202509233

(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 202509233 A

(43)公開日： 中華民國 114 (2025) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：113125536 (22)申請日： 中華民國 106 (2017) 年 12 月 21 日

(51)Int. Cl.： *C12Q1/68 (2018.01)* *C07H21/02 (2006.01)*
A61K31/7088 (2006.01)

(30)優先權：2016/12/22 美國 62/438,219

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

(72)發明人：歐德 書布 ODATE, SHOBU (US)；史瑞普斯 瓦特 STRAPPS, WALTER (US)；
雷斯卡里 雷納德 麥克 LESCARBEAU, REYNALD MICHAEL (US)

(74)代理人：陳長文；張哲倫；姚金梅

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：243 項 圖式數：13 共 279 頁

(54)名稱

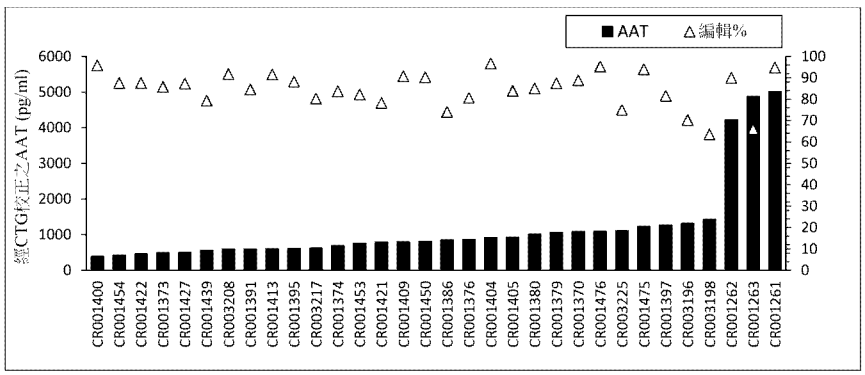
用於治療 α-1 抗胰蛋白酶缺乏症之組合物及方法

(57)摘要

本發明提供在 SERPINA1 基因中造成雙鏈斷裂之組合物及方法。提供減少及消除 α1-抗胰蛋白酶(AAT)之突變體形式(諸如患有 α1-抗胰蛋白酶缺乏症(AATD)之個體中所見的突變體形式)之組合物及方法。

Compositions and methods for introducing double-stranded breaks within the SERPINA1gene are provided. Compositions and methods for reducing and eliminating mutant forms of α1-antitrypsin (AAT), such as seen in subjects having α1-antitrypsin deficiency (AATD), are provided.

指定代表圖：



【圖2】

20250627
202[illegible]
專利案號：113125536
原申請案號：106145118

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於治療α-1抗胰蛋白酶缺乏症之組合物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING ALPHA-1 ANTITRYPSIN DEFICIENCY

【中文】

本發明提供在*SERPINA1*基因中造成雙鏈斷裂之組合物及方法。提供減少及消除α1-抗胰蛋白酶(AAT)之突變體形式(諸如患有α1-抗胰蛋白酶缺乏症(AATD)之個體中所見的突變體形式)之組合物及方法。

【英文】

Compositions and methods for introducing double-stranded breaks within the *SERPINA1* gene are provided. Compositions and methods for reducing and eliminating mutant forms of α1-antitrypsin (AAT), such as seen in subjects having α1-antitrypsin deficiency (AATD), are provided.

【指定代表圖】

圖2

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於治療α-1抗胰蛋白酶缺乏症之組合物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING ALPHA-1 ANTITRYPSIN DEFICIENCY

【技術領域】

本案揭露關於*SERPINA1*基因內之基因編輯或修飾*SERPINA1*基因之組合物及方法。

【先前技術】

α-1抗胰蛋白酶(AAT或A1AT)或血清胰蛋白酶抑制劑為一種類型之絲胺酸蛋白酶抑制劑(serine protease inhibitor) (亦稱為絲胺酸蛋白酶抑制劑(serpin))，其由*SERPINA1*基因編碼。AAT主要由肝細胞合成且由肝細胞分泌，且用以抑制肺中的嗜中性白血球彈性蛋白酶之活性。缺少足夠量的起作用之AAT，肺中之嗜中性白血球彈性蛋白酶會不受控制且對肺泡造成損害。因此，引起AAT含量降低或正常起作用之AAT的含量降低的*SERPINA1*突變會導致肺病變。此外，引起產生不會離開肝臟之變形AAT的*SERPINA1*突變會歸因於肝細胞中AAT之積聚而導致肝臟病變。因此，由*SERPINA1*突變所引起的不足及不恰當形成之AAT會導致肺及肝臟病變兩者。

已針對*SERPINA1*基因描述出多於一百種對偶基因變異體。一般根據變異體對AAT之血清含量的作用對其進行分類。舉例而言，M對偶基因為與正常血清AAT含量相關聯之正常變異體，而Z及S對偶基因為與降低之AAT含量相關聯之突變變異體。Z及S對偶基因之存在與α1-抗胰蛋白酶缺乏症(AATD或A1AD)相關聯，該缺乏症為一種遺傳性病症，其特徵在於

*SERPINA1*基因發生突變，導致產生異常AAT。

AATD存在多種形式及程度。「Z-變異體」最常見，其會在肝臟及肺兩者中導致嚴重臨床疾病。Z-變異體的特徵在於第5外顯子之5'端處的單核苷酸發生變化，導致麩胺酸在胺基酸位置342 (E342K)處誤義突變成離胺酸。症狀出現於在Z對偶基因處均為同種接合(ZZ)及異種接合(MZ或SZ)之患者中。一或兩種Z對偶基因之存在會在肝臟肝細胞中導致*SERPINA1* mRNA不穩定性及AAT蛋白質聚合及聚集。歸因於肝臟中聚集AAT蛋白質之積聚，具有至少一種Z對偶基因之患者的肝癌發病率會有所增加。除了肝臟病變以外，藉由至少一種Z對偶基因表徵之AATD的特徵亦在於因肺泡中AAT降低及所引起的嗜中性白血球彈性蛋白酶之抑制降低而導致肺病。嚴重ZZ形式(亦即Z-變異體之同種接合表現)在北歐人群中之發病率為1:2,000，且在美國發病率為1:4,500。

需要減輕AATD在肝臟及肺兩者中之消極影響。本發明提供使用CRISPR/Cas系統剔除*SERPINA1*基因，藉此消除產生與患有AATD之患者中的肝臟症狀相關聯的AAT之突變形式的組合物及方法。

【發明內容】

實施例01一種誘發*SERPINA1*基因中發生雙鏈斷裂(DSB)之方法，該方法包括向細胞遞送組合物，其中該組合物包含引導RNA，該引導RNA包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列或與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

實施例02一種修飾*SERPINA1*基因之方法，該方法包括向細胞遞送組合物，其中該組合物包含(i)經RNA引導之DNA結合劑或編碼經RNA引導

之DNA結合劑的核酸及(ii)引導RNA，其包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列或與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

實施例03一種治療α-1抗胰蛋白酶缺乏症(AATD)之方法，該方法包括向有需要之個體投與組合物，藉此治療AATD，其中該組合物包含(i)經RNA引導之DNA結合劑或編碼經RNA引導之DNA結合劑的核酸及(ii)引導RNA，其包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列或與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

實施例04一種用於減少或防止α-1抗胰蛋白酶(AAT)在個體之肝臟中積聚的方法，該方法包括向有需要之個體投與組合物，藉此減少AAT在肝臟中積聚，其中該組合物包含(i)經RNA引導之DNA結合劑或編碼經RNA引導之DNA結合劑的核酸及(ii)引導RNA，其包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列或與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

實施例05一種組合物，其包含引導RNA，該引導RNA包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列或與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

實施例06一種組合物，其包含編碼引導RNA之載體，其中該引導RNA包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列或與選自SEQ

ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

實施例07如實施例5或6之組合物，其供用於誘發細胞或個體中之*SERPINA1*基因中發生雙鏈斷裂(DSB)。

實施例08如實施例5或6之組合物，其供用於修飾細胞或個體中之*SERPINA1*基因。

實施例09如實施例5或6之組合物，其供用於治療個體中之α-1抗胰蛋白酶缺乏症(AATD)。

實施例10如實施例5或6之組合物，其供用於降低個體中之血清或肝臟AAT濃度。

實施例11如實施例5或6之組合物，其供用於減少或防止α-1抗胰蛋白酶(AAT)在個體之肝臟中積聚。

實施例12如實施例1至4中任一項之方法或如實施例5至11中任一項所使用之組合物，其中組合物會降低血清及/或肝臟AAT含量。

實施例13如實施例12所使用之方法或組合物，其中相較於投與組合物之前的血清及/或AAT含量，血清及/或肝臟AAT含量降低至少50%。

實施例14如實施例12所使用之方法或組合物，其中相較於投與組合物之前的血清及/或AAT含量，血清及/或AAT含量降低50%至60%、60%至70%、70%至80%、80%至90%、90%至95%、95%至98%、98%至99%或99%至100%。

實施例15如實施例1至4或7至14中任一項所使用之方法或組合物，其中組合物引起編輯*SERPINA1*基因。

實施例16如實施例15所使用之方法或組合物，其中編輯計算為經編

輯的基因群之百分比(編輯百分比)。

實施例17如實施例16所使用之方法或組合物，其中編輯百分比在30%與99%之間。

實施例18如實施例17所使用之方法或組合物，其中編輯百分比在30%與35%之間、35%與40%之間、40%與45%之間、45%與50%之間、50%與55%之間、55%與60%之間、60%與65%之間、65%與70%之間、70%與75%之間、75%與80%之間、80%與85%之間、85%與90%之間、90%與95%之間或95%與99%之間。

實施例19如實施例1至4或7至18中任一項所使用之方法或組合物，其中投與或遞送組合物至少兩次。

實施例20 如實施例19所使用之方法或組合物，其中投與或遞送組合物至少三次。

實施例21如實施例19所使用之方法或組合物，其中投與或遞送組合物至少四次。

實施例22如實施例19所使用之方法或組合物，其中投與或遞送組合物至多五、六、七、八、九或十次。

實施例23如實施例19至22中任一項所使用之方法或組合物，其中投與或遞送以1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15天之間隔進行。

實施例24如實施例19至22中任一項所使用之方法或組合物，其中投與或遞送以1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15週之間隔進行。

實施例25如實施例19至22中任一項所使用之方法或組合物，其中投

與或遞送以1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個月之間隔進行。

實施例26如前述實施例中任一項之方法或組合物，其中引導序列係選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129。

實施例27如前述實施例中任一項之方法或組合物，其中引導RNA與人類*SERPINA1*基因中所存在之靶序列至少部分互補。

實施例28如實施例27之方法或組合物，其中靶序列處於人類*SERPINA1*基因之外顯子2、3、4或5中。

實施例29如實施例27之方法或組合物，其中靶序列處於人類*SERPINA1*基因之外顯子2中。

實施例30如實施例27之方法或組合物，其中靶序列處於人類*SERPINA1*基因之外顯子3中。

實施例31如實施例27之方法或組合物，其中靶序列處於人類*SERPINA1*基因之外顯子4中。

實施例32如實施例27之方法或組合物，其中靶序列處於人類*SERPINA1*基因之外顯子5中。

實施例33如實施例1至32中任一項之方法或組合物，其中引導序列與*SERPINA1*之正鏈中的靶序列互補。

實施例34如實施例1至32中任一項之方法或組合物，其中引導序列與*SERPINA1*之負鏈中的靶序列互補。

實施例35如實施例1至32中任一項之方法或組合物，其進一步包含第二引導序列，其中第一引導序列與*SERPINA1*基因之正鏈中的第一靶序列互補，且其中第二引導序列與*SERPINA1*基因之負鏈中的第二靶序列互

補。

實施例36如前述實施例中任一項之方法或組合物，其中引導RNA包含crRNA，其包含引導序列且進一步包含SEQ ID NO:140之核苷酸序列，其中SEQ ID NO:140之核苷酸在引導序列之3'端後。

實施例37如前述實施例中任一項之方法或組合物，其中引導RNA為雙引導(dgRNA)。

實施例38如實施例37之方法或組合物，其中雙引導RNA包含crRNA及trRNA，該crRNA包含SEQ ID NO:140之核苷酸序列，其中SEQ ID NO:140之核苷酸在引導序列之3'端後。

實施例39如實施例1至36中任一項之方法或組合物，其中引導RNA為單引導(sgRNA)。

實施例40如實施例39之方法或組合物，其中sgRNA包含具有SEQ ID NO:130之模式的引導序列。

實施例41如實施例39之方法或組合物，其中sgRNA包含SEQ ID NO:130之序列。

實施例42如實施例40或41之方法或組合物，其中SEQ ID NO:130中之各N為任何天然或非天然核苷酸，其中該等N形成引導序列，且引導序列使經RNA引導之DNA結合劑靶向*SERPINA1*基因。

實施例43如實施例39至42中任一項之方法或組合物，其中sgRNA包含SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列及SEQ ID NO:140之核苷酸中之任一者。

實施例44如實施例39至43中任一項之方法或組合物，其中sgRNA包含與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、

97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

實施例45如實施例42之方法或組合物，其中SEQ ID NO:130中之各N經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列置換。

實施例46如前述實施例中任一項之方法或組合物，其中引導RNA包含至少一種修飾。

實施例47如實施例46之方法或組合物，其中至少一種修飾包括經2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾之核苷酸。

實施例48如實施例46或47之方法或組合物，其中至少一種修飾包括處於各核苷酸之間的硫代磷酸酯(PS)鍵。

實施例49如實施例46至48中任一項之方法或組合物，其中至少一種修飾包括經2'-氟基(2'-F)修飾之核苷酸。

實施例50如實施例46至49中任一項之方法或組合物，其中至少一種修飾包括在5’端前五個核苷酸中之一或多處進行修飾。

實施例51如實施例46至50中任一項之方法或組合物，其中至少一種修飾包括在3’端最後五個核苷酸中之一或多處進行修飾。

實施例52如實施例46至51中任一項之方法或組合物，其中至少一種修飾包括處於前四個核苷酸之間的PS鍵。

實施例53如實施例46至52中任一項之方法或組合物，其中至少一種修飾包括處於最後四個核苷酸之間的PS鍵。

實施例54如實施例46至53中任一項之方法或組合物，其中至少一種修飾包括在5’端前三個核苷酸處的經2'-O-Me修飾之核苷酸。

實施例55如實施例46至54中任一項之方法或組合物，其中至少一種修飾包括在3’端最後三個核苷酸處的經2'-O-Me修飾之核苷酸。

實施例56如實施例46至55中任一項之方法或組合物，其中引導RNA包含SEQ ID NO:130之經修飾核苷酸。

實施例57如實施例1至56中任一項之方法或組合物，其中組合物進一步包含醫藥學上可接受之賦形劑。

實施例58如實施例1至57中任一項之方法或組合物，其中引導RNA及視情況選用之經RNA引導之DNA結合劑或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸與脂質奈米粒子(LNP)締合。

實施例59如實施例58之方法或組合物，其中LNP包含CCD脂質。

實施例60如實施例59之方法或組合物，其中CCD脂質為脂質A。

實施例61如實施例58至60之方法或組合物，其中LNP包含中性脂質。

實施例62如實施例61之方法或組合物，其中中性脂質為DSPC。

實施例63如實施例58至62中任一項之方法或組合物，其中LNP包含輔助脂質。

實施例64如實施例63之方法或組合物，其中輔助脂質為膽固醇。

實施例65如實施例58至64中任一項之方法或組合物，其中LNP包含隱形脂質(stealth lipid)。

實施例66如實施例58至65之方法或組合物，其中隱形脂質為PEG2k-DMG。

實施例67如前述實施例中任一項之方法或組合物，其中組合物進一步包含經RNA引導之DNA結合劑。

實施例68如前述實施例中任一項之方法或組合物，其中組合物進一步包含編碼經RNA引導之DNA結合劑的mRNA。

實施例69如實施例67或68之方法或組合物，其中經RNA引導之DNA結合劑為Cas裂解酶。

實施例70如實施例69之方法或組合物，其中經RNA引導之DNA結合劑為Cas9。

實施例71如實施例67至70中任一項之方法或組合物，其中經RNA引導之DNA結合劑經修飾。

實施例72如實施例67至71中任一項之方法或組合物，其中經RNA引導之DNA結合劑為切口酶(nickase)。

實施例73如實施例71或72之方法或組合物，其中經修飾的經RNA引導之DNA結合劑包含核定位信號(NLS)。

實施例74如實施例67至73中任一項之方法或組合物，其中經RNA引導之DNA結合劑為來自II型CRISPR/Cas系統之Cas。

實施例75如前述實施例中任一項之方法或組合物，其中組合物為醫藥調配物且進一步包含醫藥學上可接受之載劑。

實施例76如實施例1至4或7至75中任一項所使用之方法或組合物，其中組合物會減少或防止α-1抗胰蛋白酶(AAT)在肝臟中積聚。

實施例77如實施例76所使用之方法或組合物，其中AAT為變形的。

實施例78如實施例1至4或7至77中任一項所使用之方法或組合物，其中非同源末端連接(non-homologous ending joining；NHEJ)在修復*SERPINA1*基因中之DSB期間引起突變。

實施例79如實施例78所使用之方法或組合物，其中NHEJ在修復*SERPINA1*基因中之DSB期間引起核苷酸缺失或插入。

實施例80如實施例80所使用之方法或組合物，其中核苷酸之缺失或

插入誘發*SERPINA1*基因中發生框移或無意義突變。

實施例81如實施例80所使用之方法或組合物，其中在至少50%之肝臟細胞的*SERPINA1*基因中誘發框移或無意義突變。

實施例82如實施例81所使用之方法或組合物，其中在50%至60%、60%至70%、70%或80%、80%至90%、90%至95%、95%至99%或99%至100%之肝臟細胞的*SERPINA1*基因中誘發框移或無意義突變。

實施例83如實施例79至82中任一項所使用之方法或組合物，其中發生在*SERPINA1*基因中的核苷酸缺失或插入為在脫靶位點處的至少50倍或大於50倍。

實施例84如實施例83所使用之方法或組合物，其中發生在*SERPINA1*基因中的核苷酸之缺失或插入比在脫靶位點處多50倍至150倍、150倍至500倍、500倍至1500倍、1500倍至5000倍、5000倍至15000倍、15000倍至30000倍或30000倍至60000倍。

實施例85如實施例1至4或7至84中任一項所使用之方法或組合物，其中投與組合物會降低個體中之AAT含量。

實施例86如實施例85所使用之方法或組合物，其中AAT含量降低至少40%。

實施例87如實施例86所使用之方法或組合物，其中AAT含量降低40%至50%、50%至60%、60%至70%、70%或80%、80%至90%、90%至95%、95%至99%或99%至100%。

實施例88如實施例86或87所使用之方法或組合物，其中在血清、血漿、血液、大腦脊髓液或痰中量測AAT含量。

實施例89如實施例86或87所使用之方法或組合物，其中在肝臟及/或

血清中量測AAT含量。

實施例90如實施例85至89中任一項所使用之方法或組合物，其中經由酶聯免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay；ELISA)量測AAT含量。

實施例91如實施例1至4或7至90中任一項所使用之方法或組合物，其中個體患有AATD。

實施例92如實施例1至4或7至91中任一項所使用之方法或組合物，其中個體為人類。

實施例93如實施例91或92所使用之方法或組合物，其中個體患有AATD。

實施例94如實施例91或92所使用之方法或組合物，其中個體患有遺傳性AATD。

實施例95如實施例1至4、7至92或94中任一項所使用之方法或組合物，其中個體具有AATD家族病史。

實施例96如實施例1至4或7至95中任一項所使用之方法或組合物，其中個體僅具有或主要具有AATD之肝臟症狀。

實施例97如實施例1至4或7至96中任一項所使用之方法或組合物，其中個體在SERPINA1基因座之Z對偶基因為異種接合。

實施例98如實施例97之方法，其中個體在SERPINA1基因座處具有一個Z對偶基因及一個S對偶基因。

實施例99如實施例1至4或7至98中任一項所使用之方法或組合物，其中個體在AAT之胺基酸序列處不具有E342K突變，但具有降低含量之野生型AAT。

實施例100　如實施例1至4或7至99中任一項所使用之方法或組合物，其中個體之水腫、腹水或黃疸有所改善、穩定或減緩，或延緩對肝臟移植之需要。

實施例101　如實施例1至4或7至99中任一項所使用之方法或組合物，其中如藉由成像方法或肝酶含量所量測，個體由於投藥而具有改善、穩定或減緩變化。

實施例102　如實施例1至4或7至101中任一項所使用之方法或組合物，其中組合物或醫藥調配物經由病毒載體投與。

實施例103　如實施例1至4或7至102中任一項所使用之方法或組合物，其中組合物或醫藥調配物經由脂質奈米粒子投與。

實施例104　如實施例1至4或7至103中任一項所使用之方法或組合物，其中在投與組合物或調配物之前針對*SERPINA1*基因中之特定突變測試個體。

實施例105　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:5。

實施例106　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:6。

實施例107　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:7。

實施例108　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:8。

實施例109　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:9。

實施例110　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:10。

實施例111　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:11。

實施例112　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:12。

實施例113　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:13。

實施例114　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:14。

實施例115　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:15。

實施例116　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:16。

實施例117　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:17。

實施例118　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:18。

實施例119　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:19。

實施例120　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:20。

實施例121　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自

SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:21。

實施例122　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:22。

實施例123　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:23。

實施例124　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:24。

實施例125　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:25。

實施例126　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:26。

實施例127　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:27。

實施例128　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:28。

實施例129　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:29。

實施例130　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:30。

實施例131　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:31。

實施例132　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:32。

實施例133　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:33。

實施例134　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:34。

實施例135　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:35。

實施例136　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:36。

實施例137　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:37。

實施例138　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:38。

實施例139　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:39。

實施例140　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:40。

實施例141　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:41。

實施例142　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:42。

實施例143　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:43。

實施例144　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自

SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:44。

實施例145　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:45。

實施例146　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:46。

實施例147　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:47。

實施例148　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:48。

實施例149　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:49。

實施例150　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:50。

實施例151　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:51。

實施例152　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:52。

實施例153　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:53。

實施例154　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:54。

實施例155　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:55。

實施例156　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:56。

實施例157　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:57。

實施例158　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:58。

實施例159　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:59。

實施例160　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:60。

實施例161　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:61。

實施例162　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:62。

實施例163　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:63。

實施例164　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:64。

實施例165　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:65。

實施例166　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:66。

實施例167　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自

SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:67。

實施例168　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:68。

實施例169　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:69。

實施例170　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:70。

實施例171　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:71。

實施例172　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:72。

實施例173　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:73。

實施例174　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:74。

實施例175　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:75。

實施例176　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:76。

實施例177　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:77。

實施例178　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:78。

實施例179　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:79。

實施例180　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:80。

實施例181　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:81。

實施例182　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:82。

實施例183　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:83。

實施例184　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:84。

實施例185　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:85。

實施例186　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:86。

實施例187　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:87。

實施例188　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:88。

實施例189　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:89。

實施例190　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自

SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:90。

實施例191　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:91。

實施例192　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:92。

實施例193　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:93。

實施例194　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:94。

實施例195　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:95。

實施例196　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:96。

實施例197　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:97。

實施例198　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:98。

實施例199　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:99。

實施例200　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:100。

實施例201　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:101。

實施例202　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:102。

實施例203　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:103。

實施例204　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:104。

實施例205　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:105。

實施例206　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:106。

實施例207　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:107。

實施例208　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:108。

實施例209　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:109。

實施例210　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:110。

實施例211　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:111。

實施例212　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:112。

實施例213　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自

SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:113。

實施例214　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:114。

實施例215　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:115。

實施例216　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:116。

實施例217　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:117。

實施例218　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:118。

實施例219　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:119。

實施例220　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:120。

實施例221　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:121。

實施例222　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:122。

實施例223　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:123。

實施例224　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:124。

實施例225　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:125。

實施例226　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:126。

實施例227　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:127。

實施例228　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:128。

實施例229　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列為SEQ ID NO:129。

實施例230　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其進一步包含SEQ ID NO:140或SEQ ID NO:141之序列。

實施例231　如實施例230之方法或組合物，其包含SEQ ID NO:130之修飾模式。

實施例232　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中序列係選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139。

