下，術語“包含”、“基本上由……組成”及“由……組成”中之任一者可由另外兩個術語中之任一者置換。已採用之術語及表述用作描述而非限制之術語，且在使用該等術語及表述中不意欲排除所顯示及描述之特點或其部分之任何等效方案，但應認識到在本發明所主張之範疇內，各種修改係可能的。另外，在本發明之特點或態樣以馬庫西組(Markush group)之方式加以描述之情況下，熟習此項技術者應認識到，本發明亦由此以馬庫西組之任何個別成員或成員子組方式加以描述。舉例而言，若X描述為選自由溴、氯及碘組成之群，則全面描述對於X為溴之主張以及對於X為溴及氯之主張。其他實施例係在以下申請專利範圍內。

【序列表】

<110> 美商詹森藥物公司(Janssen Pharmaceuticals, Inc.)
美商亞克圖羅斯醫療公司(Arcturus Therapeutics, Inc.)

<120> 靶向HBV之類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)

<130> 065814.11515/45WO1

<140> TW 110149158
<141> 2021-12-28

<150> 63/131,145
<151> 2020-12-28

<160> 55

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TALE 28左DNA結合目標

<400> 1
tgctgctatg cctcatcttc 20

<210> 2
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TALE 28右DNA結合目標

<400> 2
ctggactatc aaggta 16

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> TALE 33左DNA結合目標

<400> 3
tcctgctgct atgcctcat 19

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TALE 33右DNA結合目標

<400> 4
cttctggact atcaaggta 19

<210> 5
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TALE 28 DNA結合目標

<400> 5
tgctgctatg cctcatcttc ttgttggttc ttctggacta tcaaggta 48

<210> 6
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TALE 33 DNA結合目標

<400> 6
tcctgctgct atgcctcatc ttcttattgg ttcttctgga ctatcaaggt a 51

<210> 7
<211> 627
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TALE 28左DNA結合序列

<400> 7

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
340 345 350

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
515 520 525

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
530 535 540

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
545 550 555 560

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
565 570 575

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
580 585 590

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
595 600 605

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
610 615 620

Asp Gly Gly
625

<210> 8
<211> 491
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TALE 28右DNA結合序列

<400> 8

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly
485 490

<210> 9
<211> 593
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TALE 33左DNA結合序列

<400> 9

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
515 520 525

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
530 535 540

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
545 550 555 560

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
565 570 575

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
580 585 590

Gly

<210> 10
<211> 593
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TALE 33右DNA結合序列

<400> 10

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
515 520 525

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
530 535 540

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
545 550 555 560

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
565 570 575

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
580 585 590

Gly

<210> 11
<211> 198
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FokI核酸酶

<400> 11

Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His
1 5 10 15

Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala
20 25 30

Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe
35 40 45

Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg
50 55 60

Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly
65 70 75 80

Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile
85 90 95

Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg
100 105 110

Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser
115 120 125

Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn
130 135 140

Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly
145 150 155 160

Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys
165 170 175

Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly
180 185 190

Glu Ile Asn Phe Arg Ser
195

<210> 12
<211> 129
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TEV 5'UTR

<400> 12
ucaacacaac auauacaaaa caaacgaauc ucaagcaauc aagcauucua cuucuauugc 60

agcaauuuaa aucauuucuu uuaaagcaaa agcaauuuuc ugaaaauuuu caccauuuac 120

gaacgauag 129

<210> 13
<211> 28

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> AT1G58420 5'UTR

<400> 13
auuauuacau caaaacaaaa agccgcca 28

<210> 14
<211> 245
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ARC5-2 5'UTR

<400> 14
cuuaaggggg cgcugccuac ggagguggca gccaucuccu ucucggcauc aagcuuacca 60

uggugcccca ggcccugcuc uuggucccgc ugcugguguu cccccucugc uucggcaagu 120

uccccaucua caccaucccc gacaagcugg ggccguggag ccccaucgac auccaccacc 180

uguccugccc caacaaccuc guggucgagg acgagggcug caccaaccug agcggguucu 240

ccuac 245

<210> 15
<211> 177
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV 5'UTR

<400> 15
ugagugucgu acagccucca ggccccccccc ucccgggaga gccauagugg ucugcggaac 60

cggugaguac accggaauug ccgggaagac ugggguccuuu cuuggauaaa cccacucuau 120

gcccggccau uuggggcgugc ccccgcaaga cugcuagccg aguaguguug gguugcg 177

<210> 16
<211> 89
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類白蛋白5'UTR

<400> 16
aauuauuggu uaaagaagua uauuagugcu aauuucccuc cguuuguccu agcuuuucuc 60

uucugucaac cccacacgcc uuuggcaca 89

<210> 17
<211> 569
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EMCV 5'UTR

<400> 17
cucccucccc ccccccuaac guuacuggcc gaagccgcuu ggaauaaggc cggugugcgu 60

uugucuauau guuauuuucc accauauugc cgucuuuugg caaugugagg gcccggaaac 120

cuggcccugu cuucuugacg agcauuccua ggggucuuuc cccucucgcc aaaggaaugc 180

aaggucuguu gaaugucgug aaggaagcag uuccucugga agcuucuuga agacaaacaa 240

cgucuguagc gacccuuugc aggcagcgga acccccccacc uggcgacagg ugccucugcg 300

gccaaaagcc acguguauaa gauacaccug caaaggcggc acaaccccag ugccacguug 360

ugaguuggau aguuguggaa agagucaaau ggcucuccuc aagcguauuc aacaaggggc 420

ugaaggaugc ccagaaggua ccccauugua ugggaucuga ucuggggccu cggugcacau 480

gcuuuacgug uguuuagucg agguuaaaaa acgucuaggc cccccgaacc acggggacgu 540

gguuuuccuu ugaaaaacac gaugauaau 569

<210> 18
<211> 158
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> XBG 3'UTR

<400> 18
cuagugacug acuaggaucu gguuaccacu aaaccagccu caagaacacc cgaauggagu 60

cucuaagcua cauaauacca acuuacacuu acaaaauguu gucccccaaa auguagccau 120

ucguaucugc uccuaauaaa aagaaaguuu cuucacau 158

<210> 19
<211> 166
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類結合球蛋白3'UTR

<400> 19
ugcaaggcug gccggaagcc cuugccugaa agcaagauuu cagccuggaa gagggcaaag 60

uggacgggag uggacaggag uggaugcgau aagauguggu uugaagcuga uggguccag 120

cccugcauug cugagucaau caauaaagag cuuucuuuug acccau 166

<210> 20
<211> 143
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類脂蛋白元E 3'UTR

<400> 20
acgccgaagc cugcagccau gcgaccccac gccaccccgu gccuccugcc uccgcgcagc 60

cugcagcggg agacccuguc cccgccccag ccguccuccu gggguggacc cuaguuuaau 120

aaagauucac caaguuucac gca 143

<210> 21
<211> 220
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCV 3'UTR

<400> 21
uagagcggca aacccuagcu acacuccaua gcuaguuucu uuuuuuuuug uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuc cuuucuuuuc cuucuuuuuu uccucuuuuc 120

uugguggcuc caucuuagcc cuagucacgg cuagcuguga aaggcuccgug agccgcauga 180

cugcagagag ugccguaacu ggucucucug cagaucaugu 220

<210> 22
<211> 170
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠白蛋白3'UTR

<400> 22
acacaucaca accacaaccu ucucaggcua cccugagaaa aaaagacaug aagacucagg 60

acucaucuuu ucuguuggug uaaaaucaac acccuaagga acacaaauuu cuuuaaacau 120

uugacuucuu gucucugugc ugcaauuaau aaaaaaugga aagaaucuac 170

<210> 23
<211> 110
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類α球蛋白3'UTR

<400> 23
gcuggagccu cgguagccgu uccuccugcc cgcuggggccu cccaacgggc ccuccucccc 60

uccuugcacc ggcccuuccu ggucuuugaa uaaagucuga gugggcagca 110

<210> 24
<211> 123
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EMCV 3'UTR

<400> 24
uagugcaguc acuggcacaa cgcguugccc gguaagccaa ucggguauac acggucguca 60

uacugcagac aggguucuuc uacuuugcaa gauagucuag aguaguaaaa uaaauaguau 120

aag 123

<210> 25
<211> 1073
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TALEN 28左蛋白

<400> 25

Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Ser Gly Pro Lys Lys Lys Arg
20 25 30

Lys Val Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Val Asp Leu Arg Thr Leu
35 40 45

Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Gln Glu Lys Ile Lys Pro Lys Val Arg Ser
50 55 60

Thr Val Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His Gly Phe Thr His
65 70 75 80

Ala His Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro Ala Ala Leu Gly Thr Val
85 90 95

Ala Val Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala Leu Pro Glu Ala Thr His
100 105 110

Glu Ala Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly Ala Arg Ala Leu
115 120 125

Glu Ala Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu Arg Gly Pro Pro Leu Gln
130 135 140

Leu Asp Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala Lys Arg Gly Gly Val Thr
145 150 155 160

Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu Thr Gly Ala Pro
165 170 175

Leu Asn Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
180 185 190

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
195 200 205

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
210 215 220

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
225 230 235 240

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
245 250 255

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
260 265 270

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
275 280 285

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
290 295 300

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
305 310 315 320

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
325 330 335

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
340 345 350

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
355 360 365

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
370 375 380

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
385 390 395 400

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
405 410 415

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
420 425 430

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
435 440 445

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
450 455 460

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
465 470 475 480

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
485 490 495

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
500 505 510

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
515 520 525

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
530 535 540

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
545 550 555 560

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
565 570 575

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
580 585 590

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
595 600 605

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
610 615 620

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
625 630 635 640

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
645 650 655

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala
660 665 670

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
675 680 685

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
690 695 700

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
705 710 715 720

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
725 730 735

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
740 745 750

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
755 760 765

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
770 775 780

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
785 790 795 800

Ser His Asp Gly Gly Arg Pro Ala Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu
805 810 815

Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val
820 825 830

Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys
835 840 845

Gly Leu Pro His Ala Pro Ala Leu Ile Lys Arg Thr Asn Arg Arg Ile
850 855 860

Pro Glu Arg Thr Ser His Arg Val Ala Gly Ser Gln Leu Val Lys Ser
865 870 875 880

Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val
885 890 895

Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln
900 905 910

Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr
915 920 925

Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala
930 935 940

Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr
945 950 955 960

Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu
965 970 975

Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn
980 985 990

Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys
995 1000 1005

Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln
1010 1015 1020

Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu
1025 1030 1035

Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly
1040 1045 1050

Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu
1055 1060 1065

Ile Asn Phe Arg Ser
1070

<210> 26
<211> 937
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TALEN 28右蛋白