實施例233　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之序列為SEQ ID NO:131。

實施例234　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之序列為SEQ ID NO:132。

實施例235　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之序列為SEQ ID NO:133。

實施例236　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自

SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之序列為SEQ ID NO:134。

實施例237　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之序列為SEQ ID NO:135。

實施例238　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之序列為SEQ ID NO:136。

實施例239　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之序列為SEQ ID NO:137。

實施例240　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之序列為SEQ ID NO:138。

實施例241　如實施例1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之序列為SEQ ID NO:139。

實施例242　如技術方案232至241中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之序列包含表2中之相應序列所示之修飾。

實施例243　一種如實施例5至241中任一項之組合物或調配物之用途，其用於製備供用於治療患有AATD之人類個體的藥劑。

【圖式簡單說明】

圖1顯示具有由表7中所提供之引導序列靶向的*SERPINA1*基因之區的染色體14之示意圖。

圖2顯示在投與x軸上所提供之引導序列後的AAT之編輯百分比(編輯%)及經分泌之AAT的含量。CTG = CellTiter-Glo。

圖3顯示靶向*SERPINA1*之某些引導RNA的脫靶分析。在該圖式中，三角形表示中靶切割位點之標識，而圓圈表示可能存在之脫靶位點的標

識。

圖4顯示HUH7細胞中經AAT靶向之引導物的西方墨點分析。

圖5A至圖5C顯示關於CR003208及對照引導物CR001263之ELISA資料，其顯示HUH7細胞中AAT分泌的下降百分比(5A)、HUH7細胞中AAT下降百分比的西方墨點(WB)分析(5B)及脫靶分析(5C)。在圖5C中，在相關基因SERPINA2中鑑別到可能存在之單一脫靶位點，如由箭頭表示(亦參見圖3)。人類引導序列及食蟹獼猴中與相應靶序列互補之序列均為CR003208 (SEQ ID NO:107)。應注意，與人類引導序列互補的靶序列之染色體位置列於表1中。

圖6A至圖6C顯示CR001413及對照引導物CR001262之ELISA資料，其顯示HUH7細胞中AAT分泌的下降百分比(6A)、HUH7細胞中AAT下降百分比的西方墨點(WB)分析(6B)及脫靶分析(6C)。人類引導序列及食蟹獼猴中與相應靶序列互補之序列分別為CR001413 (SEQ ID NO:51)及GUUGAGGAACAGGCCGUUGC (SEQ ID NO:271)。應注意，與人類引導序列互補的靶序列之染色體位置列於表1中。

圖7A至圖7C顯示CR001400及對照引導物CR001261之ELISA資料，其顯示HUH7細胞中AAT分泌的下降百分比(7A)、HUH7細胞中AAT下降百分比的西方墨點(WB)分析(7B)及脫靶分析(7C)。人類引導序列及食蟹獼猴中與相應靶序列互補之序列分別為SEQ ID NO:38及ACUCACAGUGAAAUCCUGGA (SEQ ID NO:272)。應注意，與人類引導序列互補的靶序列之染色體位置列於表1中。

圖8A至圖8C顯示CR001427及對照引導物CR001262之ELISA資料，其顯示HUH7細胞中AAT分泌的下降百分比(8A)、HUH7細胞中AAT下降

百分比的西方墨點(WB)分析(8B)及脫靶分析(8C)。人類引導序列及食蟹獼猴中與相應靶序列互補之序列均為CR001427(SEQ ID NO:65)。應注意，與人類引導序列互補的靶序列之染色體位置列於表1中。

圖9A至圖9C顯示CR001386及對照引導物CR001261之ELISA資料，其顯示HUH7細胞中AAT分泌的下降百分比(9A)、HUH7細胞中AAT下降百分比的西方墨點(WB)分析(9B)及脫靶分析(9C)。人類引導序列及食蟹獼猴中與相應靶序列互補之序列分別為CR001386 (SEQ ID NO:24)及GAAGCCGAACUCAGCCAGGC (SEQ ID NO:273)。應注意，與人類引導序列互補的靶序列之染色體位置列於表1中。

圖10A至圖10C顯示CR001404及對照引導物CR001261之ELISA資料，其顯示HUH7細胞中AAT分泌的下降百分比(10A)、HUH7細胞中AAT下降百分比的西方墨點(WB)分析(10B)及脫靶分析(10C)。在圖10C中，鑑別出單一脫靶位點，如由箭頭表示(亦參見圖3)。人類引導序列及食蟹獼猴中與相應靶序列互補之序列分別為CR001404 (SEQ ID NO:42)及CAACGUCACGGAGAUUCCGG (SEQ ID NO:274)。應注意，與人類引導序列互補的靶序列之染色體位置列於表1中。

圖11顯示在劑量反應曲線(「DRC」)中多種濃度下針對不同引導物的HepG2細胞中的AAT之編輯百分比。

圖12顯示在劑量反應曲線(「DRC」)中多種濃度下針對不同引導物的原生人類肝細胞(PHH)中的AAT之編輯百分比。

圖13A至圖13C顯示攜帶*SERPINA1*之人類PiZ變異體之複本的轉殖基因小鼠中的活體內實驗結果。圖13A顯示各組中*SERPINA1*之PiZ變異體的穩定編輯，其中在媒劑對照(TSS)中未偵測到編輯。圖13B顯示來自此同

一實驗之ELISA資料，而圖13C顯示來自此同一實驗之西方墨點法資料。

【實施方式】

本申請案主張2016年12月22日申請的美國臨時申請案第62/438,219號之優先權權益，且該臨時申請案以全文引用之方式併入本文中。

本申請案含有序列表，該序列表已以ASCII格式、以電子方式提交且以全文引用之方式併入本文中。於2017年12月20日創建的該ASCII複本稱為2017-12-20_01155-0005-00PCT_ST25_ v2.txt且大小為92,165個位元組。

本文提供在CRISPR/Cas9系統中適用於編輯*SERPINA1*基因之引導RNA組合物。可向具有非野生型*SERPINA1*基因序列之個體，諸如患有α-1抗胰蛋白酶缺乏症(「AATD」或「A1AD」)之個體投與呈雙或單引導RNA形式之引導RNA，及經RNA引導之DNA結合劑，例如Cas9，或編碼經RNA引導之DNA結合劑的mRNA，例如編碼Cas9之mRNA。靶向*SERPINA1*基因之引導序列展示於表1中之SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129處。本文所述之實驗中所用的對照引導物顯示於SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:4處。

表1：所靶向之*SERPINA1*及對照引導序列命名法、染色體座標及序列

SEQ ID No	引導物ID	描述	染色體座標	引導序列
1	CR001261	對照物1	Chr1:55039269-55039291	GCCAGACUCCAAGUUCUGCC
2	CR001262	對照物 2	Chr1:55039155-55039177	UAAGGCCAGUGGAAAGAAUU
3	CR001263	對照物3	Chr1:55039180-55039202	GGCAGCGAGGAGUCCACAGU
4	CR001264	對照物4	Chr1:55039149-55039171	UCUUUCCACUGGCCUUAACC
5	CR001367	外顯子2	Chr14:94383211-94383233	CAAUGCCGUCUUCUGUCUCG
6	CR001368	外顯子2	Chr14:94383210-94383232	AAUGCCGUCUUCUGUCUCGU
7	CR001369	外顯子2	Chr14:94383209-94383231	AUGCCGUCUUCUGUCUCGUG
8	CR001370	外顯子2	Chr14:94383206-94383228	AUGCCCCACGAGACAGAAGA
9	CR001371	外顯子2	Chr14:94383195-94383217	CUCGUGGGGCAUCCUCCUGC
10	CR001372	外顯子2	Chr14:94383152-94383174	GGAUCCUCAGCCAGGGAGAC
11	CR001373	外顯子2	Chr14:94383146-94383168	UCCCUGGCUGAGGAUCCCCA
12	CR001374	外顯子2	Chr14:94383145-94383167	UCCCUGGGGAUCCUCAGCCA
13	CR001375	外顯子2	Chr14:94383144-94383166	CUCCCUGGGGAUCCUCAGCC
14	CR001376	外顯子2	Chr14:94383115-94383137	GUGGGAUGUAUCUGUCUUCU
15	CR001377	外顯子2	Chr14:94383114-94383136	GGUGGGAUGUAUCUGUCUUC
16	CR001378	外顯子2	Chr14:94383105-94383127	AGAUACAUCCCACCAUGAUC
17	CR001379	外顯子2	Chr14:94383097-94383119	UGGGUGAUCCUGAUCAUGGU
18	CR001380	外顯子2	Chr14:94383096-94383118	UUGGGUGAUCCUGAUCAUGG
19	CR001381	外顯子2	Chr14:94383093-94383115	AGGUUGGGUGAUCCUGAUCA
20	CR001382	外顯子2	Chr14:94383078-94383100	GGGUGAUCUUGUUGAAGGUU
21	CR001383	外顯子2	Chr14:94383077-94383099	GGGGUGAUCUUGUUGAAGGU
22	CR001384	外顯子2	Chr14:94383069-94383091	CAACAAGAUCACCCCCAACC
23	CR001385	外顯子2	Chr14:94383057-94383079	AGGCGAACUCAGCCAGGUUG
24	CR001386	外顯子2	Chr14:94383055-94383077	GAAGGCGAACUCAGCCAGGU
25	CR001387	外顯子2	Chr14:94383051-94383073	GGCUGAAGGCGAACUCAGCC
26	CR001388	外顯子2	Chr14:94383037-94383059	CAGCUGGCGGUAUAGGCUGA
27	CR001389	外顯子2	Chr14:94383036-94383058	CUUCAGCCUAUACCGCCAGC
28	CR001390	外顯子2	Chr14:94383030-94383052	GGUGUGCCAGCUGGCGGUAU
29	CR001391	外顯子2	Chr14:94383021-94383043	UGUUGGACUGGUGUGCCAGC
30	CR001392	外顯子2	Chr14:94383009-94383031	AGAUAUUGGUGCUGUUGGAC
31	CR001393	外顯子2	Chr14:94383004-94383026	GAAGAAGAUAUUGGUGCUGU
32	CR001394	外顯子2	Chr14:94382995-94383017	CACUGGGGAGAAGAAGAUAU
33	CR001395	外顯子2	Chr14:94382980-94383002	GGCUGUAGCGAUGCUCACUG
34	CR001396	外顯子2	Chr14:94382979-94383001	AGGCUGUAGCGAUGCUCACU
35	CR001397	外顯子2	Chr14:94382978-94383000	AAGGCUGUAGCGAUGCUCAC

SEQ ID No	引導物ID	描述	染色體座標	引導序列
36	CR001398	外顯子2	Chr14:94382928-94382950	UGACACUCACGAUGAAAUCC
37	CR001399	外顯子2	Chr14:94382925-94382947	CACUCACGAUGAAAUCCUGG
38	CR001400	外顯子2	Chr14:94382924-94382946	ACUCACGAUGAAAUCCUGGA
39	CR001401	外顯子2	Chr14:94382910-94382932	GGUUGAAAUUCAGGCCCUCC
40	CR001402	外顯子2	Chr14:94382904-94382926	GGGCCUGAAUUUCAACCUCA
41	CR001403	外顯子2	Chr14:94382895-94382917	UUUCAACCUCACGGAGAUUC
42	CR001404	外顯子2	Chr14:94382892-94382914	CAACCUCACGGAGAUUCCGG
43	CR001405	外顯子2	Chr14:94382889-94382911	GAGCCUCCGGAAUCUCCGUG
44	CR001406	外顯子2	Chr14:94382876-94382898	CCGGAGGCUCAGAUCCAUGA
45	CR001407	外顯子2	Chr14:94382850-94382872	UGAGGGUACGGAGGAGUUCC
46	CR001408	外顯子2	Chr14:94382841-94382863	CUGGCUGGUUGAGGGUACGG
47	CR001409	外顯子2	Chr14:94382833-94382855	CUGGCUGUCUGGCUGGUUGA
48	CR001410	外顯子2	Chr14:94382810-94382832	CUCCAGCUGACCACCGGCAA
49	CR001411	外顯子2	Chr14:94382808-94382830	GGCCAUUGCCGGUGGUCAGC
50	CR001412	外顯子2	Chr14:94382800-94382822	GAGGAACAGGCCAUUGCCGG
51	CR001413	外顯子2	Chr14:94382797-94382819	GCUGAGGAACAGGCCAUUGC
52	CR001414	外顯子2	Chr14:94382793-94382815	CAAUGGCCUGUUCCUCAGCG
53	CR001415	外顯子2	Chr14:94382792-94382814	AAUGGCCUGUUCCUCAGCGA
54	CR001416	外顯子2	Chr14:94382787-94382809	UCAGGCCCUCGCUGAGGAAC
55	CR001417	外顯子2	Chr14:94382781-94382803	CUAGCUUCAGGCCCUCGCUG
56	CR001418	外顯子2	Chr14:94382778-94382800	CAGCGAGGGCCUGAAGCUAG
57	CR001419	外顯子2	Chr14:94382769-94382791	AAAACUUAUCCACUAGCUUC
58	CR001420	外顯子2	Chr14:94382766-94382788	GAAGCUAGUGGAUAAGUUUU
59	CR001421	外顯子2	Chr14:94382763-94382785	GCUAGUGGAUAAGUUUUUGG
60	CR001422	外顯子2	Chr14:94382724-94382746	UGACAGUGAAGGCUUCUGAG
61	CR001423	外顯子2	Chr14:94382716-94382738	AAGCCUUCACUGUCAACUUC
62	CR001424	外顯子2	Chr14:94382715-94382737	AGCCUUCACUGUCAACUUCG
63	CR001425	外顯子2	Chr14:94382713-94382735	GUCCCCGAAGUUGACAGUGA
64	CR001426	外顯子2	Chr14:94382703-94382725	CAACUUCGGGGACACCGAAG
65	CR001427	外顯子2	Chr14:94382689-94382711	GAUCUGUUUCUUGGCCUCUU
66	CR001428	外顯子2	Chr14:94382680-94382702	GUAAUCGUUGAUCUGUUUCU
67	CR001429	外顯子2	Chr14:94382676-94382698	GAAACAGAUCAACGAUUACG
68	CR001430	外顯子2	Chr14:94382670-94382692	GAUCAACGAUUACGUGGAGA
69	CR001431	外顯子2	Chr14:94382669-94382691	AUCAACGAUUACGUGGAGAA
70	CR001432	外顯子2	Chr14:94382660-94382682	UACGUGGAGAAGGGUACUCA

SEQ ID No	引導物ID	描述	染色體座標	引導序列
71	CR001433	外顯子2	Chr14:94382659-94382681	ACGUGGAGAAGGGUACUCAA
72	CR001434	外顯子2	Chr14:94382643-94382665	UCAAGGGAAAAUUGUGGAUU
73	CR001435	外顯子2	Chr14:94382637-94382659	GAAAAUUGUGGAUUUGGUCA
74	CR001436	外顯子2	Chr14:94382607-94382629	CAGAGACACAGUUUUUGCUC
75	CR001437	外顯子3	Chr14:94381127-94381149	UCCCCUCUCUCCAGGCAAAU
76	CR001438	外顯子3	Chr14:94381098-94381120	CUCGGUGUCCUUGACUUCAA
77	CR001439	外顯子3	Chr14:94381097-94381119	CUUUGAAGUCAAGGACACCG
78	CR001440	外顯子3	Chr14:94381080-94381102	CACGUGGAAGUCCUCUUCCU
79	CR001441	外顯子3	Chr14:94381079-94381101	CGAGGAAGAGGACUUCCACG
80	CR001442	外顯子3	Chr14:94381073-94381095	AGAGGACUUCCACGUGGACC
81	CR001443	外顯子3	Chr14:94381064-94381086	CGGUGGUCACCUGGUCCACG
82	CR001444	外顯子3	Chr14:94381058-94381080	GGACCAGGUGACCACCGUGA
83	CR001445	外顯子3	Chr14:94381055-94381077	GCACCUUCACGGUGGUCACC
84	CR001446	外顯子3	Chr14:94381047-94381069	CAUCAUAGGCACCUUCACGG
85	CR001447	外顯子3	Chr14:94381036-94381058	GUGCCUAUGAUGAAGCGUUU
86	CR001448	外顯子3	Chr14:94381033-94381055	AUGCCUAAACGCUUCAUCAU
87	CR001449	外顯子3	Chr14:94381001-94381023	UGGACAGCUUCUUACAGUGC
88	CR001450	外顯子3	Chr14:94380995-94381017	CUGUAAGAAGCUGUCCAGCU
89	CR001451	外顯子3	Chr14:94380974-94380996	GGUGCUGCUGAUGAAAUACC
90	CR001452	外顯子3	Chr14:94380973-94380995	GUGCUGCUGAUGAAAUACCU
91	CR001453	外顯子3	Chr14:94380956-94380978	AGAUGGCGGUGGCAUUGCCC
92	CR001454	外顯子3	Chr14:94380945-94380967	AGGCAGGAAGAAGAUGGCGG
93	CR001474	外顯子5	Chr14:94378611-94378633	GGUCAGCACAGCCUUAUGCA
94	CR001475	外顯子5	Chr14:94378581-94378603	AGAAAGGGACUGAAGCUGCU
95	CR001476	外顯子5	Chr14:94378580-94378602	GAAAGGGACUGAAGCUGCUG
96	CR001477	外顯子5	Chr14:94378565-94378587	UGCUGGGGCCAUGUUUUUAG
97	CR001478	外顯子5	Chr14:94378557-94378579	GGGUAUGGCCUCUAAAAACA
98	CR001483	外顯子5	Chr14:94378526-94378548	UGUUGAACUUGACCUCGGGG
99	CR001484	外顯子5	Chr14:94378521-94378543	GGGUUUGUUGAACUUGACCU
100	CR003190	外顯子2	Chr14:94383131-94383153	UUCUGGGCAGCAUCUCCCUG
101	CR003191	外顯子2	Chr14:94383129-94383151	UCUUCUGGGCAGCAUCUCCC
102	CR003196	外顯子2	Chr14:94383024-94383046	UGGACUGGUGUGCCAGCUGG
103	CR003204	外顯子2	Chr14:94382961-94382983	AGCCUUUGCAAUGCUCUCCC
104	CR003205	外顯子2	Chr14:94382935-94382957	UUCAUCGUGAGUGUCAGCCU
105	CR003206	外顯子2	Chr14:94382901-94382923	UCUCCGUGAGGUUGAAAUUC

SEQ ID No	引導物ID	描述	染色體座標	引導序列
106	CR003207	外顯子2	Chr14:94382822-94382844	GUCAGCUGGAGCUGGCUGUC
107	CR003208	外顯子2	Chr14:94382816-94382838	AGCCAGCUCCAGCUGACCAC
108	CR003217	外顯子3	Chr14:94380942-94380964	AUCAGGCAGGAAGAAGAUGG
109	CR003218	外顯子3	Chr14:94380938-94380960	CAUCUUCUUCCUGCCUGAUG
110	CR003219	外顯子3	Chr14:94380937-94380959	AUCUUCUUCCUGCCUGAUGA
111	CR003220	外顯子3	Chr14:94380881-94380903	CGAUAUCAUCACCAAGUUCC
112	CR003221	外顯子4	Chr14:94379554-94379576	CAGAUCAUAGGUUCCAGUAA
113	CR003222	外顯子4	Chr14:94379507-94379529	AUCACUAAGGUCUUCAGCAA
114	CR003223	外顯子4	Chr14:94379506-94379528	UCACUAAGGUCUUCAGCAAU
115	CR003224	外顯子4	Chr14:94379505-94379527	CACUAAGGUCUUCAGCAAUG
116	CR003225	外顯子4	Chr14:94379453-94379475	CUCACCUUGGAGAGCUUCAG
117	CR003226	外顯子4	Chr14:94379452-94379474	UCUCACCUUGGAGAGCUUCA
118	CR003227	外顯子4	Chr14:94379451-94379473	AUCUCACCUUGGAGAGCUUC
119	CR003235	外顯子5	Chr14:94378525-94378547	UUGUUGAACUUGACCUCGGG
120	CR003236	外顯子5	Chr14:94378524-94378546	UUUGUUGAACUUGACCUCGG
121	CR003237	外顯子5	Chr14:94378523-94378545	GUUUGUUGAACUUGACCUCG
122	CR003238	外顯子5	Chr14:94378522-94378544	GGUUUGUUGAACUUGACCUC
123	CR003240	外顯子5	Chr14:94378501-94378523	UCAAUCAUUAAGAAGACAAA
124	CR003241	外顯子5	Chr14:94378500-94378522	UUCAAUCAUUAAGAAGACAA
125	CR003242	外顯子5	Chr14:94378472-94378494	UACCAAGUCUCCCCUCUUCA
126	CR003243	外顯子5	Chr14:94378471-94378493	ACCAAGUCUCCCCUCUUCAU
127	CR003244	外顯子5	Chr14:94378463-94378485	UCCCCUCUUCAUGGGAAAAG
128	CR003245	外顯子5	Chr14:94378461-94378483	CACCACUUUUCCCAUGAAGA
129	CR003246	外顯子5	Chr14:94378460-94378482	UCACCACUUUUCCCAUGAAG

以上引導序列中之每一者可進一步包含其他核苷酸以形成crRNA，例如在引導序列之3'端後具有以下例示性核苷酸序列：GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO:140)。在sgRNA之情況下，以上引導序列可進一步包含其他核苷酸以形成sgRNA，例如在引導序列之3'端後具有以下例示性核苷酸序列：呈5'至3'定位之GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID

NO:141)。

在一些實施例中，sgRNA經修飾。在一些實施例中，經修飾之sgRNA包含表2中所列舉之序列(SEQ ID NO:130至SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:408及SEQ ID NO:410至SEQ ID NO:421)中之任一者。在表2中，「N」可為任何天然或非天然核苷酸。在一些實施例中，包含SEQ ID NO:130之組合物涵蓋在內，其中SEQ ID NO:130中之各N共同地經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列置換，其中保留SEQ ID NO:130中所示之修飾模式。

在一些實施例中，包含SEQ ID NO:410之組合物涵蓋在內，其中SEQ ID NO:410中之各N共同地經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列置換，其中保留SEQ ID NO:410中所示之修飾模式。

在一些實施例中，包含SEQ ID NO:411之組合物涵蓋在內，其中SEQ ID NO:411中之各N共同地經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列置換，其中保留SEQ ID NO:411中所示之修飾模式。

在一些實施例中，包含SEQ ID NO:412之組合物涵蓋在內，其中SEQ ID NO:412中之各N共同地經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列置換，其中保留SEQ ID NO:412中所示之修飾模式。

在一些實施例中，包含SEQ ID NO:413之組合物涵蓋在內，其中SEQ ID NO:413中之各N共同地經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列置換，其中保留SEQ ID NO:413中所示之修飾模式。

在一些實施例中，包含SEQ ID NO:414之組合物涵蓋在內，其中SEQ ID NO:414中之各N共同地經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列置換，其中保留SEQ ID NO:414中所示之修飾模式。

在一些實施例中，包含SEQ ID NO:415之組合物涵蓋在內，其中SEQ ID NO:415中之各N共同地經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列置換，其中保留SEQ ID NO:415中所示之修飾模式。

在一些實施例中，包含SEQ ID NO:416之組合物涵蓋在內，其中SEQ ID NO:416中之各N共同地經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列置換，其中保留SEQ ID NO:416中所示之修飾模式。

在一些實施例中，包含SEQ ID NO:417之組合物涵蓋在內，其中SEQ ID NO:417中之各N共同地經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列置換，其中保留SEQ ID NO:417中所示之修飾模式。

在一些實施例中，包含SEQ ID NO:418之組合物涵蓋在內，其中SEQ ID NO:418中之各N共同地經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列置換，其中保留SEQ ID NO:418中所示之修飾模式。

在一些實施例中，包含SEQ ID NO:419之組合物涵蓋在內，其中SEQ ID NO:419中之各N共同地經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列置換，其中保留SEQ ID NO:419中所示之修飾模式。

在一些實施例中，包含SEQ ID NO:420之組合物涵蓋在內，其中SEQ ID NO:420中之各N共同地經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列置換，其中保留SEQ ID NO:420中所示之修飾模式。

在一些實施例中，包含SEQ ID NO:421之組合物涵蓋在內，其中SEQ ID NO:421中之各N共同地經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列置換，其中保留SEQ ID NO:421中所示之修飾模式。

表2：經*SERPINA1*靶向之sgRNA

SEQ ID	sgRNA ID	描述	序列
130	僅修飾- N	sgRNA修飾序列	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
408	僅修飾	sgRNA修飾序列	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
131	G000407	sgRNA修飾序列	mA*mG*mC*CAGCUCCAGCUGACCACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
132	G000408	sgRNA修飾序列	mG*mC*mU*GAGGAACAGGCCAUUGCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
133	G000409	sgRNA修飾序列	mA*mC*mU*CACGAUGAAAUCCUGGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
134	G000410	sgRNA修飾序列	mU*mU*mG*GGUGAUCCUGAUCAUGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
135	G000411	sgRNA修飾序列	mU*mG*mG*GUGAUCCUGAUCAUGGUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmC

SEQ ID	sgRNA ID	描述	序列
			mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
136	G000412	sgRNA修飾序列	mG*mA*mU*CUGUUUCUUGGCCUCUUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
137	G000413	sgRNA修飾序列	mG*mA*mA*GGCGAACUCAGCCAGGUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
138	G000414	sgRNA修飾序列	mC*mA*mA*CCUCACGGAGAUUCCGGGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
139	G000415	sgRNA修飾序列	mU*mG*mU*UGGACUGGUGUGCCAGCGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
410	G000537/G211-33 (僅修飾)	5'端 3xOMePS	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmUmUmUmU
411	G000538/G211-34 (僅修飾)	3'端 3xOMePS	mNmNmNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
412	G000539/G211-35 (僅	5xOMePS	mN*mN*mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNGUUU UAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUU

SEQ ID	sgRNA ID	描述	序列
	修飾)		AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG*mC*mU*mU*mU*mU
413	G000541/G211-37 (僅修飾)	3xOMePS+2PS	mN*mN*mN*N*N*NNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG*mC*mU*mU*mU*mU
414	G000542/G211-38 (僅修飾)	3xOMePS+7PS	mN*mN*mN*N*N*N*N*N*N*N*NNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU*mC*mG*mG*mU*mG*mC*mU*mU*mU*mU
415	G000543/G211-39 (僅修飾)	invd無鹼基	(invd) NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU(invd)
416	G000544/G211-40 (僅修飾)	invd無鹼基+ 3xOMePS	(invd)mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG*mU*mU*mU*mU(invd)
417	G000564/G211-42 (僅修飾)	3xMOE-PS	moeN*moeN*moeN*NNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmoeU*moeU*moeU*mU
418	G000545/G211-43 (僅修飾)	US環PS	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmA*mG*mA*mA*mA*mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmG

SEQ ID	sgRNA ID	描述	序列
			mUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
419	G000546/G211-44 (僅修飾)	H1環PS	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU*mG*mA*mA*mA*mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
420	G000547/G211-45 (僅修飾)	H2環PS	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG*mA*mG*mU*mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
421	G000548/G211-46 (僅修飾)	所有環PS	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmA*mG*mA*mA*mA*mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU*mG*mA*mA*mA*mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG*mA*mG*mU*mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

* = PS鍵；'m' = 2'-O-Me核苷酸

除非另外說明，否則如本文所用之以下術語及片語意欲具有以下含義：

「聚核苷酸」及「核酸」在本文中意指包含核苷或具有沿主鏈連接在一起的含氮雜環鹼基或鹼基類似物之核苷類似物的多聚化合物，其包括習知RNA、DNA、混合RNA-DNA及為其類似物之聚合物。核酸「主鏈」可由多個鍵組成，其包括糖-磷酸二酯鍵、肽-核酸鍵(「肽核酸」或PNA；PCT第WO 95/32305號)、硫代磷酸酯鍵、膦酸甲酯鍵或其組合中之一或多者。核酸之糖部分可為核糖、去氧核糖或具有取代，例如2'甲氧基或2'鹵基取代之類似化合物。含氮鹼基可為習知鹼基(A、G、C、T、U)；其類似物(例如經修飾之尿苷，諸如5-甲氧基尿苷、假尿苷或N1-甲基假尿苷或其他)；肌核苷；嘌呤或嘧啶之衍生物(例如N4-甲基脫氧鳥苷、

脫氮或氮雜嘌呤、脫氮或氮雜嘧啶、在5或6位處具有取代基之嘧啶鹼基(例如5-甲基胞嘧啶)、在2、6或8位處具有取代基之嘌呤鹼基、2-胺基-6-甲胺基嘌呤、O6-甲基鳥嘌呤、4-硫基-嘧啶、4-胺基-嘧啶、4-二甲基肼-嘧啶及O4-烷基-嘧啶；美國專利第5,378,825號及PCT第WO 93/13121號)。對於一般論述，參見The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36, Adams等人編, 第11版, 1992。核酸可包括一或多種「無鹼基」殘基，其中主鏈不包括針對聚合物位置之含氮鹼基(美國專利第5,585,481號)。核酸可僅包含習知RNA或DNA糖、鹼基及鍵，或可包括習知組分及取代兩者(例如具有2'甲氧基鍵之習知鹼基或含有習知鹼基及一或多個鹼基類似物兩者的聚合物)。核酸包括「鎖定核酸」(LNA)、含有一或多種LNA核苷酸單體之類似物，該等單體具有模擬糖構形之鎖定於RNA中的雙環呋喃醣單元，其會增強對互補RNA及DNA序列之雜交親和性(Vester及Wengel, 2004, Biochemistry 43(42):13233-41)。RNA及DNA具有不同糖部分且可藉由在RNA中存在尿嘧啶或其類似物及在DNA中存在胸腺嘧啶或其類似物而有所不同。

「引導RNA」、「gRNA」及簡稱「引導物」在本文中互換使用來意指crRNA (亦稱為CRISPR RNA)或crRNA與trRNA (亦稱為tracrRNA)之組合任一者。crRNA及trRNA可以單一RNA分子(單引導RNA，sgRNA)或以兩個獨立RNA分子(雙引導RNA，dgRNA)形式締合。「引導RNA」或「gRNA」或「引導物」係指各類型。trRNA可為天然存在之序列或與天然存在之序列相比具有修飾或變化之trRNA序列。

如本文所用，「引導序列」係指引導RNA中與靶序列互補且用以藉由經RNA引導之DNA結合劑將引導RNA導引至靶序列以供結合或修飾(例

如裂解)的序列。「引導序列」亦可稱為「靶序列」或「間隔序列」。引導序列之長度可為20個鹼基對，例如，在針對釀膿鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 (亦即Spy Cas9)及相關Cas9同源物/直系同源物之引導RNA的情況下。較短或較長序列亦可用作引導物，例如長度為15、16、17、18、19、21、22、23、24或25個核苷酸。在一些實施例中，靶序列處於例如基因中或染色體上，且與引導序列互補。在一些實施例中，引導序列與其相應靶序列之間的互補性或一致性之程度可為約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些實施例中，引導序列與標靶區可為100%互補或一致的。在其他實施例中，引導序列與標靶區可含有至少一個錯配。舉例而言，引導序列及靶序列可含有1、2、3或4個錯配，其中靶序列之總長度為至少17、18、19、20或大於20個鹼基對。在一些實施例中，引導序列及標靶區可含有1至4個錯配，其中引導序列包含至少17、18、19、20或大於20個核苷酸。在一些實施例中，引導序列及標靶區可含有1、2、3或4個錯配，其中引導序列包含20個核苷酸。

針對Cas蛋白質之靶序列包括染色體組DNA之正鏈及負鏈兩者(亦即給定序列及該序列之反向互補序列)，因為Cas蛋白質之核酸受質為雙鏈核酸。因此，在論述引導序列「與靶序列互補」之情況下，應理解，引導序列可導引引導RNA結合至靶序列之反向互補序列。因此，在一些實施例中，在引導序列結合靶序列之反向互補序列之情況下，引導序列與靶序列(例如不包括PAM之靶序列)之某些核苷酸相同，不同之處在於引導序列中U取代T。

如本文所用，「經RNA引導之DNA結合劑」意謂具有RNA及DNA結

合活性之多肽或多肽複合物，或此類複合物之DNA結合次單位，其中DNA結合活性具有序列特異性且視RNA之序列而定。經RNA引導之DNA結合劑包括Cas蛋白質(例如Cas9蛋白質)，諸如Cas核酸酶(例如Cas9核酸酶)。如本文所用，「Cas核酸酶」亦稱作「Cas蛋白質」，其涵蓋Cas裂解酶、Cas切口酶及其不活化形式(「dCas DNA結合劑」)。Cas蛋白質進一步涵蓋III型CRISPR系統之Csm或Cmr複合物、其Cas10、Csm1或Cmr2次單位、I型CRISPR系統之級聯複合物、其Cas3次單位及2類Cas核酸酶。如本文所用，「2類Cas核酸酶」為具有經RNA引導之DNA結合活性的單鏈多肽，諸如Cas9核酸酶或Cpf1核酸酶。2類Cas核酸酶包括2類Cas裂解酶/切口酶(例如H840A、D10A或N863A變異體)，其進一步具有經RNA引導之DNA裂解酶或切口酶活性，及2類dCas DNA結合劑，其中裂解酶/切口酶活性未活化。2類Cas核酸酶包括例如Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、HF Cas9（例如N497A/R661A/Q695A/Q926A變異體）、HypaCas9（例如N692A/M694A/Q695A/H698A變異體）、eSPCas9(1.0)（例如K810A/K1003A/R1060A變異體）及eSPCas9(1.1)（例如K848A/K1003A/R1060A變異體)蛋白質及其變體。Cpf1蛋白質(Zetsche等人, Cell, 163: 1-13 (2015))與Cas9同源且含有RuvC樣核酸酶域。Zetsche等人之Cpf1序列以全文引用之方式併入。參見例如，Zetsche等人，表S1及表S3。「Cas9」涵蓋Spy Cas9、本文中所列的Cas9之變異體及其等效物。參見例如，Makarova等人, Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36 (2015)；Shmakov等人, Molecular Cell, 60:385-397 (2015)。

如本文所用，若第一序列與第二序列之比對顯示整個第二序列之X%或更多之位置與第一序列相匹配，則該第一序列視為「包含與第二序列具

有至少X%一致性的序列」。舉例而言，序列AAGA包含與序列AAG具有100%一致性之序列，因為與第二序列之全部三個位置均出現匹配，所以比對結果為100%一致性。RNA與DNA之間的差異(通常而言，尿苷更換為胸苷或反之亦然)及核苷類似物(諸如經修飾之尿苷)的存在不會造成聚核苷酸之間一致性或互補性的差異，只要相關核苷酸(諸如胸苷、尿苷或經修飾之尿苷)具有相同互補序列(例如針對胸苷、尿苷或經修飾之尿苷均為腺苷；另一實例為胞嘧啶及5-甲基胞嘧啶，這兩者均以鳥苷或經修飾之鳥苷作為互補序列)即可。因此，舉例而言，序列5'-AXG (其中X為任何經修飾之尿苷，諸如假尿苷、N1-甲基假尿苷或5-甲氧基尿苷)視為與AUG具有100%一致性，因為兩者與同一序列(5'-CAU)完全互補。比對演算法實例為Smith-Waterman及Needleman-Wunsch演算法，其係此項技術中熟知者。熟習此項技術者應理解選擇何種演算法及參數設置才適合所要比對之一對指定序列；對於具有一般類似長度及預期胺基酸有>50%一致性或核苷酸有>75%一致性的序列而言，由EBI於www.ebi.ac.uk網站伺服器提供的Needleman-Wunsch演算法介面之具有默認設置(default settings)的Needleman-Wunsch演算法通常為合適的。

「mRNA」在本文中意指非DNA且包含可轉譯成多肽之開放閱讀框架的聚核苷酸(亦即可作為由核糖體及胺基醯化tRNA進行轉譯之受質)。mRNA可包含包括核糖殘基或其類似物，例如2'-甲氧基核糖殘基之磷酸酯-糖主鏈。在一些實施例中，mRNA磷酸酯-糖主鏈之糖基本上由核糖殘基、2'-甲氧基核糖殘基或其組合組成。通常而言，mRNA不含大量胸苷殘基(例如0個殘基或小於30、20、10、5、4、3或2個胸苷殘基；或小於10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.2%或

0.1%的胸苷含量)。mRNA可在其一些或全部尿苷位置處含有經修飾之尿苷。

如本文所用，「AAT」或「A1AT」係指α-1抗胰蛋白酶，其為*SERPINA1*基因之基因產物。

如本文所用，「AATD」或「A1AD」係指α-1抗胰蛋白酶缺乏症。AATD包含由*SERPINA1*中之多種不同遺傳性突變所引起的疾病及病症。AATD可意指表現降低之AAT含量、不表現AAT或表現突變或非功能性AAT之疾病。

適用於本文所述之引導RNA組合物及方法中的引導序列展示於表1中。

如本文所用，「 indel」係指由許多核苷酸組成之插入/缺失突變，該等核苷酸在核酸中之雙鏈斷裂(DSB)位點處進行插入或缺失。

如本文所用，「基因減弱(knockdown)」係指特定基因產物(例如蛋白質、mRNA或兩者)之表現降低。可藉由偵測由組織或細胞群(例如在血清或細胞培養基中)分泌之蛋白質或藉由偵測來自相關組織或細胞群的蛋白質之總細胞量，來量測蛋白質之基因減弱。用於量測mRNA之基因減弱的方法為已知者，且包括對自相關組織或細胞群分離之mRNA進行定序。在一些實施例中，「基因減弱」意指特定基因產物表現有一些損失，例如經轉錄之mRNA的量下降或由細胞群(包括活體內細胞群，諸如彼等出現在組織中者)表現或分泌的蛋白質之量下降。

如本文所用，「基因剔除」係指喪失細胞中特定蛋白質之表現。可藉由偵測由組織或細胞群(例如在血清或細胞培養基中)分泌的蛋白質之量或藉由偵測來自組織或細胞群的蛋白質之總細胞量來量測基因剔除。在一

些實施例中，本發明方法在一或多種細胞中(例如在細胞群，包括活體內細胞群，諸如彼等出現在組織中者)「基因剔除」AAT。在一些實施例中，基因剔除並非例如藉由indel導致形成突變AAT蛋白質，而是細胞中完全喪失AAT蛋白質之表現。

如本文所用，「突變AAT」係指與*SERPINA1*之野生型胺基酸序列(NCBI基因ID：5265；Ensembl：ENSG00000197249)相比，AAT之胺基酸序列發生變化的*SERPINA1*之基因產物(亦即AAT蛋白質)。

如本文所用，「突變*SERPINA1*」或「突變*SERPINA1*對偶基因」係指與野生型序列(NCBI基因ID：5265；Ensembl：ENSG00000197249)相比，*SERPINA1*之核苷酸序列發生變化的*SERPINA1*序列。

如本文所用，「核糖核蛋白」(RNP)或「RNP複合物」係指引導RNA及經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白質。在一些實施例中，引導RNA將經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas9引導至靶序列，且與經RNA引導之DNA結合劑雜交之引導RNA會裂解該靶序列。

如本文所用，「靶序列」係指靶基因中與gRNA之引導序列互補的核酸序列。靶序列與引導序列之相互作用導引經RNA引導之DNA結合劑結合，且在靶序列中潛在地鏈裂或裂解(視試劑活性而定)。

如本文所用，「治療」係指用於個體之疾病或病症的治療劑的任何投與或施用，且包括抑制疾病、遏制其發展、緩解疾病之一或多種症狀、治癒疾病或預防疾病之一或多種症狀的復發。舉例而言，AATD之治療可包含緩解AATD之症狀。

如本文所用，AAT之「Z突變體」、「Z型突變體」、「Z變異體」、「PiZ變異體」或「ZZ形式」係指*SERPINA1*基因序列中之突變，

其導致麩胺酸在AAT之胺基酸序列中誤義突變成離胺酸(E342K突變)。

術語「約」或「大約」意謂如由一般熟習此項技術者所測定的特定值之可接受誤差，其部分視如何量測或測定該值而定。

I. 組合物

A. 引導RNA (gRNA)

在一些實施例中，本發明包含一種包含一或多種引導RNA(gRNA)之組合物，該gRNA包含將經RNA引導之DNA結合劑(例如Cas9)導引至*SERPINA1*中之DNA靶序列的引導序列。gRNA可包含表1中所示的引導序列中之一或多者。表1之引導序列可進一步包含crRNA及/或trRNA。在本文所述之各組合物及方法實施例中，crRNA及trRNA可在一個RNA (sgRNA)上或可在獨立RNA (dgRNA)上締合。

在本文所述之組合物及方法實施例中之每一者中，引導RNA可包含呈「雙引導RNA」或「dgRNA」形式之兩個RNA分子。dgRNA包含含有引導序列之第一RNA分子(例如crRNA)及含有trRNA之第二RNA分子，該引導序列包含表1中所述之引導序列中之任一者。第一和第二RNA分子並非共價連接，但可經由crRNA與trRNA之各部分之間的鹼基配對形成RNA雙螺旋體。

在本文所述之組合物及方法實施例中之每一者中，引導RNA可包含呈「單引導RNA」或「sgRNA」形式之單一RNA分子。sgRNA包含與trRNA (或其部分)共價連接之crRNA (或其部分)，其包含表1中所述之引導序列中之任一者。在一些實施例中，crRNA與trRNA經由連接子共價連接。在一些實施例中，sgRNA經由crRNA與trRNA之各部分之間的鹼基配對形成莖環結構。

在一些實施例中，trRNA可包含來自天然存在之CRISPR/Cas系統的野生型trRNA序列之全部或一部分。在一些實施例中，trRNA包含經截短或經修飾之野生型trRNA。trRNA之長度視所用CRISPR/Cas系統而定。在一些實施例中，trRNA包含以下或由以下組成：5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100或大於100個核苷酸。在一些實施例中，trRNA可包含特定二級結構，諸如一或多種髮夾結構或莖環結構或一或多種隆突結構。

在一些實施例中，本發明包含一或多個引導RNA，其包含SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129中之任一者之引導序列。

在一個態樣中，本發明包含gRNA，其包含與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

在其他實施例中，組合物包含至少兩個gRNA，其包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列中之任何兩者或大於兩者之引導序列。在一些實施例中，組合物包含至少兩個gRNA，各gRNA與SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之核酸中之任一者具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性。

在一些實施例中，gRNA為包含表2中所示之序列(SEQ ID NO 130至SEQ ID NO 139、SEQ ID NO 408及SEQ ID NO 410至SEQ ID NO 421)中之任一者的sgRNA。在一些實施例中，sgRNA包含與SEQ ID NO 130至SEQ ID NO 139及SEQ ID NO 408之核酸中之任一者具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性的序列。在一些實施例中，在存在或不存在修飾下，sgRNA包含表1中所示之

引導序列中之任一者而不是表2之SEQ ID NO:130至SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:408及SEQ ID NO:410至SEQ ID NO:421處之sgRNA序列中所示之引導序列。

包含表2中所示的序列中之任一者的修飾的引導RNA涵蓋在內且藉由SEQ ID No在其中加以鑑別。亦即，核苷酸可以相同或不同，但所示修飾模式可與表2之gRNA的修飾模式相同或類似。修飾模式包括gRNA或gRNA之區的修飾的相對位置及一致性。在一些實施例中，修飾模式為與表2之序列欄中所示的序列中之任一者之修飾模式具有至少50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%一致性。在一些實施例中，修飾模式在0、1、2、3、4、5或6個核苷酸處與表2之序列或此類序列之區的修飾模式不同。在一些實施例中，gRNA包含在0、1、2、3、4、5或6個核苷酸處不同於表2之序列之修飾的修飾。

本發明之引導RNA組合物設計成識別*SERPINA1*基因中之靶序列。舉例而言，可藉由所提供的經RNA引導之DNA結合劑識別且裂解*SERPINA1*靶序列。在一些實施例中，可藉由引導RNA將Cas蛋白質導引至*SERPINA1*基因之靶序列，其中引導RNA之引導序列與靶序列雜交且Cas蛋白質裂解該靶序列。

在一些實施例中，一或多種引導RNA之選擇係基於*SERPINA1*基因中之靶序列而判定。

在不受特定理論束縛之情況下，基因之關鍵區處的突變可能要比基因之非關鍵區處的突變更不可容許，因此DSB之位置在可引起之蛋白質基因減弱或基因剔除的量或類型方面是重要因素。在一些實施例中，使用與*SERPINA1*中之靶序列互補或具有互補性的gRNA來將Cas蛋白質導引至

*SERPINA1*基因中之特定位置。在一典實施例中，gRNA設計成具有與*SERPINA1*之外顯子2、3、4或5中之靶序列互補或具有互補性的引導序列。

在一典實施例中，gRNA設計成與編碼AAT之N端區的*SERPINA1*之外顯子中的靶序列互補或具有互補性。

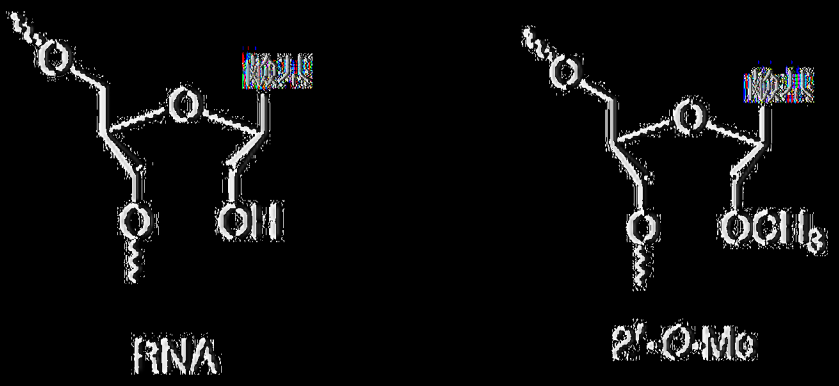
B. 經化學修飾之gRNA

在一典實施例中，本發明包含含有一或多種修飾之gRNA。在一典實施例中，修飾包含經2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾之核苷酸。在一典實施例中，修飾包含處於各核苷酸之間的硫代磷酸酯(PS)鍵。

咸信經修飾之糖控制核苷酸糖環之趨向，該趨向為影響寡核苷酸對於互補鏈之結合親和力、雙螺旋體形成及與核酸酶之相互作用的物理特性。糖環上之取代可因此改變此等糖之確認及趨向。舉例而言，2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾可增加寡核苷酸之結合親和力及核酸酶穩定性，但給定位置處之任何修飾在寡核苷酸中之作用需要憑經驗判定。

術語「mA」、「mC」、「mU」或「mG」可用於表示經2'-O-Me修飾之核苷酸。

2'-O-甲基之修飾可如下描繪：

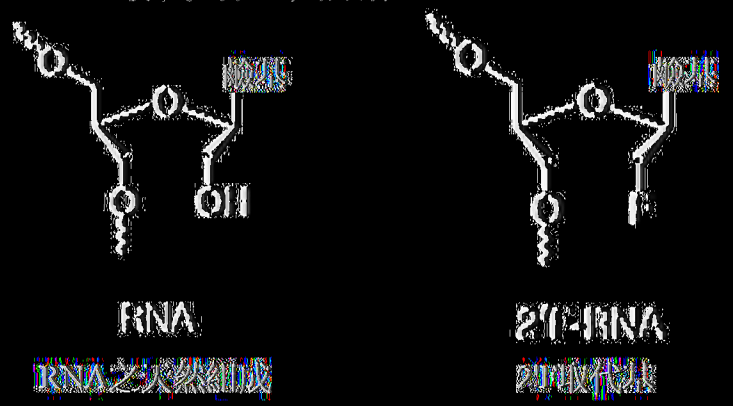


已顯示影響核苷酸糖環之另一化學修飾為鹵素取代。舉例而言，核苷酸糖環上之2'-氟基(2'-F)取代可增加寡核苷酸結合親和力及核酸酶穩定

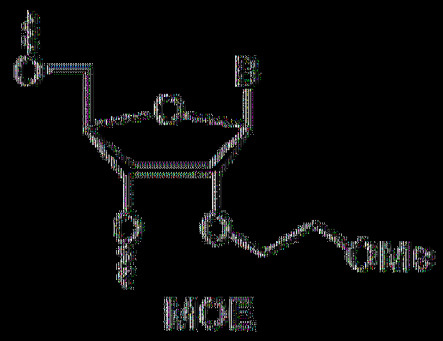
性。

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

2'-F之取代可如下描繪：



在一典實施例中，修飾可為2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-O-moe)。2'-O-moe核糖核苷酸形式之核糖核苷酸之修飾可如下描繪：