<400> 26

Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Ser Gly Pro Lys Lys Lys Arg
20 25 30

Lys Val Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Val Asp Leu Arg Thr Leu
35 40 45

Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Gln Glu Lys Ile Lys Pro Lys Val Arg Ser
50 55 60

Thr Val Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His Gly Phe Thr His
65 70 75 80

Ala His Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro Ala Ala Leu Gly Thr Val
85 90 95

Ala Val Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala Leu Pro Glu Ala Thr His
100 105 110

Glu Ala Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly Ala Arg Ala Leu
115 120 125

Glu Ala Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu Arg Gly Pro Pro Leu Gln
130 135 140

Leu Asp Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala Lys Arg Gly Gly Val Thr
145 150 155 160

Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu Thr Gly Ala Pro
165 170 175

Leu Asn Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
180 185 190

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
195 200 205

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
210 215 220

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
225 230 235 240

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
245 250 255

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
260 265 270

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
275 280 285

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
290 295 300

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
305 310 315 320

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
325 330 335

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
340 345 350

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
355 360 365

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
370 375 380

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
385 390 395 400

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
405 410 415

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
420 425 430

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
435 440 445

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
450 455 460

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
465 470 475 480

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
485 490 495

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
500 505 510

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
515 520 525

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
530 535 540

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
545 550 555 560

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
565 570 575

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
580 585 590

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
595 600 605

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
610 615 620

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
625 630 635 640

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
645 650 655

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Arg Pro Ala
660 665 670

Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala
675 680 685

Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg
690 695 700

Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Pro His Ala Pro Ala Leu
705 710 715 720

Ile Lys Arg Thr Asn Arg Arg Ile Pro Glu Arg Thr Ser His Arg Val
725 730 735

Ala Gly Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu
740 745 750

Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile
755 760 765

Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val
770 775 780

Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly
785 790 795 800

Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile
805 810 815

Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn
820 825 830

Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn
835 840 845

Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr
850 855 860

Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe
865 870 875 880

Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn
885 890 895

Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu
900 905 910

Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe
915 920 925

Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Arg Ser
930 935

<210> 27
<211> 1039
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TALEN 33左蛋白

<400> 27

Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Ser Gly Pro Lys Lys Lys Arg
20 25 30

Lys Val Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Val Asp Leu Arg Thr Leu
35 40 45

Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Gln Glu Lys Ile Lys Pro Lys Val Arg Ser
50 55 60

Thr Val Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His Gly Phe Thr His
65 70 75 80

Ala His Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro Ala Ala Leu Gly Thr Val
85 90 95

Ala Val Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala Leu Pro Glu Ala Thr His
100 105 110

Glu Ala Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly Ala Arg Ala Leu
115 120 125

Glu Ala Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu Arg Gly Pro Pro Leu Gln
130 135 140

Leu Asp Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala Lys Arg Gly Gly Val Thr
145 150 155 160

Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu Thr Gly Ala Pro
165 170 175

Leu Asn Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
180 185 190

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
195 200 205

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
210 215 220

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
225 230 235 240

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
245 250 255

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
260 265 270

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
275 280 285

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
290 295 300

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
305 310 315 320

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
325 330 335

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
340 345 350

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
355 360 365

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
370 375 380

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
385 390 395 400

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
405 410 415

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
420 425 430

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
435 440 445

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
450 455 460

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
465 470 475 480

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
485 490 495

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
500 505 510

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
515 520 525

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
530 535 540

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
545 550 555 560

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
565 570 575

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
580 585 590

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
595 600 605

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
610 615 620

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
625 630 635 640

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
645 650 655

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala
660 665 670

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
675 680 685

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
690 695 700

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
705 710 715 720

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
725 730 735

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
740 745 750

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
755 760 765

Gly Gly Gly Arg Pro Ala Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg
770 775 780

Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu
785 790 795 800

Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu
805 810 815

Pro His Ala Pro Ala Leu Ile Lys Arg Thr Asn Arg Arg Ile Pro Glu
820 825 830

Arg Thr Ser His Arg Val Ala Gly Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu
835 840 845

Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His
850 855 860

Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg
865 870 875 880

Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr
885 890 895

Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr
900 905 910

Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala
915 920 925

Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln
930 935 940

Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn
945 950 955 960

Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu
965 970 975

Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg
980 985 990

Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu
995 1000 1005

Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu
1010 1015 1020

Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Arg
1025 1030 1035

Ser

<210> 28
<211> 1039
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TALEN 33右蛋白

<400> 28

```
Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
1               5                  10                  15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Ser Gly Pro Lys Lys Lys Arg
            20                  25                  30

Lys Val Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Val Asp Leu Arg Thr Leu
        35                  40                  45

Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Gln Glu Lys Ile Lys Pro Lys Val Arg Ser
    50                  55                  60

Thr Val Ala Gln His His Glu Ala Leu Val Gly His Gly Phe Thr His
65                  70                  75                  80

Ala His Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro Ala Ala Leu Gly Thr Val
                85                  90                  95

Ala Val Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala Leu Pro Glu Ala Thr His
            100                 105                 110

Glu Ala Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly Ala Arg Ala Leu
        115                 120                 125

Glu Ala Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu Arg Gly Pro Pro Leu Gln
    130                 135                 140
```

Leu Asp Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala Lys Arg Gly Gly Val Thr
145 150 155 160

Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu Thr Gly Ala Pro
165 170 175

Leu Asn Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
180 185 190

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
195 200 205

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
210 215 220

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
225 230 235 240

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
245 250 255

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
260 265 270

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
275 280 285

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
290 295 300

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
305 310 315 320

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
325 330 335

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
340 345 350

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
355 360 365

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
370 375 380

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
385 390 395 400

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
405 410 415

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
420 425 430

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
435 440 445

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
450 455 460

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
465 470 475 480

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
485 490 495

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
500 505 510

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
515 520 525

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
530 535 540

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
545 550 555 560

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
565 570 575

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
580 585 590

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
595 600 605

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
610 615 620

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
625 630 635 640

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
645 650 655

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
660 665 670

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
675 680 685

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
690 695 700

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
705 710 715 720

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
725 730 735

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
740 745 750

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
755 760 765

Asn Gly Gly Arg Pro Ala Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg
770 775 780

Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu
785 790 795 800

Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu
805 810 815

Pro His Ala Pro Ala Leu Ile Lys Arg Thr Asn Arg Arg Ile Pro Glu
820 825 830

Arg Thr Ser His Arg Val Ala Gly Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu
835 840 845

Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His
850 855 860

Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg
865 870 875 880

Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr
885 890 895

Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr
900 905 910

Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala
915 920 925

Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln
930 935 940

Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn
945 950 955 960

Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu
965 970 975

Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg
980 985 990

Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu
995 1000 1005

Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu
1010 1015 1020

Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Arg
1025 1030 1035

Ser

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正向引子

<400> 29
cctaggaccc cttctcgtgt 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引子

<400> 30
actgagccag gagaaacggg 20

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SV40大T抗原NLS

<400> 31

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 核質蛋白NLS

<400> 32

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

<210> 33
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGL-13 NLS

<400> 33

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

Lys Lys Leu Ala Lys Glu Val Glu Asn
20 25

<210> 34
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> c-Myc原致癌蛋白NLS

<400> 34

Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TUS蛋白NLS

<400> 35

Lys Leu Lys Ile Lys Arg Pro Val Lys
1 5

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FLAG標籤

<400> 36

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FLAG標籤

<400> 37

Glu Tyr Lys Glu Glu Glu Glu Lys
1 5

<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 六x組胺酸

<400> 38

His His His His His His
1 5

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> myc標籤

<400> 39

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 流行性感冒HA標籤

<400> 40

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AcV5標籤

<400> 41

Ser Trp Lys Asp Ala Ser Gly Trp Ser
1 5

<210> 42
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ALFA-標籤

<400> 42

Ser Arg Leu Glu Glu Glu Leu Arg Arg Arg Leu Thr Glu
1 5 10

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Avi標籤

<400> 43

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

<210> 44
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E-標籤

<400> 44

Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg
1 5 10

<210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> S-標籤

<400> 45

Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser
1 5 10 15

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Strep-標籤

<400> 46

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5

<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> T7標籤

<400> 47

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
1 5 10

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> Ty1標籤

<400> 48

Glu Val His Thr Asn Gln Asp Pro Leu Asp
1 5 10

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> V5標籤

<400> 49

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
1 5 10

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VSV-G標籤

<400> 50

Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
1 5 10

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Xpress標籤

<400> 51

Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 52
<211> 763
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TALE 28具有N端之左DNA結合序列

<400> 52

```
Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Gln Glu Lys Ile
1               5                  10                  15

Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gln His His Glu Ala Leu Val
            20                  25                  30

Gly His Gly Phe Thr His Ala His Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro
        35                  40                  45

Ala Ala Leu Gly Thr Val Ala Val Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala
    50                  55                  60

Leu Pro Glu Ala Thr His Glu Ala Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp
65                  70                  75                  80

Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu
                85                  90                  95

Arg Gly Pro Pro Leu Gln Leu Asp Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala
            100                 105                 110

Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn
        115                 120                 125

Ala Leu Thr Gly Ala Pro Leu Asn Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
    130                 135                 140

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145                 150                 155                 160
```

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala
515 520 525

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
530 535 540

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
545 550 555 560

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
565 570 575

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
580 585 590

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
595 600 605

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
610 615 620

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
625 630 635 640

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
645 650 655

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
660 665 670

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
675 680 685

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
690 695 700

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
705 710 715 720

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
725 730 735

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
740 745 750

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly
755 760

<210> 53
<211> 627
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TALE 28具有N端之右DNA結合序列

<400> 53

Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Gln Glu Lys Ile
1 5 10 15

Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gln His His Glu Ala Leu Val
20 25 30

Gly His Gly Phe Thr His Ala His Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro
35 40 45

Ala Ala Leu Gly Thr Val Ala Val Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala
50 55 60

Leu Pro Glu Ala Thr His Glu Ala Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp
65 70 75 80

Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu
85 90 95

Arg Gly Pro Pro Leu Gln Leu Asp Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala
100 105 110

Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn
115 120 125

Ala Leu Thr Gly Ala Pro Leu Asn Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
515 520 525

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
530 535 540

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
545 550 555 560

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
565 570 575

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
580 585 590

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
595 600 605

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
610 615 620

Asn Gly Gly
625

<210> 54
<211> 729
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TALE 33具有N端之左DNA結合序列