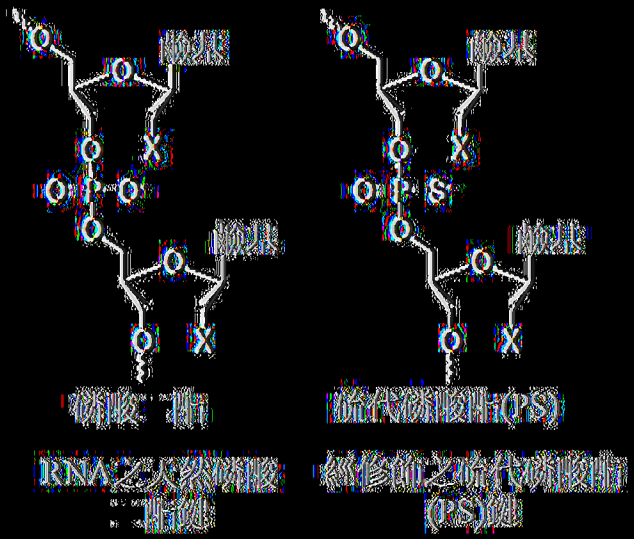
術語「mocA」、「mocC」、「mocU」或「mocG」可用於表示經2'-O-moc修飾之核苷酸。

硫代磷酸酯(PS)鍵(linkage/bond)係指硫取代磷酸二酯鍵，例如核苷酸鹼基之間的鍵中之一個非橋聯磷酸酯氧(nonbridging phosphate oxygen)的鍵。當硫代磷酸酯用於產生寡核苷酸時，經修飾之寡核苷酸亦可稱為S-寡核苷酸。

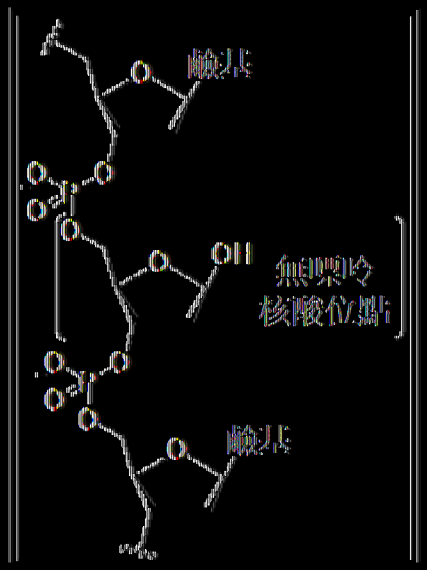
「*」可用於描繪PS修飾。在本申請案中，術語A*、C*、U*或G*可用於表示經PS鍵連接至後續(例如3')核苷酸之核苷酸。

在本申請案中，術語「mA*」、「mC*」、「mU*」或「mG*」可用於表示經2'-O-Me取代且經PS鍵連接至後續(例如3')核苷酸之核苷酸。

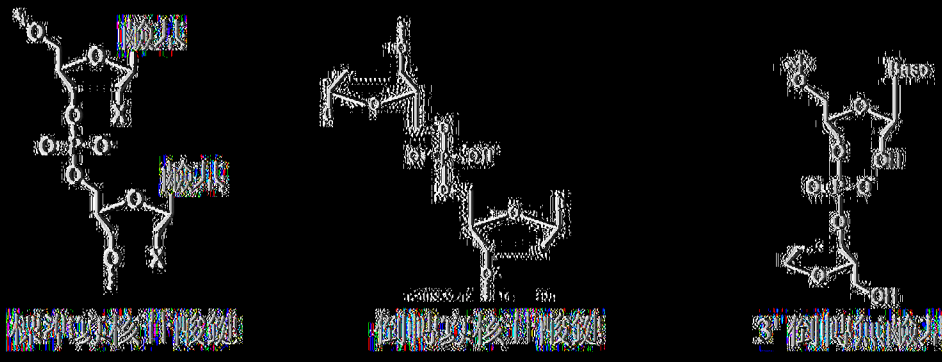
下圖顯示將S-取代為非橋聯磷酸酯氧，產生PS鍵來替代磷酸二酯鍵：



無鹼基核苷酸係指不具有含氮鹼基之彼等核苷酸。下圖描繪具有缺乏鹼基之無鹼基(亦稱為無嘌呤核酸)位點的寡核苷酸：



倒轉鹼基係指具有自正常5'至3'鍵倒轉之鍵(亦即5'至5'鍵或3'至3'鍵)之彼等鹼基。例如：



無鹼基核苷酸可附接有倒轉鍵。舉例而言，無鹼基核苷酸可經由5'至5'鍵附接至末端5'核苷酸，或無鹼基核苷酸可經由3'至3'鍵附接至末端3'核苷酸。末端5'或3'核苷酸任一者處之倒轉無鹼基核苷酸亦可稱作倒轉無鹼基端帽。

在一典實施例中，對5'末端之5'端處的前三個、四個或五個核苷酸中之一或多者及3'末端之3'端處的最後三個、四個或五個核苷酸中之一或多者進行修飾。在一典實施例中，修飾為2'-O-Me、2'-F、2'-O-moc、倒轉無鹼基核苷酸、PS鍵或此項技術中熟知的其他核苷酸修飾以增加穩定性及/或效能。

在一典實施例中，5'末端之5'端處的前四個核苷酸及3'末端之3'端處的最後四個核苷酸與硫代磷酸酯(PS)鍵連接。

在一典實施例中，5'末端之5'端處的前三個核苷酸及3'末端之3'端處的最後三個核苷酸包含經2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾之核苷酸。在一典實施例中，5'末端之5'端處的前三個核苷酸及3'末端之3'端處的最後三個核苷酸包含經2'-氟基(2'-F)修飾之核苷酸。在一典實施例中，5'末端之5'端處的前三個核苷酸及3'末端之3'端處的最後三個核苷酸包含倒轉無鹼基核苷酸。

在一典實施例中，引導RNA包含經修飾之sgRNA。在一典實施例中，sgRNA包含SEQ ID NO:130中所示之修飾模式，其中N為任何天然或

非天然核苷酸，且其中全部N均包含將經RNA引導之DNA結合劑(例如Cas9)導引至靶序列之引導序列。在一些實施例中，sgRNA包含SEQ ID NO:410至SEQ ID NO:421中之任一者中所示的修飾模式，其中N為任何天然或非天然核苷酸，且其中全部N均包含將經RNA引導之DNA結合劑(例如Cas9)導引至靶序列之引導序列。在一些實施例中，引導RNA包含SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139中之任一者中所示的sgRNA。在一些實施例中，引導RNA包含含有SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列中之任一者及SEQ ID NO:408之核苷酸的sgRNA，其中SEQ ID NO:408之核苷酸處於引導序列之3'端上，且其中引導序列可如SEQ ID NO:130中所示加以修飾。在一些實施例中，引導RNA包含含有SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列中之任一者及SEQ ID NO:141之核苷酸的sgRNA，其中SEQ ID NO:141之核苷酸處於引導序列之3'端上，且其中引導序列可如SEQ ID NO:130中所示加以修飾。

在一些實施例中，本文所揭示之引導RNA包含2016年12月8日申請之US 62/431,756及2017年12月8日申請的標題為「經化學修飾之引導RNA(Chemically Modified Guide RNAs)」之PCT/US17/65306中所揭示之修飾模式中之一者，其內容以全文引用之方式併入本文中。

C. 載體

在某些實施例中，本發明包含DNA載體，其包含含有本文所述之引導序列中之任一者或多者的引導RNA中之任一者。在一些實施例中，除了引導RNA序列以外，載體進一步包含不編碼引導RNA之核酸。不編碼引導RNA之核酸包括(但不限於)啟動子、強化子、調節序列及編碼經RNA引導之DNA結合劑(例如Cas9)之核酸。在一些實施例中，載體包含編碼

crRNA、trRNA或crRNA及trRNA之核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含編碼sgRNA之核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含編碼crRNA之核苷酸序列及編碼Cas蛋白質，諸如Cas9之mRNA。在一些實施例中，載體包含編碼crRNA、trRNA之核苷酸序列及編碼Cas蛋白質，諸如Cas9之mRNA。在一些實施例中，載體包含編碼sgRNA之核苷酸序列及編碼Cas蛋白質，諸如Cas9之mRNA。在一個實施例中，Cas9來自釀膿鏈球菌(亦即Spy Cas9)。在一些實施例中，編碼crRNA、trRNA或crRNA及trRNA之核苷酸序列包含或由以下組成：藉由來自天然存在之CRISPR/Cas系統的重複序列之全部或一部分側接的引導序列。包含或由crRNA、trRNA或crRNA及trRNA組成的核酸可進一步構成載體序列，其中該載體序列包含或由以下組成：不會與crRNA、trRNA或crRNA及trRNA一起經天然發現的核酸。

在一些實施例中，crRNA及trRNA由一個載體中之非連續核酸編碼。在其他實施例中，crRNA及trRNA可由連續核酸編碼。在一些實施例中，crRNA及trRNA由單一核酸之相對鏈編碼。在其他實施例中，crRNA及trRNA由單一核酸之相同鏈編碼。

D. 核糖核蛋白複合物

在一些實施例中，包含一或多個gRNA之組合物涵蓋在內，該等gRNA包含來自表1或表2之一或多個引導序列及經RNA引導之DNA結合劑(例如Cas9)。在一些實施例中，gRNA連同諸如Cas9之DNA結合劑稱作核糖核蛋白複合物(RNP)。在一些實施例中，經RNA引導之DNA結合劑為Cas蛋白質。在一些實施例中，gRNA連同Cas蛋白質稱作Cas RNP。在一些實施例中，RNP包含I型、II型或III型組分。在一些實施例中，Cas蛋

白質係來自I型CRISPR/Cas系統。在一些實施例中，Cas蛋白質係來自II型CRISPR/Cas系統。在一些實施例中，Cas蛋白質係來自III型CRISPR/Cas系統。在一些實施例中，Cas蛋白質為Cas9。在一些實施例中，Cas蛋白質為Cpf1。在一些實施例中，Cas蛋白質為來自II型CRISPR/Cas系統之Cas9蛋白質。在一些實施例中，gRNA連同Cas9稱作Cas9 RNP。

在涵蓋Cas核酸酶之實施例中，Cas核酸酶可來自IIA型、IIB型或IIC型系統。可衍生出Cas核酸酶或其他RNP組分的非限制性例示性物種包括釀膿鏈球菌、嗜熱鏈球菌(*Streptococcus thermophilus*)、鏈球菌屬(*Streptococcus sp.*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、無害李氏菌(*Listeria innocua*)、加氏乳桿菌(*Lactobacillus gasseri*)、新兇手弗朗西斯氏菌(*Francisella novicida*)、產琥珀酸沃廉菌(*Wolinella succinogenes*)、華德薩特菌(*Sutterella wadsworthensis*)、γ-變形菌(*Gammaproteobacterium*)、腦膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、空腸彎曲桿菌(*Campylobacter jejuni*)、多殺性巴氏桿菌(*Pasteurella multocida*)、產琥珀酸絲狀桿菌(*Fibrobacter succinogene*)、深紅紅螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)、達松維爾擬諾卡氏菌(*Nocardiopsis dassonvillei*)、始旋鏈黴菌(*Streptomyces pristinaespiralis*)、產綠色鏈黴菌(*Streptomyces viridochromogenes*)、產綠色鏈黴菌、玫瑰鏈孢囊菌(*Streptosporangium roseum*)、玫瑰鏈孢囊菌、酸熱脂環桿菌(*Alicyclobacillus acidocaldarius*)、假蕈狀芽孢桿菌(*Bacillus pseudomycoides*)、砷還原芽孢桿菌(*Bacillus selenitireducens*)、西伯利亞微小桿菌(*Exiguobacterium sibiricum*)、戴白氏乳桿菌(*Lactobacillus*

delbrueckii)、唾液乳桿菌(*Lactobacillus salivarius*)、布氏乳桿菌(*Lactobacillus buchneri*)、齒垢密螺旋體(*Treponema denticola*)、海洋微顫菌(*Microscilla marina*)、伯克霍爾德氏細菌(*Burkholderiales bacterium*)、食萘極單胞菌(*Polaromonas naphthalenivorans*)、極單胞菌屬(*Polaromonas sp.*)、瓦氏鱷球藻(*Crocosphaera watsonii*)、藍絲菌屬(*Cyanothece sp.*)、綠膿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、聚球藻屬(*Synechococcus sp.*)、阿拉伯糖醋桿菌(*Acetohalobium arabaticum*)、丹氏製氨菌(*Ammonifex degensii*)、熱解纖維素菌(*Caldicelulosiruptor becscii*)、金礦菌候選種(*Candidatus Desulforudis*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、艱難梭菌(*Clostridium difficile*)、大芬戈爾德菌(*Finegoldia magna*)、嗜熱鹽鹼厭氧菌(*Natranaerobius thermophilus*)、熱丙酸鹽暗色厭氧香腸狀菌(*Pelotomaculum thermopropionicum*)、喜溫嗜酸硫桿菌(*Acidithiobacillus caldus*)、氧化亞鐵嗜酸硫桿菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、酒色異著色菌(*Allochromatium vinosum*)、海桿菌屬(*Marinobacter sp.*)、嗜鹽亞硝化球菌(*Nitrosococcus halophilus*)、瓦氏亞硝化球菌(*Nitrosococcus watsoni*)、遊海假交替單胞菌(*Pseudoalteromonas haloplanktis*)、消旋纖線桿菌(*Ktedonobacter racemifer*)、調查甲烷鹽菌(*Methanohalobium evestigatum*)、多變念珠藻(*Anabaena variabilis*)、泡沫節球藻(*Nodularia spumigena*)、念珠藻屬(*Nostoc sp.*)、極大節旋藻(*Arthrospira maxima*)、鈍頂節旋藻(*Arthrospira platensis*)、節旋藻屬(*Arthrospira sp.*)、鞘絲藻屬(*Lyngbya sp.*)、原型微鞘藻(*Microcoleus chthonoplastes*)、顫藻屬(*Oscillatoria sp.*)、運動石袍菌(*Petrotoga mobilis*)、非洲高熱桿菌

(*Thermosipho africanus*)、巴氏鏈球菌(*Streptococcus pasteurianus*)、灰色奈瑟氏菌(*Neisseria cinerea*)、紅嘴鷗曲桿菌(*Campylobacter lari*)、食清潔劑細小棒菌(*Parvibaculum lavamentivorans*)、白喉棒狀桿菌(*Corynebacterium diphtheria*)、胺基酸球菌屬(*Acidaminococcus sp.*)、毛螺科菌 ND2006 (*Lachnospiraceae bacterium* ND2006)及海洋藻青菌(*Acaryochloris marina*)。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自釀膿鏈球菌之Cas9蛋白質。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自嗜熱鏈球菌之Cas9蛋白質。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自腦膜炎奈瑟氏菌之Cas9蛋白質。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自金黃色葡萄球菌之Cas9蛋白質。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自新兇手弗朗西斯氏菌之Cpf1蛋白質。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自胺基酸球菌屬之Cpf1蛋白質。在一些實施例中，Cas核酸酶為來自毛螺科菌ND2006之Cpf1蛋白質。

野生型Cas9具有兩個核酸酶域：RuvC及HNH。RuvC域裂解非靶DNA鏈，且HNH域裂解靶DNA鏈。在一些實施例中，Cas9蛋白質包含多於一個RuvC域及/或多於一個HNH域。在一些實施例中，Cas9蛋白質為野生型Cas9。在組合物及方法實施例中之每一者中，Cas誘發靶DNA中發生雙鏈斷裂。

具有一個非活性催化域(RuvC或HNH任一者)之Cas9之經修飾形式被稱為「切口酶(nickase)」。切口酶僅切割靶DNA上之一個鏈，因此產生單鏈斷裂。單鏈斷裂亦可稱為「鏈裂」。在一些實施例中，組合物及方法包括切口酶。在一些實施例中，組合物及方法包括在靶DNA中誘發鏈裂而非雙鏈斷裂之切口酶Cas9。

在一些實施例中，Cas蛋白質可經修飾以僅含有一個功能核酸酶域。

舉例而言，Cas蛋白質可經修飾以使得核酸酶域中之一者經突變或完全或部分缺失以降低其核酸裂解活性。在一些實施例中，使用具有活性降低之RuvC域之切口酶Cas。在一些實施例中，使用具有非活性RuvC域之切口酶Cas。在一些實施例中，使用具有活性降低之HNH域之切口酶Cas。在一些實施例中，使用具有非活性HNH域之切口酶Cas。

在一些實施例中，Cas蛋白質核酸酶域中之保守胺基酸經取代以降低或改變核酸酶活性。在一些實施例中，Cas蛋白質可在RuvC或RuvC樣核酸酶域中包含胺基酸取代。RuvC或RuvC樣核酸酶域中之例示性胺基酸取代包括D10A（基於釀膿鏈球菌Cas9蛋白質）。參見例如，Zetsche等人(2015) Cell Oct 22:163(3): 759-771。在一些實施例中，Cas蛋白質可在HNH或HNH樣核酸酶域中包含胺基酸取代。HNH或HNH樣核酸酶域中之例示性胺基酸取代包括E762A、H840A、N863A、H983A及D986A(基於釀膿鏈球菌Cas9蛋白質)。參見例如，Zetsche等人 (2015)。

在一些實施例中，本文所述之RNP複合物包含切口酶及一對分別與靶序列之有義股及反義股互補之引導RNA。在此實施例中，引導RNA將切口酶導引至靶序列且藉由在靶序列之相對鏈上產生鏈裂而引入DSB(亦即雙鏈裂)。在一些實施例中，使用雙鏈裂可改良特異性且減少脫靶效應。在一些實施例中，連同靶向DNA之相對鏈之兩個獨立引導RNA使用切口酶Cas以在靶DNA中產生雙鏈裂。在一些實施例中，連同經選擇以非常接近之兩個獨立引導RNA使用切口酶Cas以在靶DNA中產生雙鏈裂。

在一些實施例中，使用嵌合Cas蛋白質，其中該蛋白質之一個域或區經不同蛋白質之一部分替代。在一些實施例中，Cas核酸酶域可經來自諸如Fok1之不同核酸酶的域替代。在一些實施例中，Cas蛋白質可為經修飾

之核酸酶。

在其他實施例中，Cas蛋白質可來自I型CRISPR/Cas系統。在一些實施例中，Cas蛋白質可為I型CRISPR/Cas系統之級聯複合物之組分。在一些實施例中，Cas蛋白質可為Cas3蛋白質。在一些實施例中，Cas蛋白質可來自III型CRISPR/Cas系統。在一些實施例中，Cas蛋白質可具有RNA裂解活性。

E. gRNA功效之測定

在一些實施例中，當與RNP之其他組分一起表現時，測定gRNA之功效。在一些實施例中，gRNA與Cas一起表現。在一些實施例中，gRNA在已穩定地表現Cas之細胞株中表現。

使用Cas RNP系統可引起DNA中發生雙鏈斷裂。非同源末端連接(NHEJ)為一種以下方法，藉由該方法，DNA中之雙鏈斷裂(DSB)經由重新連接斷裂末端而得到修補，其可能會產生呈插入/缺失(indel)突變形式之錯誤。在重新連接末端之前，DSB之DNA末端常常已經歷酶處理，其引起在一或兩個鏈處添加或移除核苷酸。重新連接之前的此等添加或移除引起DNA序列中NHEJ修復位點處存在插入或缺失(indel)突變。歸因於indel之多種突變會改變閱讀框架或過早地引入終止密碼子，且因此產生非功能性蛋白質。

在一些實施例中，特定gRNA之功效係基於活體外模型而判定。在一些實施例中，活體外模型為穩定地表現Cas9之HEK293細胞(HEK293_Cas9)。在一些實施例中，活體外模型為HUH7人類肝癌細胞。在一些實施例中，活體外模型為sk-Hep人類肝腺癌細胞。在一些實施例中，活體外模型為原生人類肝細胞。在一些實施例中，活體外模型為

HepG2細胞。

在一些實施例中，在針對gRNA選擇過程的多個活體外細胞模型中測定特定引導序列之功效。在一些實施例中，進行具有所選gRNA之資料的細胞株比較。在一些實施例中，在多個細胞模型中進行交叉篩選。

在一些實施例中，藉由*SERPINA1*之編輯百分比量測引導RNA之功效。在一些實施例中，對*SERPINA1*之編輯百分比與對照基因(例如gRNA不靶向之基因)之編輯百分比進行比較。在一些實施例中，對照基因為如表1中所示之對照物1、2、3或4。在一些實施例中，編輯百分率(例如「編輯效率」或「編輯百分比」)定義為相對於序列讀段總數(包括野生型)之具有插入/缺失(「indel」)或取代的序列讀段之總數。在一些實施例中，引導RNA具有為約100%之編輯百分比。在一些實施例中，編輯百分比為在例如5%與10%之間、10%與15%之間、15%與20%之間、20%與25%之間、30%與35%之間、35%與40%之間、40%與45%之間、45%與50%之間、50%與55%之間、55%與60%之間、60%與65%之間、65%與70%之間、70%與75%之間、75%與80%之間、80%與85%之間、85%與90%之間、90%與95%之間或95%與99%之間。

在一些實施例中，本文所述之方法及組合物包含脫靶裂解有所降低之引導RNA。在一些實施例中，不存在可偵測之脫靶裂解。在一些實施例中，在*SERPINA1*基因中，核苷酸之缺失或插入的發生要比在脫靶位點處多至少50倍或大於50倍。在一些實施例中，在*SERPINA1*基因中，核苷酸之缺失或插入的發生要比在脫靶位點處多50倍至150倍、150倍至500倍、500倍至1500倍、1500倍至5000倍、5000倍至15000倍、15000倍至30000倍或30000倍至60000倍。

在一些實施例中，引導RNA之功效係藉由AAT之分泌量測。在一些實施例中，使用具有培養基之酶聯免疫吸附分析法(ELISA)分析來量測AAT之分泌。在一些實施例中，在用於測量編輯之同一活體外系統中量測AAT之分泌。在一些實施例中，在原生人類肝細胞中量測AAT之分泌。在一些實施例中，在HUH7細胞中量測AAT之分泌。

在一些實施例中，細胞中的AAT之量量測出gRNA之功效。在一些實施例中，使用西方墨點法來量測細胞中的AAT之量。在一些實施例中，所用細胞為HUH7細胞。在一些實施例中，對AAT之量與甘油醛3-磷酸脫氫酶GAPDH(管家基因)之量進行比較以控制細胞數目變化。

II. AATD之治療

在一些實施例中，提供一種誘發*SERPINA1*基因中發生雙鏈斷裂(DSB)之方法，該方法包括投與引導RNA，其包含SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之任一或多個引導序列，或SEQ ID NO:130至SEQ ID NO:139之sgRNA中之任一者或多者。在一些實施例中，投與包含SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列中之任一者或多者的gRNA以誘發*SERPINA1*基因中發生DSB。引導RNA可與經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白質，諸如Cas9，或編碼經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白質，諸如Cas9的mRNA或載體一起投與。在一些實施例中，所投與之引導RNA為本文所述之引導RNA組合物中之一或多者。

在一些實施例中，提供一種修飾*SERPINA1*基因之方法，該方法包括投與引導RNA，其包含SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列中之任一者或多者，或SEQ ID NO:130至SEQ ID NO:139之sgRNA中之任一者或多者。在一些實施例中，投與包含SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之

引導序列中之任一者或多者的gRNA或SEQ ID NO:130至SEQ ID NO:139之sgRNA中之任一者或多者以修飾*SERPINA1*基因。引導RNA可與Cas蛋白質或編碼Cas蛋白質，諸如Cas9之mRNA或載體一起投與。

在一些實施例中，提供一種治療AATD之方法，該方法包括投與引導RNA，其包含SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列中之任一者或多者，或SEQ ID NO:130至SEQ ID NO:139之sgRNA中之任一者或多者。在一些實施例中，投與包含SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列中之任一者或多者的gRNA或SEQ ID NO:130至SEQ ID NO:139之sgRNA中之任一者或多者以治療AATD。引導RNA可與Cas蛋白質或編碼Cas蛋白質，諸如Cas9之mRNA或載體一起投與。