<400> 54

Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Gln Glu Lys Ile
1 5 10 15

Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gln His His Glu Ala Leu Val
20 25 30

Gly His Gly Phe Thr His Ala His Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro
35 40 45

Ala Ala Leu Gly Thr Val Ala Val Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala
50 55 60

Leu Pro Glu Ala Thr His Glu Ala Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp
65 70 75 80

Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu
85 90 95

Arg Gly Pro Pro Leu Gln Leu Asp Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala
100 105 110

Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn
115 120 125

Ala Leu Thr Gly Ala Pro Leu Asn Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
515 520 525

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
530 535 540

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
545 550 555 560

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
565 570 575

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
580 585 590

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
595 600 605

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
610 615 620

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
625 630 635 640

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
645 650 655

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
660 665 670

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
675 680 685

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
690 695 700

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
705 710 715 720

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly
725

<210> 55
<211> 729
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TALE 33具有N端之右DNA結合序列

<400> 55

Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Gln Glu Lys Ile
1 5 10 15

Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gln His His Glu Ala Leu Val
20 25 30

Gly His Gly Phe Thr His Ala His Ile Val Ala Leu Ser Gln His Pro
35 40 45

Ala Ala Leu Gly Thr Val Ala Val Lys Tyr Gln Asp Met Ile Ala Ala
50 55 60

Leu Pro Glu Ala Thr His Glu Ala Ile Val Gly Val Gly Lys Gln Trp
65 70 75 80

Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu
85 90 95

Arg Gly Pro Pro Leu Gln Leu Asp Thr Gly Gln Leu Leu Lys Ile Ala
100 105 110

Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn
115 120 125

Ala Leu Thr Gly Ala Pro Leu Asn Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
515 520 525

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
530 535 540

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
545 550 555 560

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
565 570 575

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
580 585 590

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
595 600 605

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
610 615 620

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
625 630 635 640

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
645 650 655

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
660 665 670

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
675 680 685

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
690 695 700

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
705 710 715 720

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly
725

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種治療有需要之個體之肝炎感染之方法，該方法包含向該個體投與包含以下之mRNA分子之組合：

(1)　第一mRNA分子，其包含編碼第一類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第一TALEN單體包含第一TALE DNA結合域及第一核酸酶催化域，其中該第一TALE DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之第一半位點序列；及

(2)　第二mRNA分子，其包含編碼第二TALEN單體之聚核苷酸序列，該第二TALEN單體包含第二TALE DNA結合域及第二核酸酶催化域，其中該第二TALE DNA結合域能夠結合至該目標核酸序列之第二半位點序列；

其中當該第一TALE DNA結合域結合至該第一半位點序列且該第二TALE DNA結合域結合至該第二半位點序列時，該第一TALEN單體及該第二TALEN單體能夠形成裂解該目標核酸序列之二聚體，

較佳地，該第一核酸酶催化域為第一FokI核酸酶催化域且該第二核酸酶催化域為第二FokI核酸酶催化域。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中該目標核酸序列係在編碼HBsAg及HBV聚合酶(pol)之序列內，較佳地，

(a)　該目標核酸序列之該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 1之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且該目標核

酸序列之該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 2之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列；或

(b) 該目標核酸序列之該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 3之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且該目標核酸序列之該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 4之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，或

(c) 該目標核酸序列包含與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之核酸序列至少90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列。

【請求項3】

如請求項1或2之方法，其中該第一mRNA分子及該第二mRNA分子各自進一步包含5'端帽、5'-UTR、編碼核定位信號之序列、編碼N端域之序列、編碼C端域之序列、3'-UTR及多腺苷尾中之一或多者，較佳地全部。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之方法，其中各別地，該第一TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 9至少90%一致之胺基酸序列，該第二TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 10至少90%一致之胺基酸序列，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自包含與SEQ ID NO: 11至少90%一致之胺基酸序列。

【請求項5】

如請求項1至4中任一項之方法，其中該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及J中之一或多者。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之方法，其進一步包含向該個體投與第二治療性組合物，其較佳地包含抗HBV劑。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之方法，其中該個體患有HBV感染，較佳地慢性HBV感染。

【請求項8】

如請求項1至7中任一項之方法，其中該個體雙重感染HBV及HDV。

【請求項9】

一種組合物，其包含經囊封於脂質奈米粒子中之包含以下之mRNA分子之組合：

(1) 第一mRNA分子，其包含編碼第一類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第一TALEN單體包含第一TALE DNA結合域及第一核酸酶催化域，其中該第一TALE DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之第一半位點序列；及

(2) 第二mRNA分子，其包含編碼第二TALEN單體之聚核苷酸序列，該第二TALEN單體包含第二TALE DNA結合域及第二核酸酶催化域，其中該第二TALE DNA結合域能夠結合至該目標核酸序列之第二半位點序列；

其中當該第一TALE DNA結合域結合至該第一半位點序列且該第二

TALE DNA結合域結合至該第二半位點序列時，該第一TALEN單體及該第二TALEN單體能夠形成裂解該目標核酸序列之二聚體，

較佳地，該第一核酸酶催化域為第一FokI核酸酶催化域且該第二核酸酶催化域為第二FokI核酸酶催化域。

【請求項10】

如請求項9之組合物，其中該目標核酸序列係在編碼HBsAg及HBV聚合酶(pol)之序列內，較佳地，

(a) 該目標核酸序列之該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 1之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且該目標核酸序列之該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 2之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列；或

(b) 該目標核酸序列之該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 3之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，且該目標核酸序列之該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 4之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列，或

(c) 該目標核酸序列包含與SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之核酸序列至少90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列。

【請求項11】

如請求項9或請求項10之組合物，其中該第一mRNA分子及該第二mRNA分子各自進一步包含5'端帽、5'-UTR、編碼核定位信號之序列、編碼N端域之序列、編碼C端域之序列、3'-UTR及多腺苷尾中之一或多者，較佳地全部。

【請求項12】

如請求項9至11中任一項之組合物，其中各別地，該第一TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 9至少90%一致之胺基酸序列，該第二TALE DNA結合域包含與SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 10至少90%一致之胺基酸序列，且該第一FokI核酸酶催化域及該第二FokI核酸酶催化域各自包含與SEQ ID NO: 11至少90%一致之胺基酸序列。

【請求項13】

如請求項9至12中任一項之組合物，其中該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及J中之一或多者。

【請求項14】

如請求項9至13中任一項之組合物，其中囊封該mRNA分子組合之該等脂質奈米粒子包含陽離子脂質及至少一種選自由陰離子脂質、兩性離子脂質、中性脂質、類固醇、聚合物結合型脂質、磷脂、醣脂及其組合組成之群之其他脂質。

【請求項15】

一種組合，該組合具有：

(1)　第一核酸，較佳地第一mRNA分子，其包含編碼第一類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第一TALEN單體包含第一TALE DNA結合域及第一FokI核酸酶催化域，其中該第一TALE

DNA結合域能夠結合至HBV基因體內之目標核酸序列之第一半位點序列，且該第一半位點序列包含與SEQ ID NO: 1之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列；及

(2) 第二核酸，較佳地第二mRNA分子，其包含編碼第二類轉錄活化子效應物核酸酶(TALEN)單體之聚核苷酸序列，該第二TALEN單體包含第二TALE DNA結合域及第二FokI核酸酶催化域，其中該第二TALE DNA結合域能夠結合至該目標核酸序列之第二半位點序列，且該第二半位點序列包含與SEQ ID NO: 2之核酸序列至少約90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之聚核苷酸序列；

其中當該第一TALE DNA結合域結合至該第一半位點序列且該第二TALE DNA結合域結合至該第二半位點序列時，該第一TALEN單體及該第二TALEN單體能夠形成裂解該目標核酸序列之二聚體。

【請求項16】

如請求項15之組合，其中該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及J中之一或多者。

【請求項17】

一種組合物，其包含如請求項15或16之組合，其中該第一核酸及該第二核酸分開或共同經囊封於脂質奈米粒子中。

【請求項18】

一種核酸分子，其編碼如請求項15之第一mRNA分子及第二mRNA分子中之至少一者。

【請求項19】

一種經分離宿主細胞，其包含如請求項18之核酸分子。

【請求項20】

如請求項19之經分離宿主細胞，其中該宿主細胞為肝細胞。

【請求項21】

一種醫藥組合物，其包含如請求項9至14或17中任一項之組合物、如請求項15或16之組合、如請求項18之核酸分子或如請求項19或20之經分離宿主細胞，及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項22】

一種裂解HBV基因體中之目標核酸序列之方法，其包含使該HBV基因體與如請求項9至14或17中任一項之組合物、如請求項15或16之組合、如請求項18之核酸分子、如請求項19或20之經分離宿主細胞或如請求項21之醫藥組合物接觸。

【請求項23】

一種誘導HBV基因體中之目標核酸序列之基因編輯的方法，其包含使該HBV基因體與如請求項9至14或17中任一項之組合物、如請求項15或16之組合、如請求項18之核酸分子、如請求項19或20之經分離宿主細胞或如請求項21之醫藥組合物接觸。

【請求項24】

如請求項22或23之方法，其中該HBV基因體係基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I及J中之一或多者。

【請求項25】

一種治療有需要之個體之肝炎感染之方法，其包含向該個體投與如

請求項21之醫藥組合物。

【請求項26】

一種減輕個體之HBV感染及/或減少個體之HBV複製的方法，其包含向該個體投與如請求項21之醫藥組合物。

【請求項27】

如請求項25或26之方法，其進一步包含向該個體投與第二治療性組合物，其較佳地包含抗HBV劑。

【請求項28】

如請求項25至27中任一項之方法，其中該個體患有HBV感染，較佳地慢性HBV感染。

【請求項29】

如請求項25至28中任一項之方法，其中該個體雙重感染HBV及HDV。

【請求項30】

如請求項25至29中任一項之方法，其中該個體之HBsAg、HBeAg、HBV DNA、HBV cccDNA或整合HBV DNA中之一或多者之表現量降低。

【請求項31】

如請求項30之方法，其中該表現量為肝細胞含量、核或細胞含量、肝含量、血清含量或血漿含量。

【請求項32】

一種產生TALEN之方法，其包含活體外或活體內轉錄如請求項18之核酸分子。

【請求項33】

如請求項21之醫藥組合物，其用於治療有需要之個體之B型肝炎病毒(HBV)誘發之疾病，較佳地其中該個體患有慢性HBV感染。

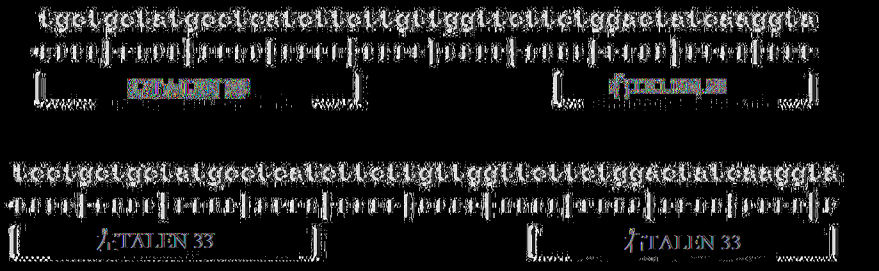
【請求項34】

如請求項33之醫藥組合物，其中該HBV誘發之疾病選自由以下組成之群：晚期纖維化、硬化及肝細胞癌(HCC)，該醫藥組合物視情況與另一治療劑，較佳地另一抗HBV劑組合。

【發明圖式】



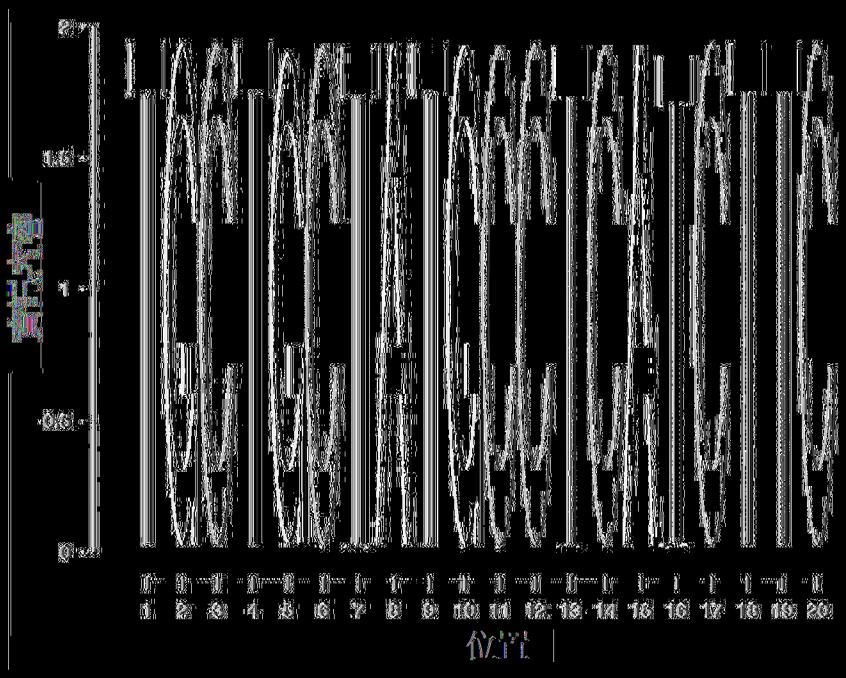
【圖1A】



【圖1B】

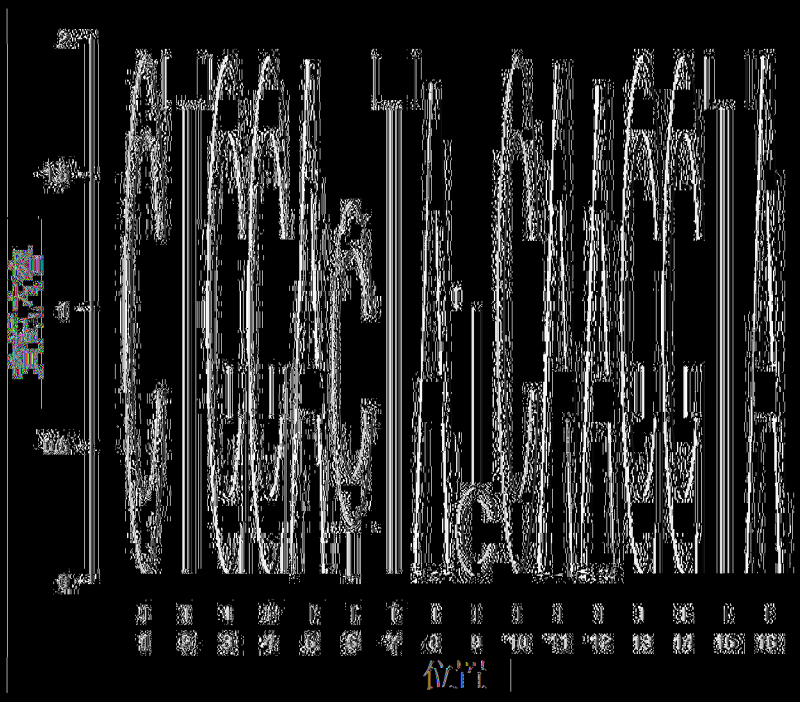


【圖1C】



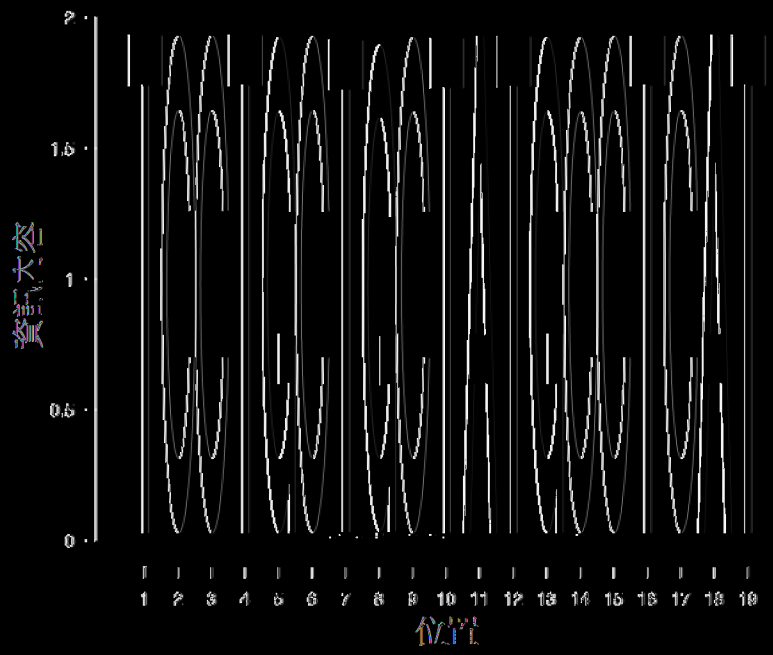
位置

(圖2A)



位置

(圖2B)



(圖3A)



(圖3B)