在一些實施例中，提供一種減少或防止AAT在個體之血清、肝臟、肝臟組織、肝臟細胞及/或肝細胞中積聚的方法，該方法包括投與引導RNA，其包含SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列中之任一者或多者，或SEQ ID NO:130至SEQ ID NO:139之sgRNA中之任一者或多者。在一些實施例中，投與包含SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列中之任一者或多者的gRNA或SEQ ID NO:130至SEQ ID NO:139之sgRNA中之任一者或多者以減少或防止AAT在肝臟、肝臟組織、肝臟細胞及/或肝細胞中積聚。gRNA可與經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白質，或編碼Cas蛋白質，諸如Cas9之mRNA或載體一起投與。

在一些實施例中，包含表1或表2之引導序列的gRNA與Cas蛋白質一起誘發DSB，且修復期間之非同源末端連接(NHEJ)會引起*SERPINA1*基因中發生突變。在一些實施例中，NHEJ引起核苷酸缺失或插入，其誘發*SERPINA1*基因中發生框移或無意義突變。

在一些實施例中，投與本發明之引導RNA(例如以本文所提供之組合物形式)會降低由個體產生的經突變α-1抗胰蛋白酶(AAT)之含量，且因此防止AAT在肝臟中積聚及聚集。

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

在一些實施例中，提供使用包含表1或表2中之引導序列中之任一者或多者的引導RNA(例如以本文所提供之組合物形式)以用於製備供用於治療患有AATD之人類個體的藥劑。

在一些實施例中，靜脈內投與引導RNA、組合物及調配物。在一些實施例中，將引導RNA、組合物及調配物投與至肝循環中。

在一些實施例中，單次投與本發明之引導RNA(例如以本文所提供之組合物形式)對於突變蛋白質之基因減弱為足夠的。在一些實施例中，單次投與本發明之引導RNA(例如以本文所提供之組合物形式)對於突變蛋白質之基因減弱或剔除表現為足夠的。在其他實施例中，多於一次投與本發明之引導RNA(例如以本文所提供之組合物形式)對於經由累積作用使編輯最大化可為有益的。

在一些實施例中，在遞送之後1年、2年、3年、4年、5年或10年會看到使用本發明組合物之處理的功效。

在一些實施例中，治療會減緩或中斷肝病進展。在一些實施例中，治療會改良肝病量測結果。在一些實施例中，藉由個體中之肝臟結構變化、肝功能或症狀量測肝病。

在一些實施例中，藉由延遲或避免在個體中進行肝臟移植來量測治療功效。在一些實施例中，藉由增加個體之存活時間來量測治療功效。

在一些實施例中，藉由降低血液中之肝酶來量測治療功效。在一些實施例中，肝酶為丙胺酸轉胺酶(ALT)或天冬胺酸轉胺酶(AST)。

在一些實施例中，藉由基於活組織檢查結果減緩在肝臟中產生疤痕組織或減少疤痕組織來量測治療功效。

在一些實施例中，使用經患者報導之結果，諸如疲勞、無力、瘙癢、食慾不振、體重減輕、噁心或腹脹來量測治療功效。藉由減少水腫、腹水或黃疸來量測治療功效。在一些實施例中，藉由減少門靜脈高血壓來量測治療功效。在一些實施例中，藉由降低肝癌率來量測治療功效。

在一些實施例中，使用成像方法來量測治療功效。在一些實施例中，成像方法為超音波、電腦斷層攝影術、磁共振成像法或彈性成像。

在一些實施例中，相較於投與組合物之前的血清及/或肝臟AAT含量，血清及/或肝臟AAT含量降低40%至50%、50%至60%、60%至70%、70%至80%、80%至90%、90%至95%、95%至98%、98%至99%或99%至100%。

在一些實施例中，*SERPINA1*基因之編輯百分比在30%與99%之間。在一些實施例中，編輯百分比在30%與35%之間、35%與40%之間、40%與45%之間、45%與50%之間、50%與55%之間、55%與60%之間、60%與65%之間、65%與70%之間、70%與75%之間、75%與80%之間、80%與85%之間、85%與90%之間、90%與95%之間或95%與99%之間。

A. 組合療法

在一些實施例中，本發明包含組合療法，其包含含有表1中所揭示之引導序列中之任一者或多者的gRNA中之任一者或表2中之sgRNA中之任一者或多者(例如呈本文所提供之組合物形式)及適用於緩解AATD之肺症

狀的增強療法。在一些實施例中，針對肺病之增強療法為利用自人類血漿純化之AAT的靜脈內療法，如Turner, *BioDrugs 2013 Dec;27(6):547-58* 中所述。在一些實施例中，增強療法利用Prolastin®、Zemaira®、Aralast®或Kamada®。

在一些實施例中，組合療法包含含有表1中所揭示之引導序列中之任一者或多者的gRNA中之任一者或表2中之sgRNA中之任一者或多者(例如呈本文所提供之組合物形式)及靶向ATT或突變ATT之siRNA。在一些實施例中，siRNA為能夠進一步減少或消除野生型或突變AAT之表現的任何siRNA。在一些實施例中，在包含表1中所揭示之引導序列中之任一者或多者的gRNA中之任一者或表2中之sgRNA中之任一者或多者(例如呈本文所提供之組合物形式)之後投與siRNA。在一些實施例中，在用本文所提供之gRNA組合物中之任一者處理之後定期投與siRNA。

B. gRNA之遞送

單獨的或編碼於一或多種載體上的本文所述之引導RNA組合物調配於脂質奈米粒子中或經由脂質奈米粒子投與；參見例如2017年3月30日申請的標題為「CRISPR/CAS組分之脂質奈米粒子調配物(LIPID NANOPARTICLE FORMULATIONS FOR CRISPR/CAS COMPONENTS)」之PCT/US2017/024973，其內容以全文引用之方式併入本文中。熟習此項技術者已知的能夠將核苷酸遞送至個體的任何脂質奈米粒子(LNP)調配物可與本文所述之引導RNA、以及編碼經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas或Cas9的mRNA或經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas或Cas9蛋白質本身任一者一起利用。

在一些實施例中，本發明包含一種向個體遞送本文所揭示之gRNA中

之任一者之方法，其中gRNA與LNP締合。在一些實施例中，gRNA/LNP亦與經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas9，或編碼經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas9的mRNA締合。

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

在一些實施例中，LNP包含陽離子脂質。在一些實施例中，LNP包含脂質，諸如CCD脂質，諸如脂質A (十八-9,12-二烯酸(9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯，亦稱作(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯酸3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯)、脂質B (((5-((二甲胺基)甲基)-1,3-伸苯基)雙(氧基))雙(辛烷-8,1-二基)雙(癸酸酯)，亦稱作((5-((二甲胺基)甲基)-1,3-伸苯基)雙(氧基))雙(辛烷-8,1-二基)雙(癸酸酯))、脂質C (2-((4-(((3-(二甲胺基)丙氧基)羰基)氧基)十六醯基)氧基)丙烷-1,3-二基(9Z,9'Z, 12Z, 12'Z)-雙(十八-9, 12-二烯酸酯))或脂質D (3-辛基十一烷酸-(((3-(二甲胺基)丙氧基)羰基)氧基)-13-(辛醯氧基)十三烷酯)。在一些實施例中，LNP包含約4.5之陽離子脂質胺與RNA磷酸酯之莫耳比(N:P)。

在一些實施例中，與本文所揭示之gRNA締合的LNP供用於製備用於治療AATD之藥劑。在一些實施例中，與本文所揭示之gRNA締合的LNP供用於製備用於減少或防止AAT在患有AATD之個體中積聚及聚集的藥劑。在一些實施例中，與本文所揭示之gRNA締合的LNP供用於製備用於降低血清及/或肝臟AAT濃度之藥劑。在一些實施例中，與本文所揭示之gRNA締合的LNP供用於治療個體，諸如哺乳動物，例如靈長類動物(諸如

人類)中之AATD。在一些實施例中，與本文所揭示之gRNA締合的LNP供用於減少或防止AAT在患有AATD之個體，諸如哺乳動物，例如靈長類動物(諸如人類)中積聚及聚集。在一些實施例中，與本文所揭示之gRNA締合的LNP供用於降低個體，諸如哺乳動物，例如靈長類動物(諸如人類)中之血清AAT濃度。

電致孔為遞送負荷之熟知手段，且任何電致孔方法可用於遞送本文所揭示之gRNA中之任一者。在一些實施例中，電致孔可用於遞送本文所揭示之gRNA中之任一者及經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas9，或編碼經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas9之mRNA。

在一些實施例中，本發明包含一種向離體細胞遞送本文所揭示之gRNA中之任一者之方法，其中gRNA與LNP締合或不與LNP締合。在一些實施例中，gRNA/LNP或gRNA亦與經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas9，或編碼經RNA引導之DNA劑，諸如Cas9的mRNA締合。

在某些實施例中，本發明包含DNA或RNA載體，其編碼包含本文所述之引導序列中之任一者或多者的引導RNA中之任一者。在某些實施例中，本發明包含編碼本文所述之引導序列中之任一者或多者的DNA或RNA載體。在一些實施例中，除了引導RNA序列以外，載體進一步包含不編碼引導RNA之核酸。不編碼引導RNA之核酸包括(但不限於)啟動子、強化子、調節序列及編碼經RNA引導之DNA結合劑(其可為核酸酶，諸如Cas9)之核酸。在一些實施例中，載體包含一或多個編碼crRNA、trRNA或crRNA及trRNA之核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含一或多個編碼sgRNA之核苷酸序列及編碼經RNA引導之DNA結合劑之mRNA，該經RNA引導之DNA結合劑可為Cas蛋白質，諸如Cas9或Cpf1。在一些實施

例中，載體包含一或多個編碼crRNA、trRNA之核苷酸序列及編碼經RNA引導之DNA結合劑之mRNA，該經RNA引導之DNA結合劑可為Cas蛋白質，諸如Cas9或Cpf1。在一個實施例中，Cas9來自釀膿鏈球菌(亦即Spy Cas9)。在一些實施例中，編碼crRNA、trRNA或crRNA及trRNA(其可為sgRNA)之核苷酸序列包含或由以下組成：藉由來自天然存在之CRISPR/Cas系統的重複序列之全部或一部分側接的引導序列。包含或由crRNA、trRNA或crRNA及trRNA組成的核酸可進一步構成載體序列，其中該載體序列包含或由以下組成：不會與crRNA、trRNA或crRNA及trRNA一起經天然發現的核酸。

在一些實施例中，crRNA及trRNA由一個載體中之非連續核酸編碼。在其他實施例中，crRNA及trRNA可由連續核酸編碼。在一些實施例中，crRNA及trRNA由單一核酸之相對鏈編碼。在其他實施例中，crRNA及trRNA由單一核酸之相同鏈編碼。

在一些實施例中，載體可為環狀。在其他實施例中，載體可為線性。在一些實施例中，載體可包封於脂質奈米粒子、脂質體非脂質奈米粒子或病毒衣殼中。非限制性例示性載體包括質體、噬質體、黏質體、人工染色體、袖珍染色體、轉座子、病毒載體及表現載體。

在一些實施例中，載體可為病毒載體。在一些實施例中，病毒載體可由其野生型對應物遺傳修飾。舉例而言，病毒載體可包含一或多種核苷酸之插入、缺失或取代以促進選殖或使得載體之一或多個特性發生變化。此類特性可包括包裝容量、轉導效率、免疫原性、基因組整合、複製、轉錄及轉譯。在一些實施例中，病毒基因組之一部分可缺失以使得病毒能夠包裝具有較大尺寸之外源性序列。在一些實施例中，病毒載體可具有經增

強之轉導效率。在一些實施例中，宿主中藉由病毒誘發之免疫反應可有所減少。在一些實施例中，促進將病毒序列整合至宿主基因組中的病毒基因(諸如整合酶)可經突變以使得病毒變成非整合性的。在一些實施例中，病毒載體可為複製缺陷型。在一些實施例中，病毒載體可包含外源性轉錄或轉譯控制序列以驅動載體上的編碼序列之表現。在一些實施例中，病毒可為輔助依賴型。舉例而言，病毒可需要一或多種輔助病毒來供給所需病毒組分(諸如病毒蛋白)以擴增載體且將載體包裝於病毒粒子中。在此情況下，可將一或多種輔助組分，包括一或多個編碼該等病毒組分之載體引入至宿主細胞以及本文所述之載體系統中。在其他實施例中，病毒可不含輔助病毒。舉例而言，病毒可能夠擴增及包裝載體而不需要任何輔助病毒。在一些實施例中，本文所述之載體系統亦可編碼病毒擴增及包裝所需的病毒組分。

非限制性例示性病毒載體包括腺相關病毒(AAV)載體、慢病毒載體、腺病毒載體、輔助依賴型腺病毒載體(HDAd)、單純疱疹病毒(HSV-1)載體、噬菌體T4、桿狀病毒載體及反轉錄病毒載體。在一些實施例中，病毒載體可為AAV載體。在一些實施例中，病毒載體為AAV2、AAV3、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAVrh.64R1、AAVhu.37、AAVrh.8、AAVrh.32.33、AAV8、AAV9、AAVrh10或AAVLK03。在其他實施例中，病毒載體可為慢病毒載體。

在一些實施例中，慢病毒可為非整合性的。在一些實施例中，病毒載體可為腺病毒載體。在一些實施例中，腺病毒可為高選殖容量或「無腸(gutless)」腺病毒，其中除5'及3'倒轉末端重複序列(ITR)及包裝信號(『I』)之外的所有病毒編碼區從病毒中被刪除以增加其包裝容量。在又

其他實施例中，病毒載體可為HSV-1載體。在一些實施例中，HSV-1類載體為輔助依賴型，且在其他實施例中，其為非輔助依賴型。舉例而言，僅保留包裝序列之擴增子載體需要具有結構性組分之輔助病毒用於包裝，而移除非必需病毒功能的缺失30kb之HSV-1載體不需要輔助病毒。在其他實施例中，病毒載體可為噬菌體T4。在一些實施例中，當清空病毒頭時，噬菌體T4可能夠包裝任何直鏈或環狀DNA或RNA分子。在其他實施例中，病毒載體可為桿狀病毒載體。在又其他實施例中，病毒載體可為反轉錄病毒載體。在使用具有較小選殖容量之AAV或慢病毒載體之實施例中，可能需要使用多於一個載體以遞送如本文所揭示之載體系統的全部組分。舉例而言，一個AAV載體可含有編碼經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白質(例如Cas9)之序列，而第二AAV載體可含有一或多個引導序列。

在一些實施例中，載體可能夠驅動細胞中一或多個編碼序列之表現。在一些實施例中，細胞可為原核細胞，諸如細菌細胞。在一些實施例中，細胞可為真核細胞，諸如酵母、植物、昆蟲或哺乳動物細胞。在一些實施例中，真核細胞可為哺乳動物細胞。在一些實施例中，真核細胞可為嚙齒動物細胞。在一些實施例中，真核細胞可為人類細胞。驅動不同類型細胞中之表現的適合啟動子為此項技術中已知的。在一些實施例中，啟動子可為野生型。在其他實施例中，啟動子可經修飾以供較高效或較有效表現。在又其他實施例中，啟動子可經截短但仍保留其功能。舉例而言，啟動子可具有正常尺寸或適用於將載體適當包裝於病毒中的減小之尺寸。

在一些實施例中，載體可包含編碼本文所述之經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白質(例如Cas9)的核苷酸序列。在一些實施例中，藉由

載體編碼之核酸酶可為Cas蛋白質。在一些實施例中，載體系統可包含一個編碼核酸酶之核苷酸序列的複本。在其他實施例中，載體系統可包含多於一個編碼核酸酶之核苷酸序列的複本。在一些實施例中，編碼核酸酶之核苷酸序列可與至少一個轉錄或轉譯控制序列可操作地連接。在一些實施例中，編碼核酸酶之核苷酸序列可與至少一個啟動子可操作地連接。

在一些實施例中，啟動子可為組成性、誘導性或組織特異性的。在一些實施例中，啟動子可為組成性啟動子。非限制性例示性的組成性啟動子包括細胞巨大病毒即刻早期啟動子(CMV)、猴病毒(SV40)啟動子、腺病毒主要晚期啟動子(MLP)、勞斯肉瘤病毒(RSV)啟動子、小鼠乳腺腫瘤病毒(MMTV)啟動子、磷酸甘油酸激酶(PGK)啟動子、延長因子-α (EF1a)啟動子、泛素啟動子、肌動蛋白啟動子、微管蛋白啟動子、免疫球蛋白啟動子、其功能性片段或前述中之任一者之組合。在一些實施例中，啟動子可為CMV啟動子。在一些實施例中，啟動子可為經截短之CMV啟動子。在其他實施例中，啟動子可為EF1a啟動子。在一些實施例中，啟動子可為誘導性啟動子。非限制性例示性的誘導性啟動子包括可藉由熱衝擊、光、化學物質、肽、金屬、類固醇、抗生素或醇誘導之誘導性啟動子。在一些實施例中，誘導性啟動子可為具有低基礎(非經誘導)表現程度之一種誘導性啟動子，諸如Tet-On®啟動子(Clontech)。

在一些實施例中，啟動子可為組織特異性啟動子，例如對肝臟中之表現具有特異性的啟動子。

載體可進一步包含編碼本文所述之引導RNA的核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含引導RNA之一個複本。在其他實施例中，載體包含引導RNA之多於一個複本。在具有多於一個引導RNA之實施例中，引導

RNA可不同使得其靶向不同靶序列，或可相同以便其靶向相同靶序列。在其中載體包含多於一個引導RNA之一些實施例中，各引導RNA可具有其他不同特性，諸如在與經RNA引導之DNA核酸酶的複合物，諸如Cas RNP複合物中的活性或穩定性。在一些實施例中，編碼引導RNA之核苷酸序列可與至少一個轉錄或轉譯控制序列，諸如啟動子、3' UTR或5' UTR可操作地連接。在一個實施例中，啟動子可為tRNA啟動子，例如$tRNA^{Lys3}$，或tRNA嵌合體。參見Mefferd等人, *RNA*. 2015 21:1683-9；Scherer等人, *Nucleic Acids Res*. 2007 35: 2620-2628。在一些實施例中，啟動子可藉由RNA聚合酶III (Pol III)識別。Pol III啟動子之非限制性實例包括U6及H1啟動子。在一些實施例中，編碼引導RNA之核苷酸序列可與小鼠或人類U6啟動子可操作地連接。在其他實施例中，編碼引導RNA之核苷酸序列可與小鼠或人類H1啟動子可操作地連接。在具有多於一個引導RNA之實施例中，用於驅動表現之啟動子可相同或不同。在一些實施例中，編碼引導RNA之crRNA的核苷酸及編碼引導RNA之trRNA的核苷酸可提供於相同載體上。在一些實施例中，編碼crRNA之核苷酸及編碼trRNA之核苷酸可藉由同一啟動子驅動。在一些實施例中，crRNA及trRNA可轉錄為單一轉錄物。舉例而言，crRNA及trRNA可由單一轉錄物進行處理以形成雙分子引導RNA。或者，crRNA及trRNA可轉錄為單分子引導RNA (sgRNA)。在其他實施例中，crRNA及trRNA可藉由其處於相同載體上之相應啟動子來驅動。在又其他實施例中，crRNA及trRNA可藉由不同載體編碼。

在一些實施例中，編碼引導RNA之核苷酸序列可位於包含編碼經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白質的核苷酸序列之相同載體上。在

一些實施例中，引導RNA之表現及經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白質之表現可藉由其自身相應啟動子來驅動。在一些實施例中，引導RNA之表現可藉由驅動經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白質之表現的相同啟動子來驅動。在一些實施例中，引導RNA及經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白質轉錄物可包含於單一轉錄物中。舉例而言，引導RNA可處於經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白質轉錄物之未轉譯區(UTR)中。在一些實施例中，引導RNA可處於轉錄物之5' UTR中。在一些實施例中，引導RNA可處於轉錄物之3' UTR中。在一些實施例中，轉錄物之胞內半衰期可藉由在其3' UTR中含有引導RNA且藉此縮短其3' UTR之長度而降低。在其他實施例中，引導RNA可處於轉錄物之內含子中。在一些實施例中，可在引導RNA所處之內含子處添加適合剪接位點以使得自轉錄物恰當地剪接掉引導RNA。在一些實施例中，時間上緊鄰的來自相同載體的經RNA引導之DNA結合劑，諸如Cas蛋白質及引導RNA之表現可促進較高效形成CRISPR RNP複合物。

在一些實施例中，組合物包含載體系統。在一些實施例中，載體系統可包含一個單一載體。在其他實施例中，載體系統可包含兩個載體。在其他實施例中，載體系統可包含三個載體。當將不同引導RNA用於多工(multiplexing)時或當使用引導RNA之多個複本時，載體系統可包含多於三個載體。

在一些實施例中，載體系統可包含誘導性啟動子以僅在其遞送至靶細胞之後開始表現。非限制性例示性的誘導性啟動子包括可藉由熱衝擊、光、化學物質、肽、金屬、類固醇、抗生素或醇誘導之誘導性啟動子。在一些實施例中，誘導性啟動子可為具有低基礎(非經誘導)表現程度之一種

誘導性啟動子，諸如Tet-On®啟動子(Clontech)。

在其他實施例中，載體系統可包含組織特異性啟動子以僅在其遞送至特定組織中之後開始表現。

載體可藉由脂質體、奈米粒子、胞外體或微囊泡遞送。載體亦可藉由脂質奈米粒子(LNP)遞送。本文所述之LNP及LNP調配物中之任一者適用於遞送單獨的引導物或與Cas核酸酶或編碼Cas核酸酶之mRNA一起遞送。在一些實施例中，涵蓋一種包含以下之LNP組合物：RNA組分及脂質組分，其中脂質組分包含胺脂質、中性脂質、輔助脂質及隱形脂質；且其中N/P比為約1至10。

在一些情況下，脂質組分包含脂質A、膽固醇、DSPC及PEG-DMG；且其中N/P比為約1至10。在一些實施例中，脂質組分包含：約40至60 mol%胺脂質；約5至15 mol%中性脂質；及約1.5%至10 mol% PEG脂質，其中脂質組分之其餘部分為輔助脂質，且其中LNP組合物之N/P比為約3至10。在一些實施例中，脂質組分包含約50至60 mol%胺脂質；約8至10 mol%中性脂質；及約2.5%至4 mol% PEG脂質，其中脂質組分之其餘部分為輔助脂質，且其中LNP組合物之N/P比為約3至8。在一些情況下，脂質組分包含：約50至60 mol%胺脂質；約5至15 mol% DSPC；及約2.5%至4 mol% PEG脂質，其中脂質組分之其餘部分為膽固醇，且其中LNP組合物之N/P比為約3至8。在一些情況下，脂質組分包含：48至53 mol%脂質A；約8至10 mol% DSPC；及約1.5%至10 mol% PEG脂質，其中脂質組分之其餘部分為膽固醇，且其中LNP組合物之N/P比為3至8 ± 0.2。

在一些實施例中，可系統地遞送載體。在一些實施例中，載體可遞

送於肝循環中。

在一些實施例中，可系統地遞送載體。在一些實施例中，載體可遞送於肝循環中。

III. 特定實施例之敍述

在一些實施例中，本發明包含一種包含引導RNA之組合物，該引導RNA包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列。在一些情況下，提供一種包含引導RNA之組合物，該引導RNA包含與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

引導RNA可與人類*SERPINA1*基因中所存在之靶序列至少部分互補。

引導RNA可將核酸酶導引至處於人類*SERPINA1*基因之外顯子2、3、4或5中的靶序列。

在一些實施例中，引導RNA將核酸酶導引至處於人類*SERPINA1*基因之外顯子2中的靶序列。在一些情況下，靶向外顯子2之引導RNA選自CR001370、CR001373、CR001374、CR001376、CR001379、CR001380、CR001386、CR001386、CR003196、CR001391、CR003198、CR001395、CR001397、CR001400、CR001404、CR001405、CR003208、CR001409、CR001413、CR001421、CR001422及CR001427。

在一些實施例中，引導RNA將核酸酶導引至處於人類*SERPINA1*基因之外顯子3中的靶序列。在一些情況下，靶向外顯子3之引導RNA選自CR001450、CR003214、CR001453、CR001454及CR003217。