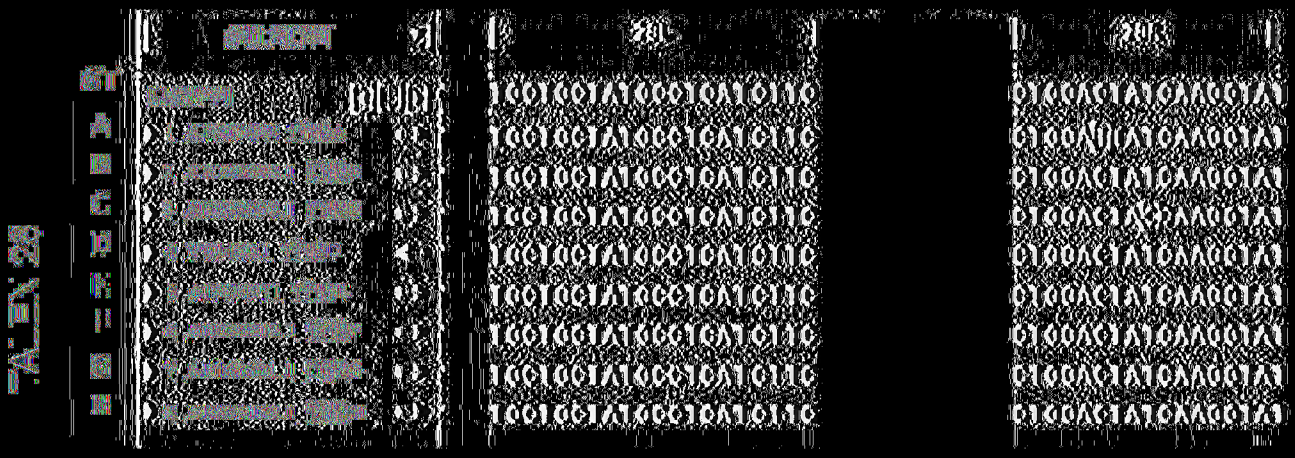


圖4A

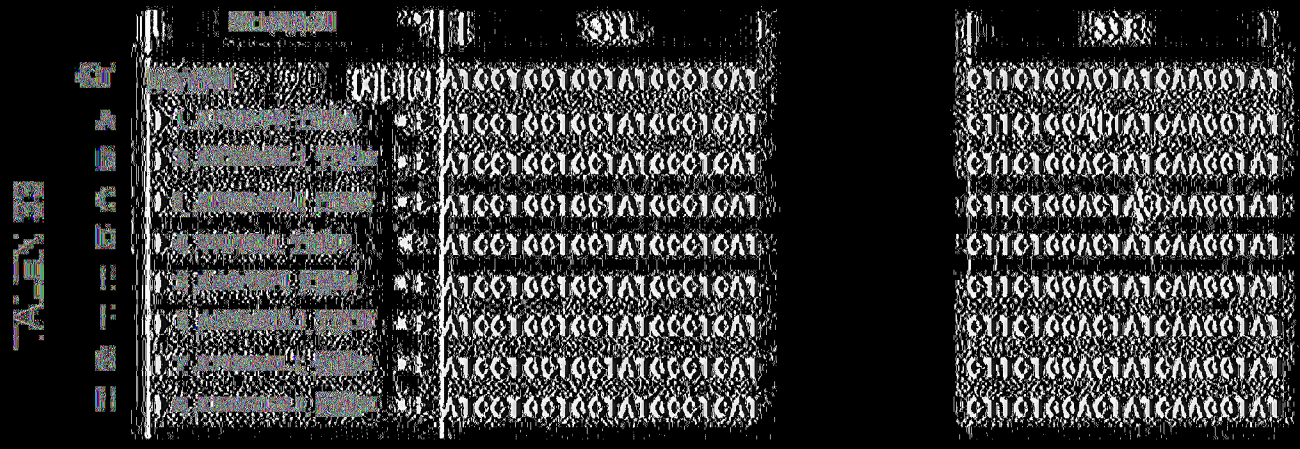
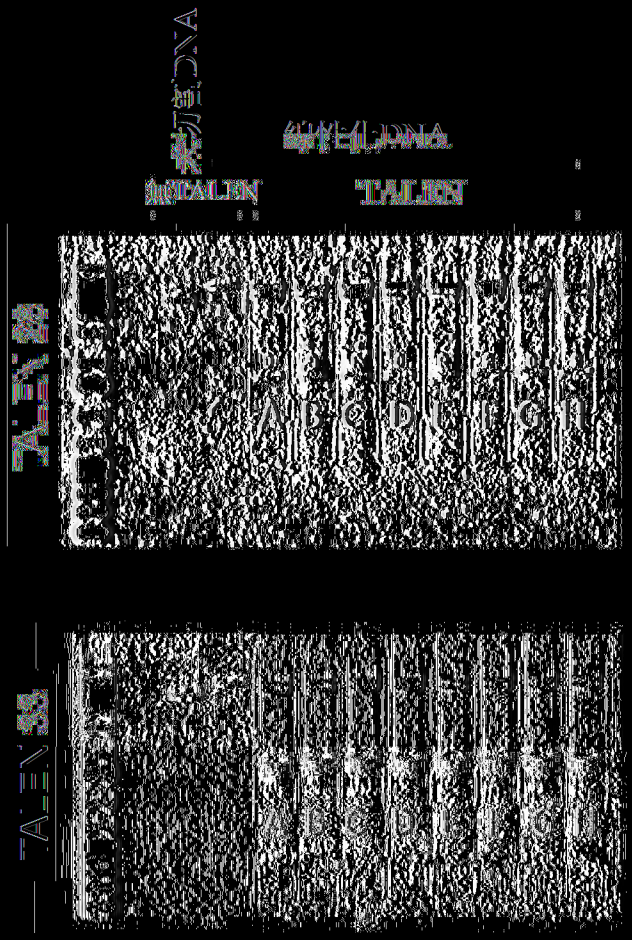


圖4B


ABCDEFGH
ABCDEFGH

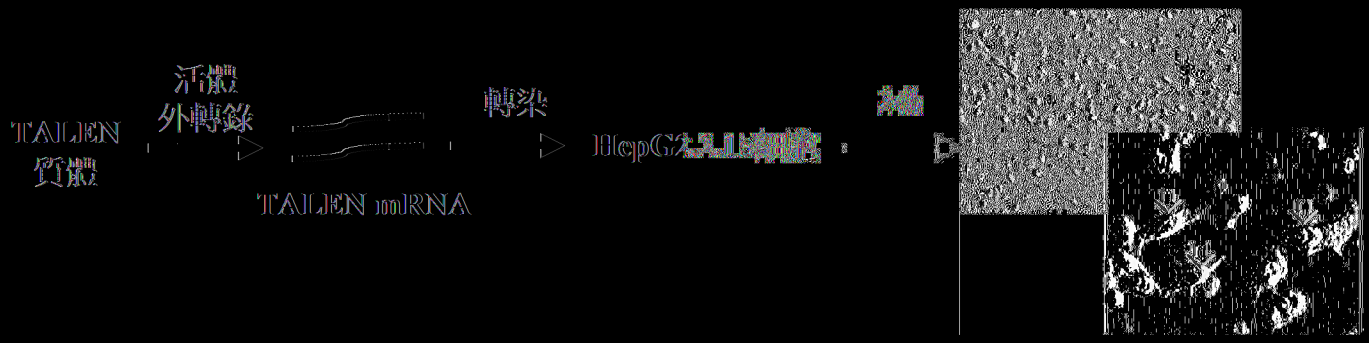

TALEN
質體
活體
外轉錄
TALEN mRNA
轉染
HepG2.2.15細胞
移植

圖5A

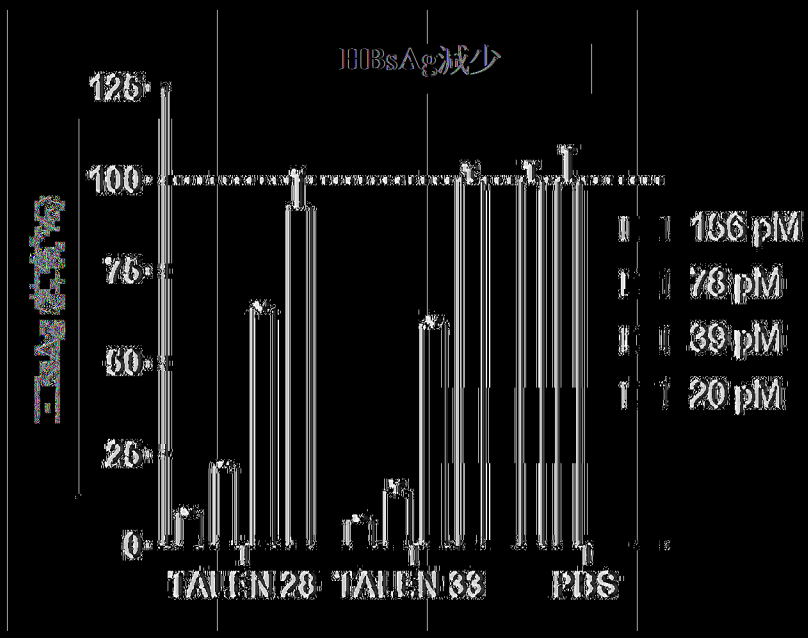
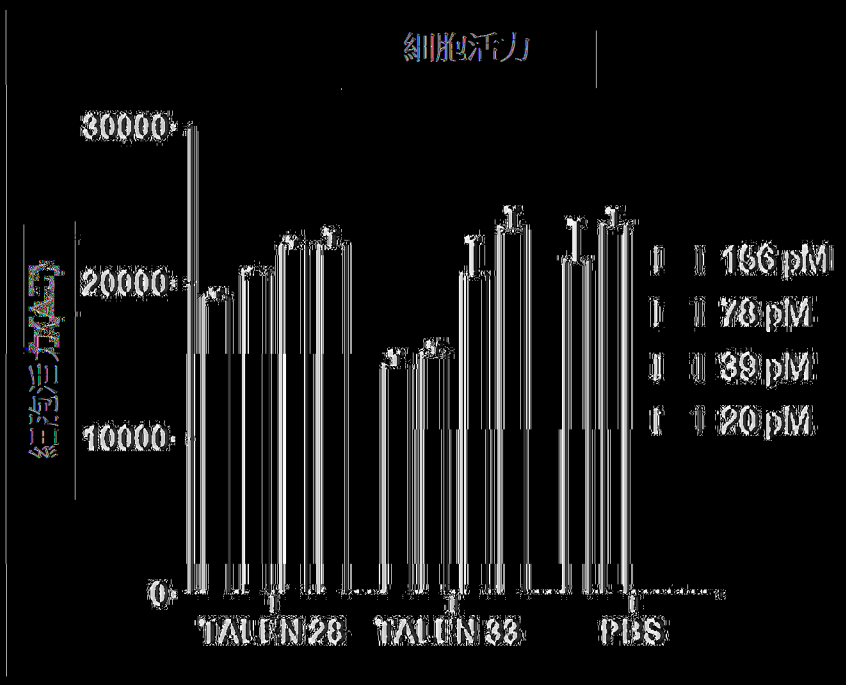
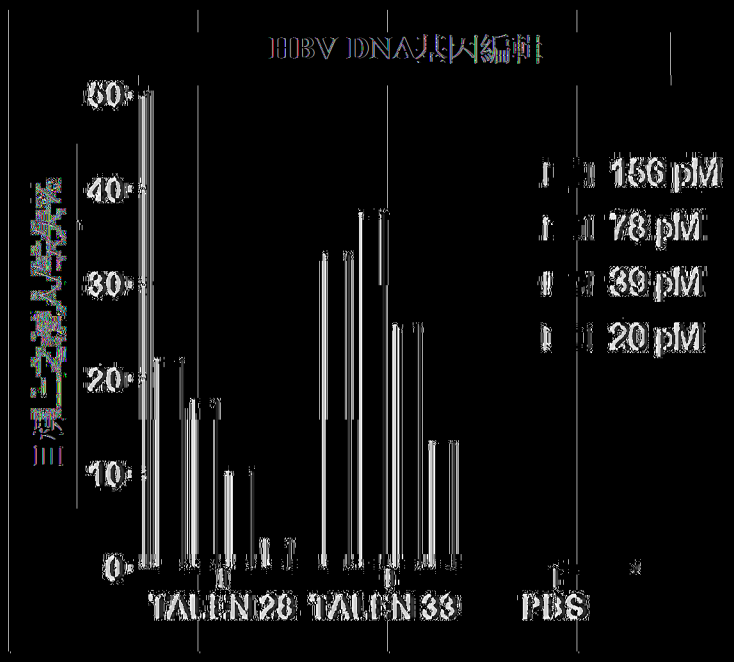

HBsAg減少
125
100
75
50
25
0
TALEN 28
TALEN 33
PBS
166 pM
78 pM
39 pM
20 pM

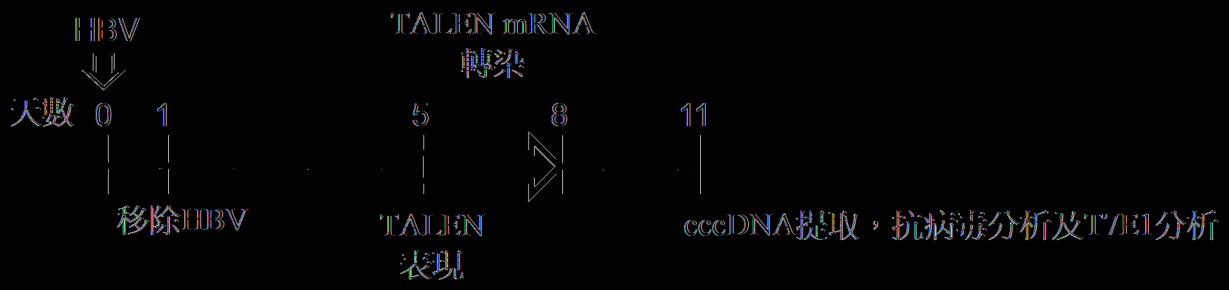
圖5B


細胞活力
30000
20000
10000
0
156 pM
78 pM
39 pM
20 pM
TALEN 28
TALEN 33
PBS

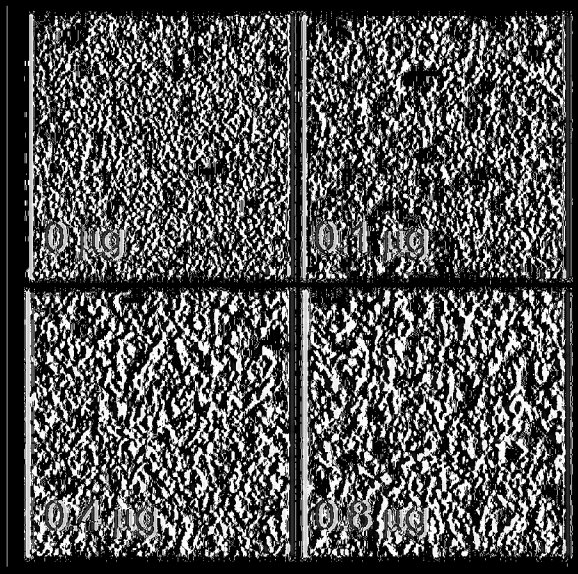
[圖5C]