在一些實施例中，引導RNA將核酸酶導引至處於人類*SERPINA1*基因

之外顯子4中的靶序列。在一些情況下，靶向外顯子4之引導RNA選自CR003225及CR003226。

在一些實施例中，引導RNA將核酸酶導引至處於人類*SERPINA1*基因之外顯子5中的靶序列。在一些情況下，靶向外顯子5之引導RNA選自CR001475及CR001476。

在一些情況下，引導RNA為雙引導(dgRNA)。引導亦可為單引導RNA(sgRNA)。

在一些實施例中，本發明包含含有本文所揭示之引導序列中之任一者的crRNA，且其進一步包含SEQ ID NO:140之核苷酸序列，其中SEQ ID NO:140之核苷酸在引導序列之3'端後。在一些實施例中，雙引導RNA進一步包含trRNA。

在一些實施例中，本發明包含含有選自SEQ ID NO:130至SEQ ID NO:139或SEQ ID NO:408之序列的sgRNA。

在一些情況下，sgRNA包含與選自SEQ ID NO:130至SEQ ID NO:139或SEQ ID NO:408之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

本發明包含含有SEQ ID NO:130之核苷酸的sgRNA，其中N為任何天然或非天然核苷酸，且其中各N共同地形成使Cas9靶向*SERPINA1*基因之引導序列。

在一些實施例中，sgRNA包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129中之任一者的引導序列。

在一些實施例中，提供包含SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列中之任一者及SEQ ID NO:408之核苷酸的sgRNA。

在一些實施例中，在載體上編碼引導序列。在一些實施例中，引導RNA包含與*SERPINA1*之正鏈中的靶序列互補的引導序列。在一些實施例中，引導RNA包含與*SERPINA1*之負鏈中的靶序列互補的引導序列。

在一些實施例中，包含引導序列之引導RNA進一步包含第二引導序列，其中第一引導序列與*SERPINA1*基因之正鏈中的第一靶序列互補，且第二引導序列與*SERPINA1*基因之負鏈中的第二靶序列互補。

本發明之引導RNA可經修飾。在一些實施例中，修飾包含經2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾之核苷酸。在一些實施例中，修飾包含處於各核苷酸之間的硫代磷酸酯(PS)鍵。在一些實施例中，修飾包含經2'-氟基(2'-F)修飾之核苷酸。在一些實施例中，修飾包含倒轉無鹼基核苷酸。

在一些實施例中，在5’端前五個核苷酸中之一或多處進行修飾。在一些實施例中，在3’端最後五個核苷酸中之一或多處進行修飾。

在一些實施例中，修飾包含處於前四個核苷酸之間的PS鍵。在一些實施例中，修飾包含處於最後四個核苷酸之間的PS鍵。經PS修飾之引導物可進一步包含處於5’端前三個核苷酸處和3’端最後三個核苷酸處的經2'-O-Me修飾之核苷酸。

在一些實施例中，引導RNA包含經修飾之SEQ ID NO:408之核苷酸。

在一些實施例中，提供一種包含所述引導RNA中之任一者及醫藥學上可接受之賦形劑或載劑的組合物或調配物。

在一些實施例中，提供包含與脂質奈米粒子(LNP)締合的如本文所述之引導RNA的組合物。

組合物可進一步包含核酸酶蛋白質或編碼核酸酶之mRNA。

在一些實施例中，核酸酶為Cas。在一些實施例中，Cas為Cas9。在一些實施例中，Cas為Cpf1。在一些實施例中，核酸酶為切口酶。在一些實施例中，核酸酶經修飾。在一些實施例中，經修飾之核酸酶包含核定位信號(NLS)。

在一些實施例中，Cas係來自I型、II型或III型CRISPR/Cas系統。

在一些實施例中，提供一種誘發*SERPINA1*基因中發生雙鏈斷裂(DSB)之方法，該包含投與本文所述之引導RNA、組合物或調配物中之任一者或多者。

在一些實施例中，提供一種修飾*SERPINA1*基因之方法，該方法包括遞送Cas蛋白質或編碼Cas蛋白質之核酸及本文所述之引導RNA、組合物或調配物中之任一者或多者。

在一些實施例中，提供一種治療AATD之方法，該方法包括投與Cas蛋白質或編碼Cas蛋白質之核酸及本文所述之引導RNA、組合物或調配物中之任一者或多者，藉此治療AATD。

在一些實施例中，提供一種用於減少或防止AAT在個體之肝臟中積聚的方法，該方法包括投與Cas蛋白質或編碼Cas蛋白質之核酸及本文所述之引導RNA、組合物或調配物中之任一者或多者，藉此減少AAT在肝臟中積聚。

在一些實施例中，肝臟細胞中之ATT得到減少或阻止。在一些實施例中，肝臟細胞為肝細胞。

在一些方法及用途實施例中，個體患有AATD。

在一些實施例中，非同源末端連接(NHEJ)在修復*SERPINA1*基因中之DSB期間引起突變。在一些情況下，NHEJ在修復*SERPINA1*基因中之

DSB期間引起核苷酸缺失或插入。在一些實施例中，核苷酸之缺失或插入誘發*SERPINA1*基因中發生框移或無意義突變。

在一些實施例中，投與會降低α-1抗胰蛋白酶(AAT)之含量。可在血清、血漿、血液、大腦脊髓液或痰中量測AAT含量。可在肝臟組織中量測AAT之含量。

在一些方法及用途實施例中，個體為人類。人類個體可具有α-1抗胰蛋白酶缺乏症(AATD)。個體可具有AATD家族病史。個體可具有AATD之肝臟及肺症狀。個體可僅具有或主要具有AATD之肝臟症狀。

在一些實施例中，個體表現具有E342K突變之AAT。在一些實施例中，個體在SERPINA1基因座處具有至少一個Z對偶基因。在一些實施例中，個體在SERPINA1基因座處具有至少一個S對偶基因。在一些實施例中，個體之Z對偶基因在SERPINA1基因座處為同種接合的。在一些實施例中，個體之Z對偶基因在SERPINA1基因座處為異種接合的。在一些實施例中，個體在SERPINA1基因座處具有一個Z對偶基因及一個S對偶基因。

個體在AAT之胺基酸序列處可不具有E342K突變，但仍具有降低含量之野生型AAT。

在一些實施例中，在投與之後，個體之水腫、腹水或黃疸有所改善、穩定或減緩或對肝臟移植之需要有所延遲。在一些實施例中，在投與之後，如藉由成像方法或肝酶含量所量測，個體由於投藥而具有改善、穩定或減緩變化。

可經由病毒載體投與本文所述之引導物、組合物或醫藥調配物中之任一者。

可經由脂質奈米粒子投與本文所述之引導物、組合物或醫藥調配物中之任一者。

在一些實施例中，在投與引導物、組合物或調配物之前針對*SERPINA1*基因中之特定突變測試個體。

在一些實施例中，涵蓋本文所述之引導物、組合物或調配物中之任一者之用途，其用於製備供用於治療患有AATD之人類個體的藥劑。

本說明書及例示性實施例不應視為限制性的。出於本說明書及所附申請專利範圍之目的，除非另外指示，否則表示量、百分比或比例，及說明書及申請專利範圍中所用之其他數值的所有數目均應理解為在所有情況下藉由術語「約」修飾，程度為其尚未如此修飾。因此，除非有相反指示，否則本說明書及所附申請專利範圍中所闡述之數值參數為可視設法獲得之所需特性而變化的近似值。至少，且不試圖將均等論之應用限於申請專利範圍之範疇，各數值參數至少應根據所報導之有效數位之個數且藉由應用普通捨入技術來解釋。

應注意，如在本說明書及申請專利範圍中所用，除非明確地且肯定地限於一個指示物，否則單數形式「一(a/an)」與「該」及任何字語之任何單數使用包括複數個指示物。如本文所用，術語「包括」及其語法變體意欲為非限制性的，使得清單中之項之列舉不排除可取代或添加至所列項之其他類似項。

實例

提供以下實例以說明某些所揭示之實施例且不應理解為以任何方式限制本發明之範疇。

實例1-材料及方法

1. 核酸酶mRNA之活體外轉錄(「IVT」)

使用線性化質體DNA模板及T7 RNA聚合酶藉由活體外轉錄產生含有N1-甲基假-U之加帽及聚腺苷酸化釀膿鏈球菌(「Spy」) Cas9 mRNA。藉由與XbaI利用以下條件在37℃下培育2小時來線性化含有T7啟動子及100 nt聚(A/T)區之質體DNA：200 ng/μL質體、2 U/μL XbaI (NEB)及1×反應緩衝液。藉由在65℃下加熱反應20分鐘來滅活XbaI。使用二氧化矽最大自旋管柱(Epoch Life Sciences)自酶及緩衝鹽純化線性化質體且藉由瓊脂糖凝膠加以分析以證實線性化。用於產生經Cas9修飾之mRNA的IVT反應物在37℃下在以下條件下培育4小時：50 ng/μL線性化質體；2 mM之GTP、ATP、CTP及N1-甲基假-UTP (Trilink)中之每一者；10 mM ARCA (Trilink)；5 U/μL T7 RNA聚合酶(NEB)；1 U/μL鼠RNA酶抑制劑(NEB)；0.004 U/μL無機大腸桿菌焦磷酸酶(NEB)；及1×反應緩衝液。在培育4小時之後，添加TURBO DNA酶(ThermoFisher)至0.01 U/μL之最終濃度，且再培育反應物30分鐘以移除DNA模板。使用MegaClear轉錄清除套組根據製造商方案(ThermoFisher)自酶及核苷酸純化Cas9 mRNA。藉由量測260 nm處之光吸收(Nanodrop)測定轉錄物濃度，且藉由以Bioanlayzer (Agilent)進行毛細管泳法而分析轉錄物。

對於實例2及實例3中所述之實驗，使用包含SEQ ID NO:422之質體DNA模板來產生IVT Cas9 mRNA。對於實例4及實例5中所述之實驗，使用包含SEQ ID NO:423之質體DNA模板來產生IVT Cas9 mRNA。

實例2及實例3中所用的用於產生IVT mRNA之DNA序列(SEQ ID NO:422)：

TAATACGACTCACTATAGGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGGCTCTGC
TTGTTCGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCATCGATAAGAAGTACT





CCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGA
ACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGA
ACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAA
GTCCTGTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAG
AACATTATCCACTTGTTCACCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGT
ACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGA
CGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATCT
GTCGCAGCTGGGTGGCGATGGCGGTGGATCTCCGAAAAAGAAGAGAAAGGTGTA
ATGAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAA
AGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGC
CAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGT
GCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

實例4及實例5中所用的用於產生IVT mRNA之DNA序列(SEQ ID NO:423)：

TAATACGACTCACTATAGGGTCCGCCAGTCGGCCGTCCAGCGGCTCTGC
TTGTTCGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCATGGATAAGAAGTACT
CAATCGGGCTGGATTATCGGACTAATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATCACCGATG
AATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACA
GCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTCGACTCCGGCGAAACCGCCG
AAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCCGAGGCGACGCTACAGCGGCGGAAGAATC
GCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGAACGAAATCGCCAAGGTCGACGACA
GCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATG
AACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGT
ACGCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCG
ACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCGGACACTT
CCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATT
CAACTGGTTCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGAAAACCCCATTAACGCTAGC
GGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGCGCCTG
AATAACCTGATTGCCCAGTTGCCCGGCGAGAAGAAAAATGGACTTTTTGGGCAACT
TGATTCGCTCTTCCAGTTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCC
GAGGACGCCAAGCTGCAACTTTCAAAGGACACCTACGACGACGACCTTGACAATT

TTGCTGGCACAAATGGCGATCAGTACGCGGAATCGTTCCTTGCGCGCTAAGAACC
TTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATAATCGTGCGCGTGAAGACCGAAATAACCAA
AGCGCGCGTTAGCGCGCTCGATGATTAAGGGGTACGACGACGCATCACCAGGATCT
CAGCGTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGGCAACTGCCTGATAAGTACAAGGACGAT
CTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGACGCGCTAG
CCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACG
CGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGCAGGATCTGCTCCGGAAGCAGAGAAC
CTTTGACAACGGATCCATTCCGCACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATC
TTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATC
GAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCGCTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGCGGAA
ATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAGTCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGA
ATTTCGAGGAACTTGTCGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAACGAA
TGACGAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCC
TGCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATACGTTAC
TGAAGGAATGAGGAAGCCGGCGTTTCTGTCCGGAGAACAGAAGAAAGCAATTGT
CGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGA
CTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGCGTGGAGGA
CAGATTCAACGCTTCGGTGGGATACCATATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGAC
AAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATTGTCCTG
ACGCTTGACGCTTTTTCGATGATCGGCAGATCAAGAAGCGCTTCGACAACCTAC
GGCTCAATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACTCAAGCGCCGCCGGTACACTG
GTTGGGGCCGGCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCG
GTAAAACTATCCTGGATTTCCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCAT
GCAATTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAAGCACA
AGTGTCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACAACATCGCCAATCTGGCCGGTTC
GCCGGCGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGT
GAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGA
AAACCAGACTACCCAAGAAGGGCCAGAAAAACTCCCGCGAACGAATGAAGCGGA
TCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGTCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTG
GAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAAATGGA
CGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGAC
GTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGG
TGTTGACTCGCAGGGACAAGAACAAGGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAAG
ACGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGA

TTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGGGCGGACTCTCAG
AGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGGCAGATTA
CCAAGCACGTGGCGCAGATCTTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGA
ACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACTTGTG
CGGACTTTCCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACTACC
ATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAA
AGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGT
GAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGAAAT
ACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAAT
GGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGGGAAAT
CGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACGGTTCGCAAAGTGCTCTCTATGCCG
CAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACGGGGGGATTTTCAAAGGAA
TCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTGATTGCAAGGCAAGAAAGACTGG
GACCCGAAGAAGTACGGAGGATTGGATTGGCCGACTGTCGCATACTCCGTCCTCG
TGGTGGCCAAGGTGGAAAAGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAAAGAG
CTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCGAGAAGAACCCCATTGATT
TCCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACTCC
CCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGC
CGGAGAACTGCAAAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTATGTGAACTT
CCTGTATCTTGCTTCGCACTACGAAAAGCTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGA
ACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGA
AGCAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACGTCGACAAA
GTGCTGTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAG
AACATTATCCACTTGTTCACCCTGACCAACCTGGGAGCCCCAGCCGCTTCAAGT
ACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGA
CGCCGACCTGATCCACCAGAGCATCACTGGACTGTACGAAACTAGGATCGATCT
GTCGCAGCTGGGTGGCGACTGA

2. 人類SERPINA1引導核酸和具有食蟹獼猴同源性之人類SERPINA1

引導設計

使用人類參考基因組(例如，hg38)和使用者定義之相關基因組區(例如編碼外顯子之*SERPINA1*蛋白質)經由計算機進行初始引導選擇以鑑別相關區中之PAM。對於各經鑑別之PAM，進行分析且報導統計資料。基於此項技術中已知的多種準則(例如GC含量、預測中靶活動和可能之脫靶活動)進一步選擇gRNA分子且進行等級排序。

針對靶向外顯子2和外顯子3中之蛋白質編碼區的*SERPINA1* (ENSG00000197249.13)設計總共88個引導RNA。將此等88個引導物加上4個對照引導物置放於96孔格式中。同時，將靶向在食蟹獼猴中具有100%同源性的*SERPINA1*之外顯子2至5的51個引導RNA加上4個對照引導物(一式兩份)置放於96孔格式中。引導RNA中之引導序列及相應基因組座標提供於下文中(表1)。

3. Cas9 mRNA及引導RNA活體外遞送

在補充有10%胎牛血清及500 μg/ml G418之DMEM培養基中培養組成性表現Spy Cas9 (「HEK293_Cas9」)之人胎腎腺癌細胞株HEK293。在轉染之前20小時在96孔板中以10,000個細胞/孔之密度塗鋪細胞(在轉染時間時匯合~70%)。根據製造商方案用脂染胺RNAiMAX (Lipofectamine RNAiMAX) (ThermoFisher，目錄號13778150)轉染細胞。用含有獨立crRNA (25 nM)、trRNA (25 nM)、Lipofectamine RNAiMAX (0.3微升/孔)及OptiMem之脂複合體轉染細胞。

在補充有10%胎牛血清之DMEM培養基中培養人類肝細胞癌細胞株HUH7 (研究生物資源日本保藏細胞庫(Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank)，目錄號JCRB0403)。在轉染之前20小時在96孔

板中以15,000個細胞/孔之密度塗鋪細胞(在轉染時間時匯合~70%)。根據製造商方案用脂染胺MessengerMAX (ThermoFisher，目錄號LMRNA003)轉染細胞。用含有Spy Cas9 mRNA (100 ng)、MessengerMAX (0.3微升/孔)及OptiMem之脂複合體，隨後用含有獨立crRNA (25 nM)、示蹤RNA (25 nM)、MessengerMAX (0.3微升/孔)及OptiMem之單獨脂複合體依序轉染細胞。

根據製造商(Invitrogen，方案11.28.2012)培養原代人類肝臟肝細胞(PHH) (Gibco，批號Hu8249)。簡言之，解凍細胞且再懸浮於具有補充劑(Gibco，目錄號CM7500)之肝細胞解凍培養基中，隨後加以離心。丟棄上清液且將經粒化之細胞再懸浮於肝細胞塗鋪培養基加上補充包(Invitrogen，目錄號A1217601及CM3000)中。對細胞進行計數且以33,000個細胞/孔之密度塗鋪於經Bio-coat膠原蛋白I塗佈之96孔板(ThermoFisher，目錄號877272)上。使經塗鋪之細胞在處於37℃及5% CO_2氛圍下之組織培養恆溫箱中靜置且黏附持續5小時。在培育之後，針對單層形式檢查細胞且用具有無血清補充包(Invitrogen，目錄號A1217601及CM4000)之肝細胞培養基洗滌一次。同時，藉由混合等量之試劑且在95℃下培育2 min且冷卻至室溫來對獨立crRNA及trRNA進行預退火。將由經預退火之crRNA及trRNA組成之雙引導物(dgRNA)與Spy Cas9蛋白質一起培育以形成核糖核蛋白(RNP)複合物。根據製造商方案用脂染胺RNAiMAX (ThermoFisher，目錄號13778150)轉染細胞。用含有Spy Cas9 (10nM)、獨立crRNA (10 nM)、示蹤RNA (10 nM)、脂染胺RNAiMAX (1.0微升/孔)及OptiMem之RNP轉染細胞。

在補充有10%胎牛血清之DMEM培養基中培養人類肝細胞癌細胞株

HepG2 (美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection)，目錄號HB-8065)。對細胞進行計數且以96孔板中每個孔15,000個細胞之密度塗鋪於經Bio-coat膠原蛋白I塗佈之96孔板(ThermoFisher，目錄號877272)上，24小時之後與LNP一起培育，如實例4中進一步描述。

4. 基因組DNA分離

轉染後24或48小時時收集HEK293_Cas9、HUH7及PHH轉染細胞。根據製造商方案使用50微升/孔BuccalAmp DNA提取溶液(Epicentre，目錄號QE09050)自96孔板之各孔取出gDNA。如本文所述，對所有DNA樣本進行PCR及後續NGS分析。

5. 針對中靶裂解效率之下一代定序(「NGS」)及分析

為了定量地測定基因組中之目標位置處之編輯效率，使用深度定序來鑑別藉由基因編輯引入之插入及缺失的存在。

圍繞相關基因(例如*SERPINA1*)中之靶位點設計PCR引子，且擴增相關基因組區。引子序列提供於表3中。

表3：針對所靶向SERPINA1及對照crRNA之定序引子

描述	引導物ID (序列引子所針對設計)	前向序列之SEQ ID	前向序列	反向序列之SEQ ID	反向序列
對照物1	CR001261	142	GAGGAGTCCACAGTAGGATTGATT	280	CCATCGGACGATCCTATCTGATTA
對照物2	CR001262	143	AGCTAGTTGGTAAGGTCAGTGTG	281	AAATCCTAACTGGGCTGGAAGG
對照物3	CR001263	144	AGCTAGTTGGTAAGGTCAGTGTG	282	AAATCCTAACTGGGCTGGAAGG
對照物4	CR001264	145	AGCTAGTTGGTAAGGTCAGTGTG	283	AAATCCTAACTGGGCTGGAAGG
SERPINA1	CR001367	146	TCATGGTGGGATG	284	CTTGGCACAGGCTG

描述	引導物ID (序列引子所針對設計)	前向序列之SEQ ID	前向序列	反向序列之SEQ ID	反向序列
			TATCTGTCTTC		GTTTAATAAT
SERPINA1	CR001368	147	TCATGGTGGGATG TATCTGTCTTC	285	CTTGGCACAGGCTG GTTTAATAAT
SERPINA1	CR001369	148	TCATGGTGGGATG TATCTGTCTTC	286	CTTGGCACAGGCTG GTTTAATAAT
SERPINA1	CR001370	149	GATCCTGATCATG GTGGGATGTAT	287	TTCTTTCAGTGTTA CTGATGTCGG
SERPINA1	CR001371	150	TCATGGTGGGATG TATCTGTCTTC	288	CTTGGCACAGGCTG GTTTAATAAT
SERPINA1	CR001372	151	GATATTGGTGCTG TTGGACTGGTG	289	GTGTCAATCCCTGA TCACTGGG
SERPINA1	CR001373	152	ATGCTCACTGGGG AGAAGAAGATA	290	TCATCATGTGCCTT GACTCGG
SERPINA1	CR001374	153	ATGCTCACTGGGG AGAAGAAGATA	291	TCATCATGTGCCTT GACTCGG
SERPINA1	CR001375	154	ATGCTCACTGGGG AGAAGAAGATA	292	TCATCATGTGCCTT GACTCGG
SERPINA1	CR001376	155	GGGAGAAGAAGA TATTGGTGCTGT	293	GATCACTGGGAGTC ATCATGTGC
SERPINA1	CR001377	156	GGGAGAAGAAGA TATTGGTGCTGT	294	GATCACTGGGAGTC ATCATGTGC
SERPINA1	CR001378	157	GGGAGAAGAAGA TATTGGTGCTGT	295	GATCACTGGGAGTC ATCATGTGC
SERPINA1	CR001379	158	GGGAGAAGAAGA TATTGGTGCTGT	296	GATCACTGGGAGTC ATCATGTGC
SERPINA1	CR001380	159	GGGAGAAGAAGA TATTGGTGCTGT	297	GATCACTGGGAGTC ATCATGTGC
SERPINA1	CR001381	160	GATATTGGTGCTG TTGGACTGGTG	298	GTGTCAATCCCTGA TCACTGGG
SERPINA1	CR001382	161	GGGAGAAGAAGA TATTGGTGCTGT	299	GATCACTGGGAGTC ATCATGTGC

描述	引導物ID (序列引子所針對設計)	前向序列之SEQ ID	前向序列	反向序列之SEQ ID	反向序列
SERPINA1	CR001383	162	GGGAGAAGAAGA TATTGGTGCTGT	300	GATCACTGGGAGTC ATCATGTGC
SERPINA1	CR001384	163	ATTGCAAAGGCTG TAGCGATGCTC	301	GTCTTGCAGGACAA TGCCGTC
SERPINA1	CR001385	164	ATTGCAAAGGCTG TAGCGATGCTC	302	GTCTTGCAGGACAA TGCCGTC
SERPINA1	CR001386	165	ATTGCAAAGGCTG TAGCGATGCTC	303	GTCTTGCAGGACAA TGCCGTC
SERPINA1	CR001387	166	ATTGCAAAGGCTG TAGCGATGCTC	304	GTCTTGCAGGACAA TGCCGTC
SERPINA1	CR001388	167	ATTTCATCGTGAG TGTCAGCCTT	305	AATGCCGTCTTCTG TCTCGTG
SERPINA1	CR001389	168	ATTTCATCGTGAG TGTCAGCCTT	306	AATGCCGTCTTCTG TCTCGTG
SERPINA1	CR001390	169	ATTTCATCGTGAG TGTCAGCCTT	307	AATGCCGTCTTCTG TCTCGTG
SERPINA1	CR001391	170	ATTTCATCGTGAG TGTCAGCCTT	308	AATGCCGTCTTCTG TCTCGTG
SERPINA1	CR001392	171	CCAGGATTTCATC GTGAGTGTCAG	309	GAGATGCTGCCCAG AAGACAGATA
SERPINA1	CR001393	172	CTCCAGGATTTCA TCGTGAGTGTC	310	CCAGAAGACAGAT ACATCCCACC
SERPINA1	CR001394	173	CGGAATCTCCGTG AGGTTGAAAT	311	CTGCCCAGAAGACA GATACATCC
SERPINA1	CR001395	174	CGGAATCTCCGTG AGGTTGAAAT	312	ATGATCAGGATCAC CCAACCTTC
SERPINA1	CR001396	175	CGGAATCTCCGTG AGGTTGAAAT	313	ATGATCAGGATCAC CCAACCTTC
SERPINA1	CR001397	176	TTCATGGATCTGA GCCTCCGGAAT	314	CACCATGATCAGGA TCACCCAAC
SERPINA1	CR001398	177	AAAACTTATCCAC	315	CTGAGTTCGCCTTC