HBV DNA基因編輯
60
40
30
20
10
0
156 pM
78 pM
39 pM
20 pM
TALEN 28
TALEN 33
PBS

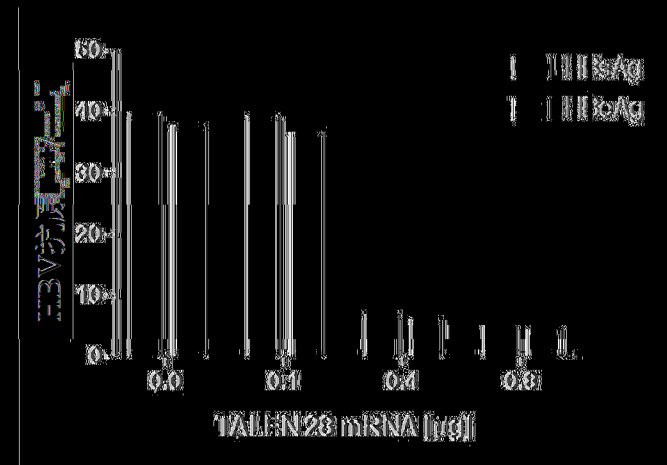
[圖5D]


HBV
天數 0 1
移除HBV
TALEN mRNA
轉染
5
TALEN
表現
8
11
cccDNA提取，抗病毒分析及T7E1分析

圖(6A)


0 μg
0.1 μg
0.4 μg
0.8 μg

圖(6B)


HBsAg
HBeAg
60
40
30
20
10
0
0.0
0.1
0.4
0.8
TALEN28 mRNA [μg]

圖(6C)

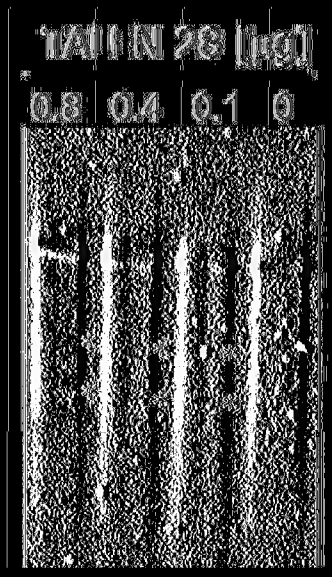


圖6D

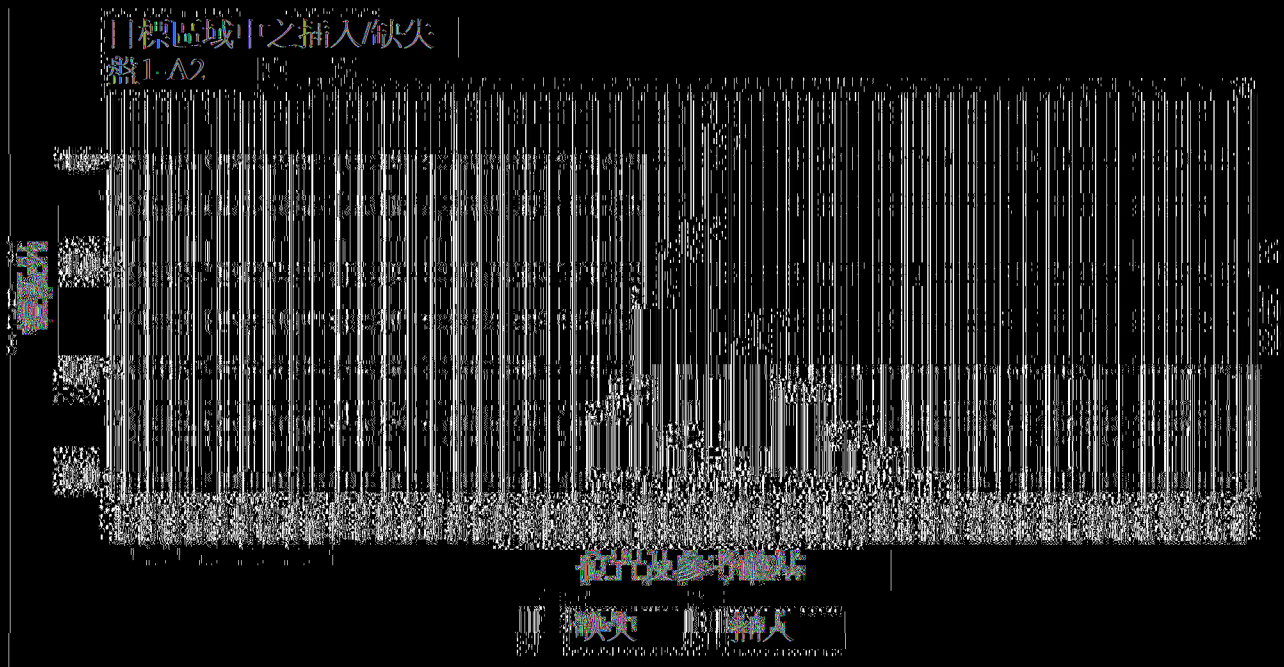


圖6E


HBV
天數 0 1
移除HBV
TALEN mRNA
轉染
5
TALEN
表現
8
11
cccDNA提取，抗病毒分析及T7E1分析

圖7A

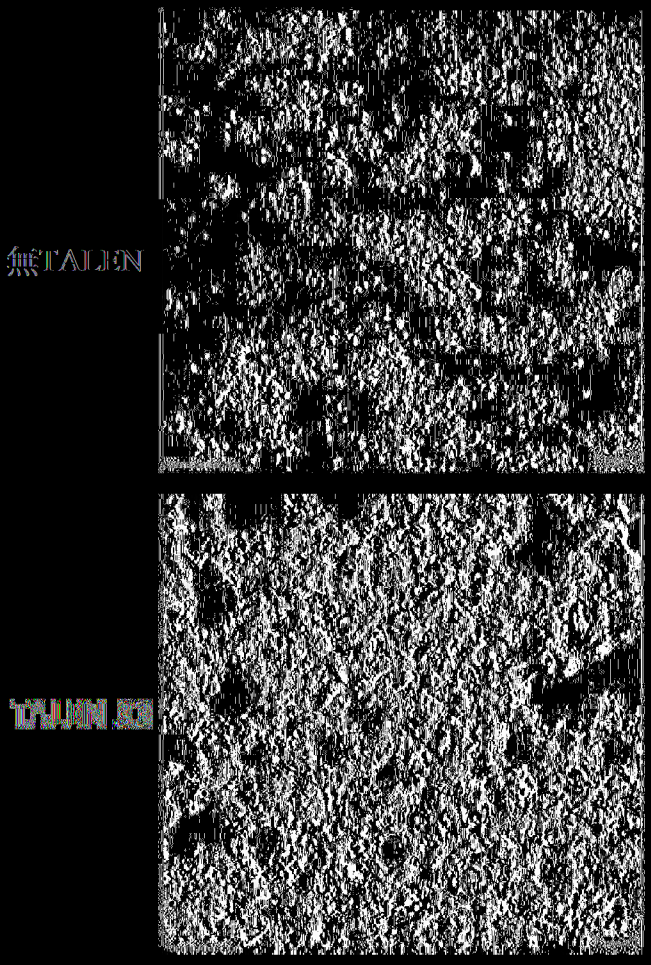
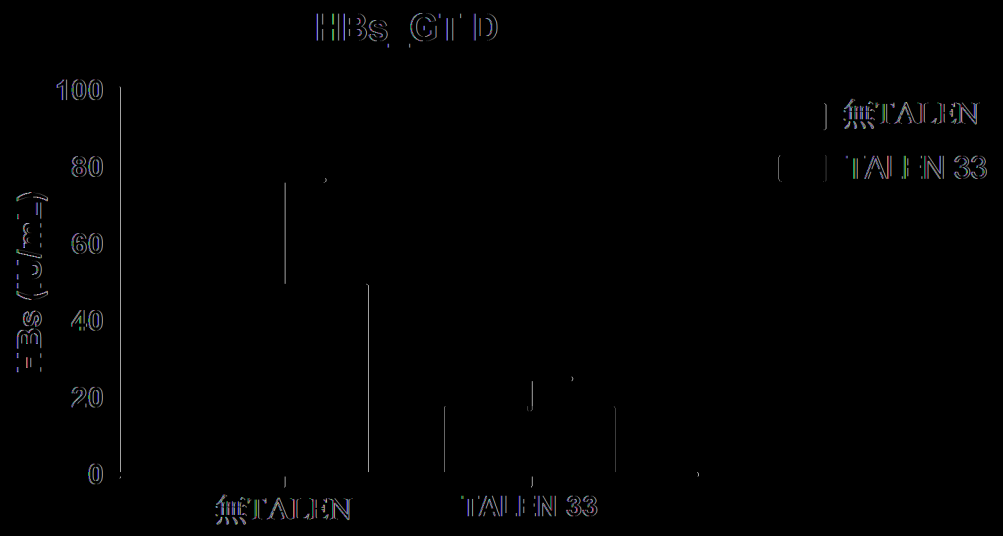
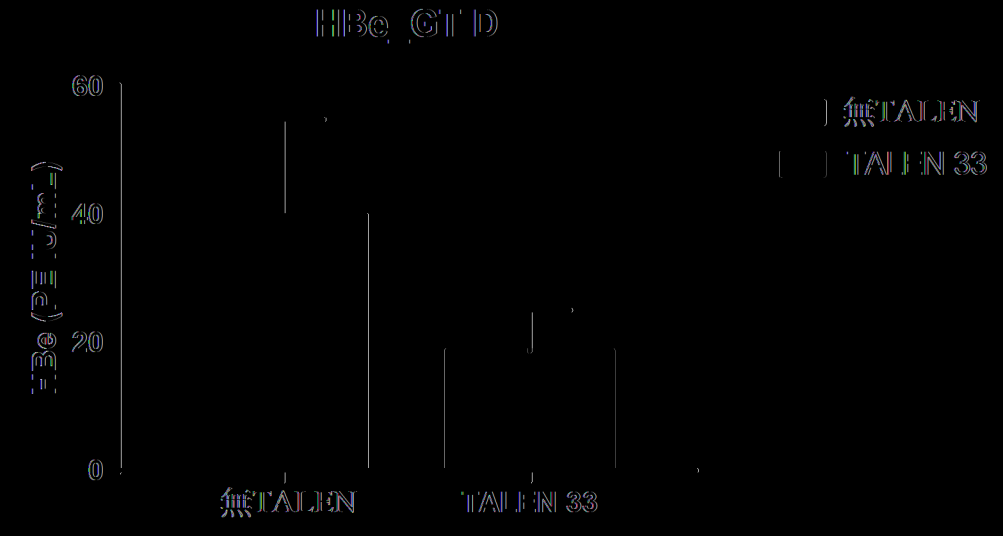
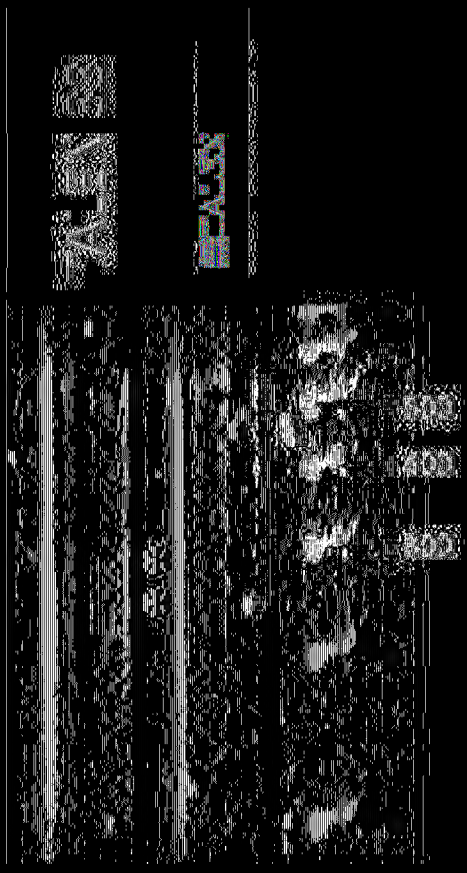