描述	引導物ID (序列引子所針對設計)	前向序列之SEQ ID	前向序列	反向序列之SEQ ID	反向序列
			TAGCTTCAGGC		AGCCTATAC
SERPINA1	CR001399	178	AAAACTTATCCAC TAGCTTCAGGC	316	CTGAGTTCGCCTTC AGCCTATAC
SERPINA1	CR001400	179	AAAACTTATCCAC TAGCTTCAGGC	317	CTGAGTTCGCCTTC AGCCTATAC
SERPINA1	CR001401	180	AAAACTTATCCAC TAGCTTCAGGC	318	CTGAGTTCGCCTTC AGCCTATAC
SERPINA1	CR001402	181	AAAACTTATCCAC TAGCTTCAGGC	319	CCAACAGCACCAAT ATCTTCTTCT
SERPINA1	CR001403	182	TTATCCACTAGCT TCAGGCCCTC	320	CCAACAGCACCAAT ATCTTCTTCT
SERPINA1	CR001404	183	AGGCTTCTGAGTG GTACAACTTTT	321	AGTCCAACAGCACC AATATCTTCT
SERPINA1	CR001405	184	AAAACTTATCCAC TAGCTTCAGGC	322	ACAGCACCAATATC TTCTTCTCCC
SERPINA1	CR001406	185	AGGCTTCTGAGTG GTACAACTTTT	323	AGTCCAACAGCACC AATATCTTCT
SERPINA1	CR001407	186	AGGCTTCTGAGTG GTACAACTTTT	324	AGTCCAACAGCACC AATATCTTCT
SERPINA1	CR001408	187	AGGCTTCTGAGTG GTACAACTTTT	325	AGTCCAACAGCACC AATATCTTCT
SERPINA1	CR001409	188	AGGCTTCTGAGTG GTACAACTTTT	326	AGTCCAACAGCACC AATATCTTCT
SERPINA1	CR001410	189	ATTTTCCCTTGAG TACCCTTCTCC	327	CTGACACTCACGAT GAAATCCTGG
SERPINA1	CR001411	190	ATTTTCCCTTGAG TACCCTTCTCC	328	CTGACACTCACGAT GAAATCCTGG
SERPINA1	CR001412	191	TTGAGTACCCTTC TCCACGTAATC	329	GATGAAATCCTGGA GGGCCTGAAT
SERPINA1	CR001413	192	ATTTTCCCTTGAG TACCCTTCTCC	330	CTGACACTCACGAT GAAATCCTGG

描述	引導物ID (序列引子所針對設計)	前向序列之SEQ ID	前向序列	反向序列之SEQ ID	反向序列
SERPINA1	CR001414	193	CCACAATTTTCCCTTGAGTACCCT	331	ATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAAC
SERPINA1	CR001415	194	TCTCCACGTAATCGTTGATCTGTT	332	AAGGCTGACACTCACGATGAAATC
SERPINA1	CR001416	195	TCTCCACGTAATCGTTGATCTGTT	333	AAGGCTGACACTCACGATGAAATC
SERPINA1	CR001417	196	TCTCCACGTAATCGTTGATCTGTT	334	AAGGCTGACACTCACGATGAAATC
SERPINA1	CR001418	197	ATTTTCCCTTGAGTACCCTTCTCC	335	CTGACACTCACGATGAAATCCTGG
SERPINA1	CR001419	198	TCTCCACGTAATCGTTGATCTGTT	336	AAGGCTGACACTCACGATGAAATC
SERPINA1	CR001420	199	TCTCCACGTAATCGTTGATCTGTT	337	AAGGCTGACACTCACGATGAAATC
SERPINA1	CR001421	200	AAAACTGTGTCTCTGTCAAGCTCC	338	GAGATTCCGGAGGCTCAGATCCAT
SERPINA1	CR001422	201	CCACAATTTTCCCTTGAGTACCCT	339	GATGAAATCCTGGAGGGCCTGAAT
SERPINA1	CR001423	202	GCAACCTTACCTTTAAAGAAGATGTAAT	340	GGAACTCCTCCGTACCCTCAA
SERPINA1	CR001424	203	GCAACCTTACCTTTAAAGAAGATGTAAT	341	GGAACTCCTCCGTACCCTCAA
SERPINA1	CR001425	204	ACCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGA	342	CTTCCAGGAACTCCTCCGTACC
SERPINA1	CR001426	205	ACCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGA	343	CTTCCAGGAACTCCTCCGTACC
SERPINA1	CR001427	206	ACCTTTAAAGAAG	344	CTTCCAGGAACTCC

描述	引導物ID (序列引子所針對設計)	前向序列之SEQ ID	前向序列	反向序列之SEQ ID	反向序列
			ATGTAATTCACCAGA		TCCGTACC
SERPINA1	CR001428	207	ACCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGA	345	CTTCCAGGAACTCCTCCGTACC
SERPINA1	CR001429	208	GCAACCTTACCTTTAAAGAAGATGTAAT	346	GGAACTCCTCCGTACCCTCAA
SERPINA1	CR001430	209	CTTGTTTCTATGGGAACAGCTCAG	347	GGGCCTGAAGCTAGTGGATAAG
SERPINA1	CR001431	210	CTTGTTTCTATGGGAACAGCTCAG	348	GGGCCTGAAGCTAGTGGATAAG
SERPINA1	CR001432	211	CTTGTTTCTATGGGAACAGCTCAG	349	GGGCCTGAAGCTAGTGGATAAG
SERPINA1	CR001433	212	CTTGTTTCTATGGGAACAGCTCAG	350	GGGCCTGAAGCTAGTGGATAAG
SERPINA1	CR001434	213	CTTGTTTCTATGGGAACAGCTCAG	351	GGGCCTGAAGCTAGTGGATAAG
SERPINA1	CR001435	214	CTTGTTTCTATGGGAACAGCTCAG	352	GGGCCTGAAGCTAGTGGATAAG
SERPINA1	CR001436	215	AACTGAAGAATCCACGCTGAAAAG	353	TCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTC
SERPINA1	CR001437	216	CATGCCTAAACGCTTCATCATAGG	354	GATGGTCAGTTTCAGCACCTTTTA
SERPINA1	CR001438	217	GGCATTGCCCAGGTATTTCATC	355	GAGGGATGTGTGTCGTCAAGG
SERPINA1	CR001439	218	GGCATTGCCCAGGTATTTCATC	356	GAGGGATGTGTGTCGTCAAGG
SERPINA1	CR001440	219	CATTGCCCAGGTATTTCATCAGC	357	GGAGGGGACTCATGGTTTCTTTAT
SERPINA1	CR001441	220	GTTCATTTTCCAG	358	TGGTTTCTTTATTCT

描述	引導物ID (序列引子所針對設計)	前向序列之SEQ ID	前向序列	反向序列之SEQ ID	反向序列
			GTGCTGTAGTT		GCTACACTCT
SERPINA1	CR001442	221	GAGTTCATTTTCC AGGTGCTGTAG	359	ATTCTGCTACACTC TTCCAAACCT
SERPINA1	CR001443	222	GAGTTCATTTTCC AGGTGCTGTAG	360	ATTCTGCTACACTC TTCCAAACCT
SERPINA1	CR001444	223	GAGTTCATTTTCC AGGTGCTGTAG	361	ATTCTGCTACACTC TTCCAAACCT
SERPINA1	CR001445	224	TATCGTGGGTGAG TTCATTTTCCA	362	TACACTCTTCCAAA CCTTCACTCA
SERPINA1	CR001446	225	TATCGTGGGTGAG TTCATTTTCCA	363	TACACTCTTCCAAA CCTTCACTCA
SERPINA1	CR001447	226	GAGTTCATTTTCC AGGTGCTGTAG	364	ATTCTGCTACACTC TTCCAAACCT
SERPINA1	CR001448	227	GAGTTCATTTTCC AGGTGCTGTAG	365	ATTCTGCTACACTC TTCCAAACCT
SERPINA1	CR001449	228	TATCGTGGGTGAG TTCATTTTCCA	366	TACACTCTTCCAAA CCTTCACTCA
SERPINA1	CR001450	229	TATCGTGGGTGAG TTCATTTTCCA	367	TACACTCTTCCAAA CCTTCACTCA
SERPINA1	CR001451	230	AGGAACTTGGTGA TGATATCGTGG	368	AAATGGGAGAGAC CCTTTGAAGTC
SERPINA1	CR001452	231	CTTCATTTTCCAG GAACTTGGTGA	369	TTTGAAGTCAAGGA CACCGAGGAA
SERPINA1	CR001453	232	GGGAATCACCTTC TGTCTTCATTTTC	370	CCTTTGAAGTCAAG GACACCGAG
SERPINA1	CR001454	233	GGGAATCACCTTC TGTCTTCATTTTC	371	TTTGAAGTCAAGGA CACCGAGGAA
SERPINA1	CR001474	234	CAAAGGGTTTGTT GAACTTGACCT	372	CTATGTGACAGGGA GGGAGAGGAT
SERPINA1	CR001475	235	AGGGGAGACTTGG TATTTTGTTCA	373	CTATGTGACAGGGA GGGAGAGGAT

描述	引導物ID (序列引子所針對設計)	前向序列之SEQ ID	前向序列	反向序列之SEQ ID	反向序列
SERPINA1	CR001476	236	AGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCA	374	CTATGTGACAGGGAGGGAGAGGAT
SERPINA1	CR001477	237	AGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCA	375	CTATGTGACAGGGAGGGAGAGGAT
SERPINA1	CR001478	238	AGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCA	376	CTATGTGACAGGGAGGGAGAGGAT
SERPINA1	CR001483	239	ACCCTTCTTTAATGTCATCCAGGG	377	GATCAGCCTTACAACGTGTCTCT
SERPINA1	CR001484	240	ACCCTTCTTTAATGTCATCCAGGG	378	GATCAGCCTTACAACGTGTCTCT
SERPINA1	CR003190	241	GATATTGGTGCTGTTGGACTGGTG	379	GTGTCAATCCCTGATCACTGGG
SERPINA1	CR003191	242	GATATTGGTGCTGTTGGACTGGTG	380	GTGTCAATCCCTGATCACTGGG
SERPINA1	CR003196	243	CAGGATTTCATCGTGAGTGTCAGC	381	CTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTC
SERPINA1	CR003204	244	GTTGAGGGTACGGAGGAGTTC	382	ATGATCAGGATCACCCAACCTTC
SERPINA1	CR003205	245	AAAACTTATCCACTAGCTTCAGGC	383	CTGAGTTCGCCTTCAGCCTATAC
SERPINA1	CR003206	246	AAAACTTATCCACTAGCTTCAGGC	384	CTGAGTTCGCCTTCAGCCTATAC
SERPINA1	CR003207	247	AGGCTTCTGAGTGGTACAACTTTT	385	AGTCCAACAGCACCAATATCTTCT
SERPINA1	CR003208	248	ATTTTCCCTTGAGTACCCTTCTCC	386	CTGACACTCACGATGAAATCCTGG
SERPINA1	CR003217	249	TCACCTTCTGTCTTCATTTTCCAG	387	GAGAGACCCTTTGAAGTCAAGGAC
SERPINA1	CR003218	250	GTCCCAACATGGCTAAGAGGTG	388	GAAGGTGCCTATGATGAAGCGT
SERPINA1	CR003219	251	GTCCCAACATGGC	389	GAAGGTGCCTATGA

描述	引導物ID (序列引子所針對設計)	前向序列之SEQ ID	前向序列	反向序列之SEQ ID	反向序列
			TAAGAGGTG		TGAAGCGT
SERPINA1	CR003220	252	TATACAGAGTAGCAGTGACCCAGG	390	TTAACATCCAGCACTGTAAGAAGC
SERPINA1	CR003221	253	TACAGATACCAGGGTGCAACAAG	391	AGGAGTAAGTGGCAGAAATAATCAGA
SERPINA1	CR003222	254	ATACCAGGGTGCAACAAGGTCG	392	GACACAGGAGTAAGTGGCAGAAAT
SERPINA1	CR003223	255	CCCACACATTCTTCCCTACAGATA	393	CAGAAGAACAAGAGGAATGCTGTG
SERPINA1	CR003224	256	CCCACACATTCTTCCCTACAGATA	394	CAGAAGAACAAGAGGAATGCTGTG
SERPINA1	CR003225	257	TCAGTGAATCACGGGCATCTTC	395	TCTGCCAGCTTACATTTACCCAAA
SERPINA1	CR003226	258	GAATCACGGGCATCTTCAGGAG	396	ACAGGTCTGCCAGCTTACATTTAC
SERPINA1	CR003227	259	TCAGTGAATCACGGGCATCTTC	397	TCTGCCAGCTTACATTTACCCAAA
SERPINA1	CR003235	260	GCTCAACCCTTCTTTAATGTCATCC	398	CCTTACAACGTGTCTCTGCTTCT
SERPINA1	CR003236	261	ACCCTTCTTTAATGTCATCCAGGG	399	GATCAGCCTTACAACGTGTCTCT
SERPINA1	CR003237	262	ACCCTTCTTTAATGTCATCCAGGG	400	GATCAGCCTTACAACGTGTCTCT
SERPINA1	CR003238	263	ACCCTTCTTTAATGTCATCCAGGG	401	GATCAGCCTTACAACGTGTCTCT
SERPINA1	CR003240	264	ACCCTTCTTTAATGTCATCCAGGG	402	GATCAGCCTTACAACGTGTCTCT
SERPINA1	CR003241	265	ACCCTTCTTTAATGTCATCCAGGG	403	GATCAGCCTTACAACGTGTCTCT
SERPINA1	CR003242	266	GCTCAACCCTTCTTTAATGTCATCC	404	CCTTACAACGTGTCTCTGCTTCT

描述	引導物ID (序列引子所針對設計)	前向序列之SEQ ID	前向序列	反向序列之SEQ ID	反向序列
SERPINA1	CR003243	267	GCTCAACCCTTCTTTAATGTCATCC	405	CCTTACAACGTGTCTCTGCTTCT
SERPINA1	CR003244	268	AAACATGGGAGGGATTTACAGTCA	406	CATCGACGAGAAAGGGACTGAAG
SERPINA1	CR003245	269	GCTCAACCCTTCTTTAATGTCATCC	407	CCTTACAACGTGTCTCTGCTTCT
SERPINA1	CR003246	270	GCTCAACCCTTCTTTAATGTCATCC	409	CCTTACAACGTGTCTCTGCTTCT

根據製造商方案(Illumina)進行額外PCR以對於定序添加化學作用。在Illumina MiSeq儀器上對擴增子定序。在消除具有低品質評分之讀段之後，將讀段與人類參考基因組(例如hg38)比對。將含有讀段之所得檔案映射至參考基因組(BAM檔案)，其中選擇與相關目標區重疊之讀段且計算野生型讀段的數目相對於含有插入、取代或缺失之讀段的數目。

編輯百分比(例如「編輯效率」或「編輯百分率」)定義為具有插入/缺失(「indel」)或取代之序列讀段的總數相對於包括野生型之序列讀段的總數。

6. α-1抗胰蛋白酶(「AAT」) ELISA

如先前所述用來自表1之所選引導物轉染肝細胞癌細胞株HUH7。轉染後六天，用PBS洗滌細胞一次且隨後用200 μL具有10% FBS之標準DMEM培養基替換。四小時後，收集培養基且儲存於-20℃下。根據製造商方案在黏附細胞上完成CellTiter-Glo (「CTG」)分析(Promega，目錄號G7570)。使用AAT ELISA套組(R&D Systems，目錄號DY1268)測定總AAT含量。使用製造商方案製備套組試劑及標準品。在運作ELISA之前，

在室溫下解凍冷凍培養基且以1000 rpm離心1分鐘而成集結粒碎片且隨後置放於冰上。對於ELISA，用70 μL1×分析稀釋液稀釋30 μL培養基。根據製造商方案完成ELISA程序。在SpectraMax M5板讀取器上讀取板。使用脫離標準曲線之四參數邏輯曲線擬合藉由SoftMax Pro軟體版本6.4.2計算AAT含量。藉由基於獲自CTG分析之各值比較板平均值來估算各孔之細胞數。根據細胞數調節最終AAT含量(pg/ml)。

7. 藉由西方墨點法之AAT蛋白質分析

如先前所述用來自表1之所選引導物轉染肝細胞癌細胞株HUH7。轉染後六天，移除培養基且用50微升/孔RIPA緩衝液(Boston Bio Products，目錄號BP-115)加上新鮮添加的由complete蛋白酶抑制劑混合物(Sigma，目錄號11697498001)、1 mM DTT及250 U/ml核酸酶(EMD Millipore，目錄號71206-3)組成之蛋白酶抑制劑混合物溶解細胞。將細胞保存於冰上持續30分鐘，此時添加NaCl (1 M最終濃度)。充分混合細胞分解物且保留於冰上持續30分鐘。將全細胞提取物(「WCE」)轉移至PCR板且離心成集結粒碎片。使用Bradford分析(Bio-Rad，目錄號500-0001)來評定分解物之蛋白質含量。根據製造商方案完成Bradford分析程序。在使用之前將提取物儲存於-20℃下。進行西方墨點法以評定AAT蛋白質含量。將分解物與勒姆利緩衝液(Laemmli buffer)混合且在95℃下變性10分鐘。根據製造商方案使用NuPage系統於4%至12% Bis-Tris凝膠(ThermoFisher)上運作西方墨點法，之後濕轉移至0.45 μm硝化纖維素膜(Bio-Rad，目錄號1620115)上。轉移之後，用水徹底沖洗膜且用麗春紅S (Ponceau S)溶液(Boston Bio Products，目錄號ST-180)染色以確認完成及甚至轉移。在室溫下在實驗室搖臂上使用於TBS中之5%乳粉封閉墨點

30分鐘。用TBST沖洗墨點且用家兔α-AAT多株抗體(Sigma，目錄號HPA001292)於TBST中以1:1000進行探測。於TBST中以1:2500使用GAPDH作為內參考物(ThermoFisher，目錄號NB600502)且同時與AAT初級抗體一起培育。將墨點密封在包中且在4℃下於實驗室搖臂上保持隔夜。培育之後，各自在TBST中沖洗墨點3次持續5分鐘且用小鼠及家兔之二級抗體(ThermoFisher，目錄號PI35518及PISA535571)各自在TBST中以1:25,000在室溫下探測持續30分鐘。培育之後，各自在TBST中沖洗墨點3次持續5分鐘且用PBS沖洗2次。觀測墨點且使用Licor Odyssey系統加以分析。

8. 脂質奈米粒子(LNP)調配物

以4.5之N:P比(胺比RNA磷酸酯) (N:P)調配LNP。以以下莫耳比將脂質奈米粒子組分溶解於100%乙醇中：45 mol%陽離子脂質(脂質A)；44 mol%膽固醇；9 mol% DSPC；及2 mol% PEG2k-DMG。將RNA負荷(1:1 mRNA:sgRNA(wt/wt))溶解於pH 4.5下之25Mm緩衝液中，大約0.45 mg/mL之RNA負荷之濃度。LNP係藉由根據製造商方案，使用Precision Nanosystems NanoAssemblrTM台式儀器將脂質及RNA溶液微流體混合而形成。以3:1之比率於水中收集LNP。在室溫下培育LNP一小時。將剩餘緩衝液更換為pH 7.5下之50mM Tris (超過樣本體積100倍)，使用10 kDa Slide-a-LyzerTM G2透析卡(ThermoFisher Scientific)在4℃下在平緩攪拌下隔夜。次日，使用Amicon過濾器濃縮(以4000 g在4℃下) LNP兩次以達成所需濃度。隨後使其與2× TSS (50 mM Tris、90 mM氯化鈉、10% w/v蔗糖，pH 7.5下)1:1混合。隨後使用0.2 μM過濾器過濾所得混合物。將所得過濾物儲存於2℃至8℃下。

實例2 -及引導物檢核

1. 多種細胞類型中的SERPINA1引導物之交叉篩選

如實例1中所述將靶向人類*SERPINA1*之引導物及在食蟹獼猴中具有同源性之彼等者轉染至HEK293_Cas9及HUH7細胞株以及原代人類肝細胞中。測定包含各細胞類型中各引導序列之crRNA的編輯百分比，且隨後基於最高編輯%對引導序列進行等級排序。全部三種細胞株中的表1中之引導序列的篩選資料列於下文(表4、表5及表6)。

表4顯示人類腎臟腺癌細胞株，HEK293_Cas9中*SERPINA1*及對照crRNA的編輯%、插入(Ins)%及缺失(Del)%的平均值及標準差，其組成性地過度表現Spy Cas9蛋白質。

表4：HEK293_Cas9細胞中所表現的crRNA之SERPINA1編輯資料

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR001261 (對照物1)	37.14	10.50	29.56	7.80	7.58	2.70
CR001262 (對照物2)	61.12	6.39	6.27	1.02	54.85	5.37
CR001263 (對照物3)	49.83	5.97	4.14	0.71	45.70	5.75
CR001264 (對照物4)	63.96	2.58	12.77	1.85	51.19	2.62
CR001367	19.98	1.45	2.35	1.20	17.63	2.22
CR001368	33.11	4.48	6.16	2.34	26.95	4.20
CR001369	39.81	1.81	18.42	1.08	21.40	1.10
CR001370	57.97	6.52	7.76	1.07	50.21	5.61
CR001371	35.04	7.59	7.13	1.42	27.92	6.25
CR001372	15.72	3.21	8.30	1.95	7.42	1.27
CR001373	45.15	13.06	4.13	0.99	41.01	12.06
CR001374	58.18	5.41	2.56	0.13	55.62	5.54

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR001375	7.50	2.34	2.23	0.51	5.28	1.85
CR001376	44.31	6.67	7.74	0.64	36.57	6.06
CR001377	20.40	4.28	1.27	0.29	19.13	3.99
CR001378	28.03	11.43	3.88	0.83	24.15	10.95
CR001379	53.08	2.61	16.18	0.22	36.90	2.39
CR001380	46.85	3.14	14.28	2.62	32.57	1.47
CR001381	36.58	17.60	8.97	3.66	27.62	14.60
CR001382	44.55	11.27	4.13	1.16	40.42	10.40
CR001383	30.09	2.46	6.47	6.04	23.62	3.58
CR001384	33.33	12.19	6.60	2.35	26.73	10.30
CR001385	17.84	2.09	2.90	1.09	14.93	1.01
CR001386	28.33	12.64	5.41	2.41	22.91	10.28
CR001387	1.31	0.11	0.31	0.06	1.00	0.05
CR001388	31.56	1.55	4.87	1.05	26.69	0.52
CR001389	30.25	8.10	4.39	0.27	25.86	7.94
CR001390	38.70	7.27	2.41	1.21	36.30	6.14
CR001391	25.85	4.84	4.73	0.85	21.12	4.33
CR001392	38.90	1.94	4.31	0.40	34.59	2.11
CR001393	24.37	5.50	3.95	0.59	20.42	5.08
CR001394	27.59	7.94	3.81	1.16	23.77	7.03
CR001395	64.14	1.93	20.99	1.21	43.16	0.93
CR001396	48.47	0.51	4.67	0.25	43.81	0.35
CR001397	38.85	5.70	21.07	3.03	17.78	2.92
CR001398	50.87	7.83	8.89	2.03	41.98	5.80
CR001399	56.30	4.16	7.71	0.18	48.59	4.19
CR001400	67.59	1.70	51.60	2.79	15.99	1.64
CR001401	32.28	4.65	4.97	0.38	27.31	4.28
CR001402	31.10	5.94	5.84	0.66	25.26	5.31
CR001403	64.84	4.30	10.76	0.12	54.08	4.41
CR001404	73.28	1.88	2.66	0.78	70.63	1.72
CR001405	48.44	3.46	23.17	2.64	25.28	3.23
CR001406	3.96	5.13	0.07	0.06	3.89	5.06