無TALEN
TALEN

圖7B

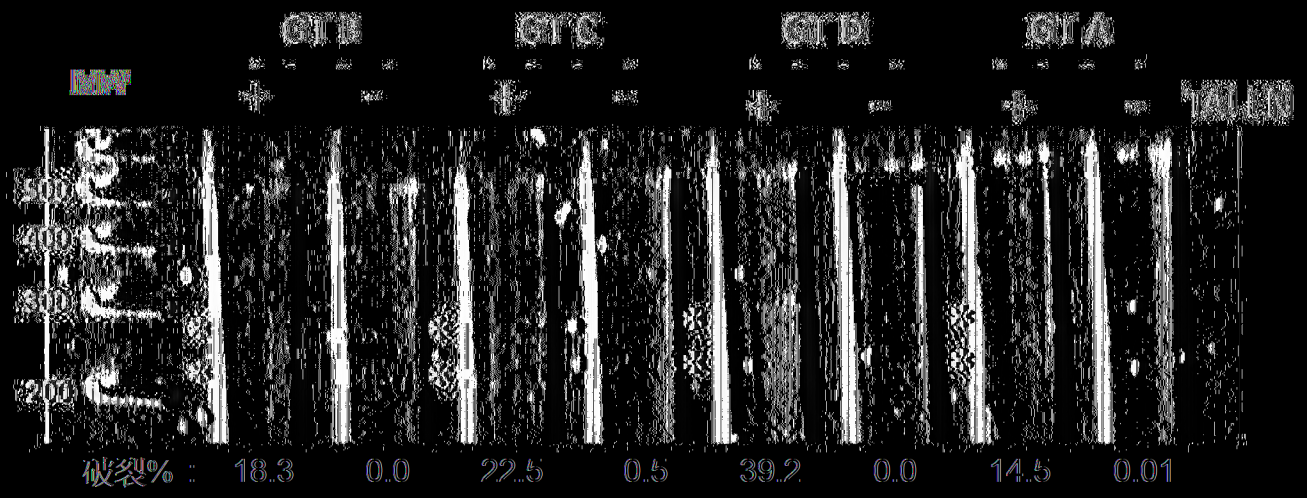

HBsAg (IU/mL)
100
80
60
40
20
0
無TALEN
TALEN 33
無TALEN
TALEN 33


HBeAg (S/CO)
60
40
20
0
無TALEN
TALEN 33
無TALEN
TALEN 33

|(時/C)|



|(|[|/D)|



圖(圖8)

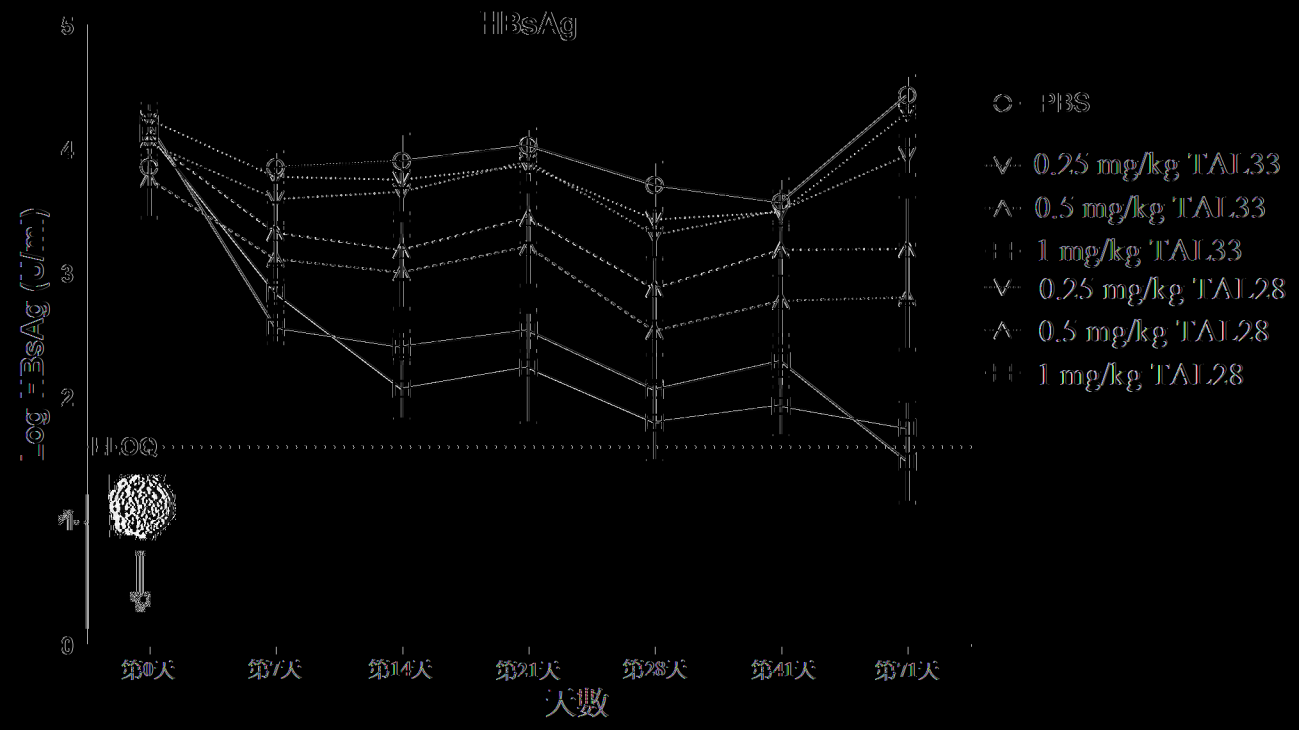

HBsAg
log HBsAg (IU/mL)
5
4
3
2
1
0
LOQ
第0天
第7天
第14天
第21天
第28天
第41天
第71天
天數
PBS
0.25 mg/kg TAL33
0.5 mg/kg TAL33
1 mg/kg TAL33
0.25 mg/kg TAL28
0.5 mg/kg TAL28
1 mg/kg TAL28

圖9A

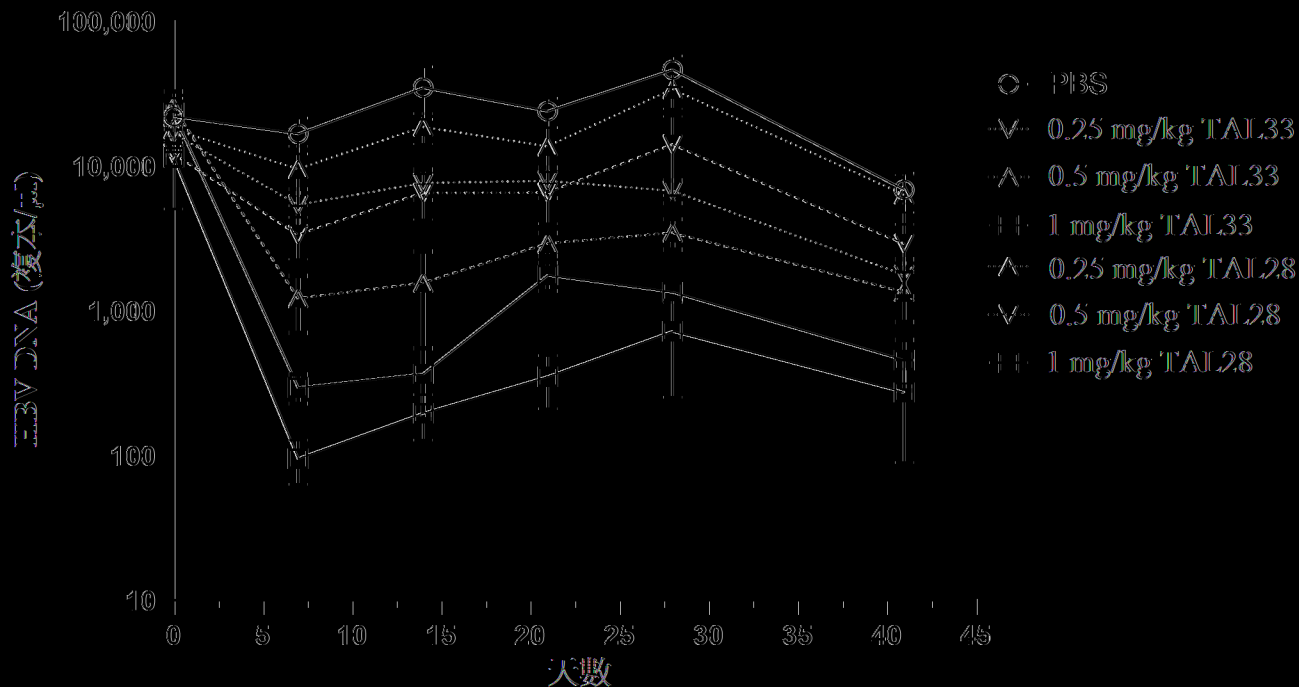
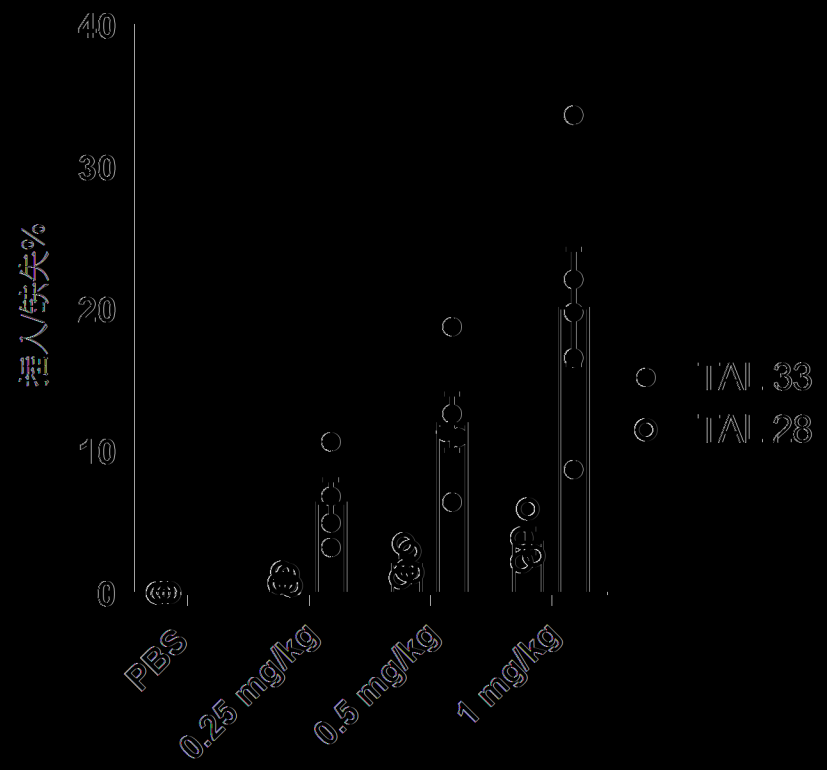

血清HBV DNA
HBV DNA (複本/mL)
100,000
10,000
1,000
100
10
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
天數
PBS
0.25 mg/kg TAL33
0.5 mg/kg TAL33
1 mg/kg TAL33
0.25 mg/kg TAL28
0.5 mg/kg TAL28
1 mg/kg TAL28

圖9B

其內編輯



|(時9C)|

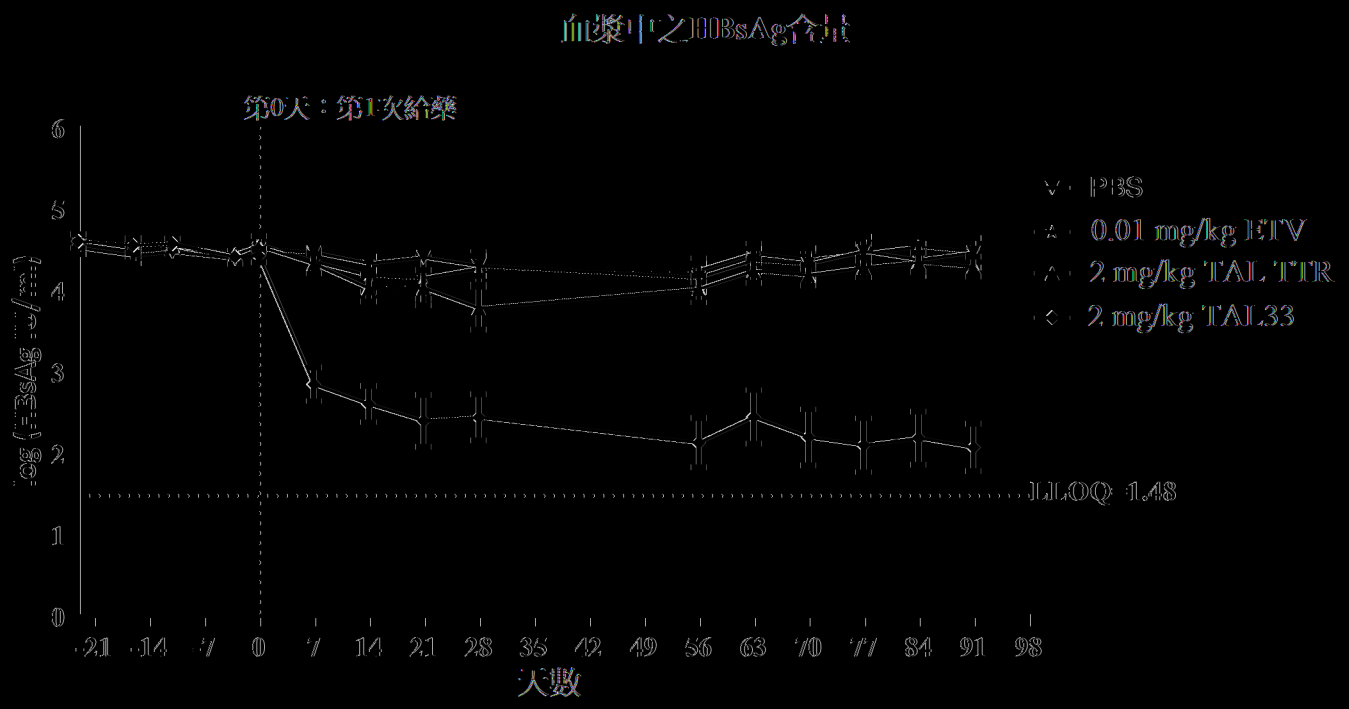

血漿中之HBsAg含量
第0天：第1次給藥
log (HBsAg IU/mL)
6
5
4
3
2
1
0
-21 -14 -7 0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98
天數
PBS
0.01 mg/kg ETV
2 mg/kg TAL TTR
2 mg/kg TAL33
LLOQ 1.48

圖10A

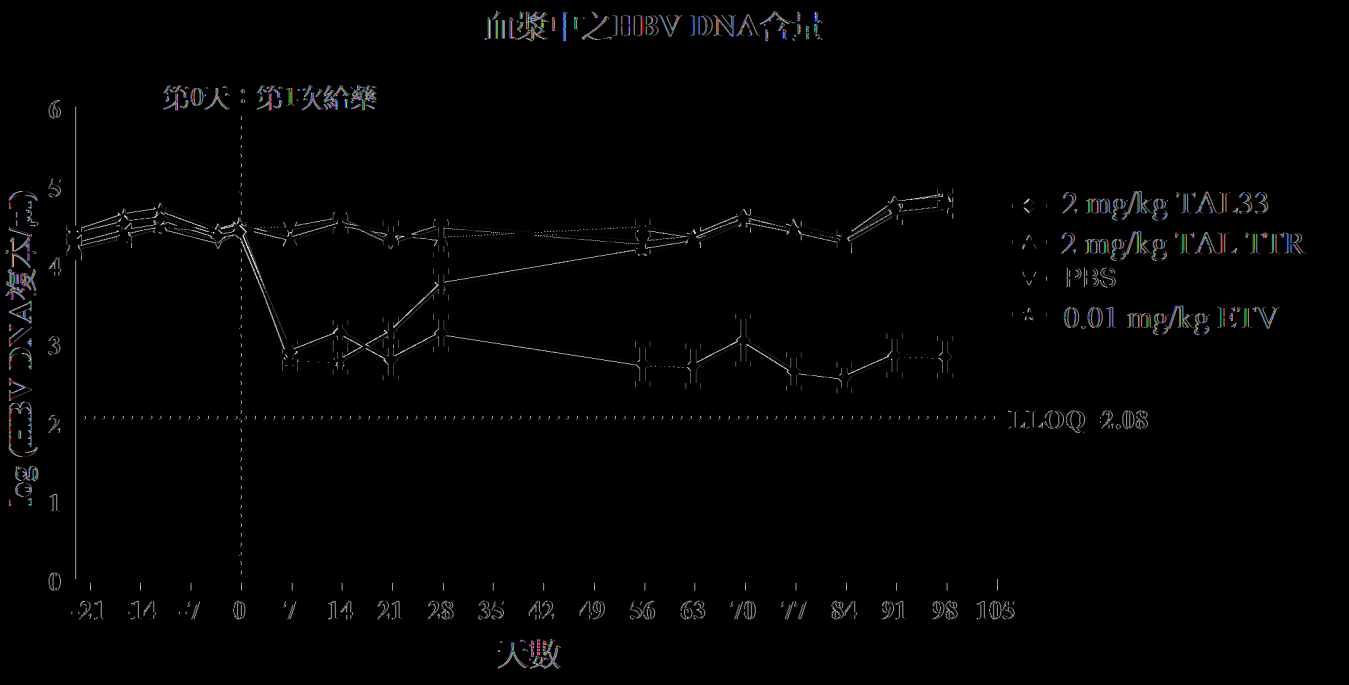

血漿中之HBV DNA含量
第0天：第1次給藥
log (HBV DNA拷貝/mL)
6
5
4
3
2
1
0
-21 -14 -7 0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105
天數
2 mg/kg TAL33
2 mg/kg TAL TTR
PBS
0.01 mg/kg ETV
LLOQ 2.08

圖10B