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR001407	20.24	1.38	3.13	0.21	17.11	1.35
CR001408	47.19	1.45	5.09	0.84	42.09	0.67
CR001409	43.17	6.32	16.98	3.44	26.20	15.26
CR001410	32.14	0.53	3.19	0.33	28.95	0.73
CR001411	8.61	3.29	1.22	0.25	7.39	3.05
CR001412	37.33	7.35	7.38	3.13	29.95	8.09
CR001413	43.98	1.38	18.27	1.59	25.72	2.54
CR001414	11.37	1.85	7.04	1.11	4.33	0.87
CR001415	16.17	5.14	1.38	0.34	14.79	4.80
CR001416	19.41	3.54	1.51	0.14	17.90	3.44
CR001417	24.59	3.79	1.69	0.51	22.91	3.44
CR001418	22.23	8.75	3.32	0.64	18.91	8.42
CR001419	7.16	2.43	1.96	0.59	5.20	1.84
CR001420	16.80	0.67	3.83	0.03	12.97	0.65
CR001421	50.60	5.30	16.44	1.91	34.16	3.68
CR001422	46.78	8.39	35.12	4.87	11.65	3.75
CR001423	5.71	2.24	3.85	1.72	1.86	0.67
CR001424	10.02	5.15	6.63	3.08	3.39	2.13
CR001425	11.80	2.11	2.71	0.73	9.09	2.60
CR001426	8.24	0.40	1.39	0.40	6.85	0.55
CR001427	44.65	2.98	7.44	0.41	37.21	2.59
CR001428	19.94	6.39	2.17	0.33	17.77	6.07
CR001429	29.81	5.32	12.59	2.11	17.22	3.20
CR001430	20.87	8.25	2.13	0.44	18.74	7.84
CR001431	52.49	10.52	33.80	7.35	18.69	3.61
CR001432	21.92	5.22	5.70	0.94	16.22	4.66
CR001433	40.95	2.95	23.21	1.30	17.75	1.66
CR001434	5.60	1.90	0.72	0.47	4.88	1.44
CR001435	18.53	7.21	1.83	1.10	16.70	6.11
CR001436	14.88	2.43	1.37	0.16	13.51	7.96
CR001437	39.01	8.82	13.95	3.13	25.06	6.23
CR001438	3.68	1.14	0.15	0.05	3.53	1.09

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR001439	49.03	5.18	37.60	3.67	11.43	2.08
CR001440	34.54	4.15	1.56	0.15	32.97	4.03
CR001441	6.54	1.29	1.29	0.45	5.25	0.96
CR001442	25.65	3.34	2.78	0.34	22.87	3.09
CR001443	25.51	1.41	7.29	0.37	18.21	1.20
CR001444	40.41	12.61	15.09	4.07	25.32	8.73
CR001445	11.00	3.16	1.94	1.00	9.07	2.70
CR001446	53.02	4.58	22.96	2.46	30.06	2.57
CR001447	20.10	8.74	3.25	1.64	16.84	7.25
CR001448	15.52	3.15	3.20	0.75	12.32	2.45
CR001449	27.61	5.69	3.47	1.15	24.14	4.54
CR001450	56.61	8.41	28.80	5.02	27.81	3.43
CR001451	34.18	20.33	9.40	6.81	24.78	13.52
CR001452	51.84	13.15	1.82	0.19	50.02	12.97
CR001453	15.91	6.86	0.69	0.37	15.22	6.49
CR001454	20.19	6.08	1.36	0.51	18.83	5.70
CR001474	25.96	6.20	12.86	3.64	13.11	2.58
CR001475	63.15	3.07	31.61	6.12	31.55	3.31
CR001476	54.31	7.67	2.67	1.04	51.64	6.65
CR001477	25.52	10.95	6.36	2.70	19.16	8.29
CR001478	26.52	8.90	5.60	1.66	20.92	7.24
CR001483	28.12	6.12	2.09	1.65	26.03	5.09
CR001484	19.76	4.36	3.18	1.25	16.58	3.53
CR003190	15.11	0.09	4.36	0.27	10.75	6.21
CR003191	25.88	7.98	7.44	2.32	18.45	5.69
CR003196	50.52	7.48	9.43	3.74	41.09	4.21
CR003204	36.91	7.35	12.61	1.50	24.30	7.38
CR003205	17.97	0.98	2.23	0.64	15.74	0.38
CR003206	2.46	0.27	0.25	0.40	2.21	0.15
CR003207	17.50	3.13	5.54	1.16	11.96	2.07
CR003208	55.48	6.45	9.94	1.08	45.54	5.58
CR003217	46.59	4.09	8.48	2.06	38.11	5.42

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR003218	26.03	4.39	3.34	1.29	22.70	3.93
CR003219	39.80	4.38	7.42	1.66	32.38	2.85
CR003220	12.14	1.54	2.24	0.75	9.90	5.94
CR003221	13.00	2.59	1.96	1.32	11.05	1.70
CR003222	37.01	7.33	2.90	0.98	34.11	20.55
CR003223	10.74	1.77	2.19	0.79	8.55	1.84
CR003224	26.86	1.86	11.22	0.84	15.64	1.02
CR003225	34.08	7.08	15.46	6.18	18.61	2.36
CR003226	38.95	10.09	23.27	8.00	15.68	2.84
CR003227	10.78	0.60	3.67	2.38	7.11	1.97
CR003235	29.83	10.98	10.64	2.88	19.20	8.19
CR003236	38.33	1.77	12.20	2.58	26.13	1.67
CR003237	25.91	5.58	9.09	2.64	16.81	3.09
CR003238	34.15	4.88	4.18	0.67	29.96	5.16
CR003240	20.47	3.55	9.82	2.98	10.65	0.80
CR003241	18.30	4.42	8.32	1.74	9.98	3.67
CR003242	13.42	2.02	3.78	0.73	9.63	1.34
CR003243	12.14	6.02	1.59	1.14	10.55	4.88
CR003244	19.12	3.52	6.50	1.03	12.62	2.56
CR003245	12.70	5.33	2.63	1.64	10.06	3.69
CR003246	16.04	15.42	0.69	0.10	15.35	15.45

表5顯示人類肝細胞癌細胞株，HUH7中所測試*SERPINA1*及與Spy Cas9 mRNA共轉染之對照crRNA的編輯%平均值及標準差、插入(Ins)%及缺失(Del)%。

表5：HUH7細胞中所表現的crRNA之SERPINA1編輯資料

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR001261 (對照物1)	29.28	12.67	19.87	8.98	9.41	3.70
CR001262 (對照物2)	41.40	7.03	3.16	1.01	38.24	6.05

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR001263 (對照物3)	26.98	1.18	2.24	0.35	24.73	1.52
CR001264 (對照物4)	44.08	1.15	7.53	0.75	36.55	0.46
CR001367	5.47	5.69	0.24	0.31	5.23	5.40
CR001368	14.79	2.61	1.19	0.39	13.60	2.25
CR001369	17.25	5.72	6.70	1.98	10.56	3.75
CR001370	38.46	6.45	5.55	0.75	32.91	5.71
CR001371	14.63	4.57	1.63	0.56	12.99	4.14
CR001372	10.15	2.06	3.91	0.98	6.24	1.15
CR001373	34.70	4.03	1.42	0.33	33.27	3.71
CR001374	27.33	2.59	0.99	0.04	26.35	2.62
CR001375	4.11	0.21	1.04	0.15	3.07	0.24
CR001376	23.15	6.14	5.91	2.24	17.23	3.92
CR001377	6.47	1.96	0.45	0.28	6.02	1.69
CR001378	14.10	4.19	0.93	0.39	13.16	3.83
CR001379	21.90	8.09	7.45	2.73	14.45	5.41
CR001380	24.22	3.87	7.37	1.00	16.85	2.91
CR001381	12.32	8.87	2.73	2.20	9.59	6.69
CR001382	17.13	8.79	2.24	1.58	14.89	7.21
CR001383	7.42	3.28	1.53	0.44	5.89	2.98
CR001384	12.96	9.79	2.51	2.03	10.45	7.77
CR001385	7.53	4.30	0.78	0.56	6.74	3.75
CR001386	23.99	13.56	1.62	0.16	22.37	13.49
CR001387	0.90	0.31	0.09	0.07	0.80	0.24
CR001388	9.77	3.08	1.87	0.77	7.90	2.37
CR001389	16.05	2.28	3.20	0.35	12.85	1.93
CR001390	11.73	2.36	0.54	0.20	11.20	2.17
CR001391	21.81	6.84	5.36	1.48	16.45	5.41
CR001392	11.96	3.02	1.45	0.40	10.51	2.62
CR001393	7.00	2.17	0.93	0.44	6.07	1.89
CR001394	16.37	7.60	1.40	0.82	14.97	6.84

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR001395	30.98	4.33	11.11	0.93	19.87	3.40
CR001396	14.50	1.19	1.16	0.11	13.34	1.10
CR001397	16.50	9.54	6.67	4.03	9.83	5.54
CR001398	26.04	3.41	3.41	1.02	22.64	2.69
CR001399	35.04	5.14	3.48	0.52	31.56	4.65
CR001400	35.61	1.04	24.34	0.65	11.26	0.95
CR001401	23.70	2.90	1.73	0.08	21.97	2.90
CR001402	19.71	3.39	3.93	0.71	15.78	2.69
CR001403	28.18	3.71	4.88	0.43	23.30	3.62
CR001404	35.07	2.36	1.02	0.40	34.05	2.03
CR001405	21.48	10.19	9.91	4.25	11.57	6.01
CR001406	1.66	0.55	0.12	0.05	1.53	0.58
CR001407	17.44	1.05	2.35	0.42	15.08	0.73
CR001408	19.90	8.27	3.29	1.30	16.61	7.08
CR001409	26.27	7.85	12.99	4.28	13.28	3.59
CR001410	12.89	1.64	0.88	0.17	12.01	1.49
CR001411	4.14	1.05	0.47	0.21	3.68	0.84
CR001412	18.60	1.72	3.00	0.15	15.60	1.80
CR001413	22.14	3.34	9.37	1.35	12.77	2.00
CR001414	5.48	2.42	2.53	1.06	2.95	1.37
CR001415	10.49	6.86	0.57	0.45	9.92	6.42
CR001416	5.33	4.64	0.35	0.30	4.98	4.35
CR001417	11.24	9.48	0.59	0.45	10.64	9.04
CR001418	8.53	4.51	1.53	0.78	7.00	3.74
CR001419	4.77	2.89	1.11	0.65	3.66	2.24
CR001420	6.16	4.38	1.12	0.96	5.04	3.43
CR001421	18.49	1.49	6.85	0.70	11.64	0.81
CR001422	21.46	4.27	15.17	3.34	6.30	0.95
CR001423	3.81	1.50	0.94	0.30	2.87	1.22
CR001424	5.83	2.81	2.37	1.17	3.47	1.64
CR001425	11.32	0.84	0.53	0.05	10.79	0.86
CR001426	3.21	1.21	0.31	0.24	2.91	0.97

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR001427	35.32	7.09	3.54	1.13	31.78	5.96
CR001428	6.98	1.67	0.73	0.27	6.25	1.40
CR001429	9.58	5.60	3.38	2.03	6.20	3.57
CR001430	3.23	1.18	0.27	0.17	2.96	1.02
CR001431	17.90	4.70	11.23	3.22	6.67	1.62
CR001432	5.57	1.26	1.22	0.52	4.35	0.74
CR001433	19.93	5.08	6.78	2.31	13.15	2.99
CR001434	2.72	0.05	0.17	0.04	2.55	0.08
CR001435	12.35	2.33	1.24	0.15	11.10	2.21
CR001436	4.89	0.68	0.25	0.11	4.64	0.62
CR001437	13.47	6.01	4.01	1.94	9.46	4.11
CR001438	3.26	0.83	0.07	0.03	3.19	0.80
CR001439	38.53	4.67	27.41	2.79	11.12	1.99
CR001440	14.29	4.38	0.97	0.37	13.32	4.02
CR001441	5.04	0.88	0.86	0.04	4.18	0.87
CR001442	11.04	2.22	0.68	0.19	10.36	2.33
CR001443	10.38	0.63	2.83	0.20	7.55	0.74
CR001444	20.77	3.79	2.94	0.53	17.83	3.30
CR001445	3.59	0.21	0.42	0.05	3.17	0.16
CR001446	14.52	2.62	5.36	1.04	9.16	1.59
CR001447	9.86	2.39	1.04	0.10	8.82	2.29
CR001448	6.67	0.41	1.64	0.05	5.02	0.37
CR001449	10.66	0.26	0.83	0.19	9.83	0.26
CR001450	12.69	2.95	6.73	1.61	5.96	1.40
CR001451	11.11	3.69	2.83	1.12	8.27	2.59
CR001452	19.02	4.47	0.45	0.18	18.57	4.29
CR001453	6.70	3.10	0.13	0.06	6.56	3.09
CR001454	6.93	3.29	0.19	0.10	6.73	3.19
CR001474	14.47	0.59	9.31	0.55	5.16	0.24
CR001475	43.17	2.46	13.96	0.38	29.22	2.18
CR001476	42.34	3.55	0.92	0.16	41.43	3.69
CR001477	11.25	1.22	3.62	0.45	7.63	0.82

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR001478	12.03	1.27	1.61	0.20	10.41	1.17
CR001483	8.69	0.35	1.12	0.06	7.58	0.33
CR001484	11.22	1.44	1.38	0.49	9.83	0.96
CR003190	7.94	1.93	1.78	0.42	6.16	1.56
CR003191	11.92	0.19	2.62	0.12	9.31	0.29
CR003196	12.60	3.00	3.39	0.80	9.21	2.21
CR003204	9.27	0.75	3.20	0.35	6.08	0.41
CR003205	10.52	2.42	0.71	0.13	9.81	2.29
CR003206	1.82	0.33	0.06	0.03	1.77	0.31
CR003207	6.73	0.60	2.91	0.35	3.82	0.25
CR003208	19.01	0.99	4.05	0.39	14.96	0.62
CR003217	19.38	2.40	2.33	0.49	17.04	1.95
CR003218	8.49	0.87	0.67	0.14	7.82	0.75
CR003219	15.02	2.15	3.33	0.20	11.69	2.06
CR003220	4.42	1.05	0.52	0.02	3.90	1.03
CR003221	8.04	1.18	0.43	0.15	7.62	1.05
CR003222	6.01	1.09	0.38	0.08	5.63	1.02
CR003223	4.66	0.97	0.54	0.12	4.11	0.85
CR003224	5.16	1.47	2.22	0.84	2.94	0.63
CR003225	13.66	1.72	3.50	0.64	10.16	1.09
CR003226	12.33	5.09	4.46	1.99	7.87	3.20
CR003227	2.83	0.97	0.61	0.38	2.21	0.60
CR003235	12.45	0.76	4.56	0.47	7.90	0.43
CR003236	28.21	3.13	2.74	0.30	25.47	2.86
CR003237	8.44	0.95	1.90	0.28	6.55	0.70
CR003238	9.29	1.35	1.53	0.44	7.76	1.02
CR003240	13.29	1.41	5.54	0.39	7.75	1.05
CR003241	9.17	4.27	3.34	1.98	5.83	2.29
CR003242	4.81	0.93	0.90	0.20	3.91	0.74
CR003243	6.14	0.75	0.60	0.10	5.54	0.68
CR003244	9.75	1.10	2.27	0.23	7.48	0.87
CR003245	4.08	1.73	0.50	0.17	3.58	1.58

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR003246	6.50	0.38	0.46	0.09	6.04	0.30

表6顯示原生人類肝細胞中與Spy Cas9蛋白質共轉染之所測試*SERPINA1*及對照crRNA的編輯%、插入(Ins)%及缺失(Del)%的平均值及標準差。

表6：原生人類肝細胞中所表現的crRNA之*SERPINA1*編輯資料

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR001261 (對照物1)	40.90	0.60	19.27	0.70	21.64	0.84
CR001262 (對照物2)	51.93	5.15	3.78	1.65	48.15	3.60
CR001263 (對照物3)	20.68	2.81	1.05	0.70	19.63	2.57
CR001264 (對照物4)	53.15	2.78	24.01	1.21	29.14	1.82
CR001367	16.20	1.54	0.49	0.07	15.71	1.47
CR001368	26.12	3.04	1.06	0.50	25.06	3.41
CR001369	16.05	0.57	2.04	0.27	14.01	0.60
CR001370	未獲得	未獲得	未獲得	未獲得	未獲得	未獲得
CR001371	27.11	4.39	1.10	0.11	26.01	4.49
CR001372	10.72	1.40	1.81	0.46	8.91	1.30
CR001373	71.53	3.97	0.36	0.11	71.18	3.89
CR001374	53.75	6.02	0.87	0.30	52.87	5.91
CR001375	3.93	0.44	0.57	0.13	3.37	0.38
CR001376	25.88	0.80	7.04	1.20	18.84	0.42
CR001377	7.05	2.73	0.24	0.08	6.81	2.69
CR001378	23.42	1.52	0.45	0.21	22.97	1.60
CR001379	37.64	3.89	4.21	0.10	33.43	3.81
CR001380	30.46	7.98	5.22	1.32	25.24	7.02
CR001381	43.15	2.52	10.64	1.92	32.51	1.59
CR001382	24.10	3.15	1.03	0.36	23.08	3.45

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR001383	11.16	4.85	0.54	0.35	10.61	4.50
CR001384	25.99	5.70	3.88	0.44	22.11	5.43
CR001385	16.36	2.74	1.03	0.39	15.33	2.62
CR001386	20.42	1.44	0.96	0.10	19.46	1.45
CR001387	0.88	0.15	0.06	0.03	0.82	0.12
CR001388	10.54	2.37	1.83	0.56	8.71	1.81
CR001389	29.43	11.67	1.08	0.77	28.35	10.93
CR001390	11.70	2.08	0.25	0.17	11.45	2.05
CR001391	36.78	12.41	1.96	1.01	34.82	11.56
CR001392	11.80	0.47	0.48	0.22	11.32	0.48
CR001393	12.28	1.22	1.16	0.07	11.12	1.15
CR001394	37.48	2.80	6.22	0.23	31.26	2.58
CR001395	45.91	0.19	12.56	0.92	33.36	0.83
CR001396	25.05	3.21	1.64	0.96	23.41	2.25
CR001397	37.76	0.32	5.62	0.22	32.14	0.29
CR001398	35.27	1.82	6.28	0.46	28.99	2.04
CR001399	71.45	1.71	1.67	0.45	69.79	1.33
CR001400	64.89	0.27	32.88	1.98	32.01	2.25
CR001401	31.26	5.01	1.71	0.54	29.56	5.45
CR001402	26.57	3.19	0.98	0.82	25.58	3.74
CR001403	24.34	3.84	10.35	4.25	13.99	0.41
CR001404	53.91	3.12	0.72	0.04	53.20	3.08
CR001405	24.19	5.35	2.28	1.12	21.91	4.32
CR001406	1.66	0.46	0.07	0.05	1.59	0.42
CR001407	27.19	2.85	3.42	0.54	23.78	2.54
CR001408	36.36	1.15	5.34	0.31	31.02	0.84
CR001409	26.69	2.03	15.78	1.89	10.91	0.67
CR001410	12.88	1.12	0.40	0.10	12.47	1.03
CR001411	4.85	0.52	0.11	0.08	4.74	0.46
CR001412	23.60	1.98	0.94	0.07	22.66	2.01
CR001413	31.95	8.50	4.83	1.47	27.12	7.22
CR001414	4.05	0.64	1.42	0.26	2.63	0.55

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR001415	24.47	3.35	0.47	0.32	24.00	3.04
CR001416	16.10	4.60	0.09	0.07	16.01	4.54
CR001417	23.38	5.00	0.70	0.27	22.68	4.75
CR001418	13.00	2.18	1.92	0.47	11.08	2.23
CR001419	2.37	0.30	0.33	0.13	2.04	0.22
CR001420	2.44	0.52	0.28	0.19	2.16	0.42
CR001421	31.76	7.50	7.01	0.99	24.75	6.58
CR001422	23.24	5.45	14.63	2.09	8.61	5.36
CR001423	3.76	1.80	0.36	0.02	3.40	1.79
CR001424	11.27	2.71	1.36	0.55	9.91	2.17
CR001425	38.20	1.94	0.45	0.12	37.75	2.05
CR001426	8.90	0.45	0.28	0.07	8.63	0.38
CR001427	33.70	0.91	0.77	0.26	32.93	0.76
CR001428	5.41	0.66	0.68	0.26	4.74	0.88
CR001429	20.46	5.24	1.21	0.80	19.24	4.50
CR001430	4.53	0.30	0.23	0.15	4.30	0.37
CR001431	10.56	2.64	4.04	0.34	6.53	2.58
CR001432	7.20	1.54	1.35	0.09	5.85	1.46
CR001433	42.38	4.26	4.77	0.54	37.61	3.88
CR001434	1.65	0.46	0.10	0.04	1.56	0.43
CR001435	11.24	1.60	0.67	0.19	10.58	1.41
CR001436	7.02	0.29	0.22	0.15	6.80	0.24
CR001437	15.86	1.38	1.98	0.45	13.88	1.81
CR001438	12.27	0.91	0.12	0.12	12.16	0.96
CR001439	49.32	2.14	11.45	1.62	37.86	2.53
CR001440	12.73	2.81	0.67	0.19	12.06	2.75
CR001441	7.62	0.65	0.55	0.21	7.06	0.44
CR001442	10.28	1.71	0.44	0.22	9.84	1.90
CR001443	11.67	0.45	0.86	0.18	10.81	0.27
CR001444	69.19	1.49	7.18	0.17	62.02	1.38
CR001445	3.54	1.36	0.51	0.56	3.03	0.81
CR001446	33.58	3.50	13.36	3.73	20.21	3.54

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR001447	36.92	3.24	2.06	0.75	34.86	3.49
CR001448	17.57	1.15	1.61	0.18	15.96	1.25
CR001449	39.92	4.34	0.42	0.30	39.50	4.04
CR001450	29.49	4.02	11.36	1.31	18.12	4.58
CR001451	36.02	6.92	3.93	0.78	32.09	6.14
CR001452	58.47	3.95	0.35	0.29	58.12	3.79
CR001453	12.20	0.67	0.18	0.05	12.02	0.63
CR001454	42.15	6.39	0.18	0.07	41.96	6.32
CR001474	3.50	0.55	1.10	0.15	2.40	0.44
CR001475	39.50	5.84	12.54	1.80	26.96	7.64
CR001476	61.10	7.94	0.40	0.07	60.70	7.99
CR001477	20.94	2.91	3.45	0.64	17.49	2.34
CR001478	14.40	3.43	0.72	0.13	13.67	3.30
CR001483	16.05	2.18	0.88	0.28	15.17	2.14
CR001484	7.21	2.01	0.48	0.33	6.74	1.71
CR003190	5.33	0.84	0.39	0.17	4.94	0.85
CR003191	10.58	1.38	1.02	0.29	9.56	1.38
CR003196	13.42	3.85	1.00	0.81	12.42	3.07
CR003204	9.35	2.05	0.91	0.37	8.44	1.74
CR003205	9.17	1.25	0.19	0.12	8.98	1.14
CR003206	1.85	0.04	0.07	0.03	1.78	0.02
CR003207	5.18	0.82	1.33	0.42	3.85	0.78
CR003208	25.18	6.59	2.17	0.88	23.01	5.82
CR003217	28.65	5.18	2.72	0.28	25.92	5.23
CR003218	19.42	2.62	0.61	0.32	18.80	2.80
CR003219	23.05	3.77	6.65	1.74	16.41	2.02
CR003220	4.47	0.58	0.73	0.24	3.75	0.55
CR003221	27.28	6.03	0.34	0.12	26.95	6.00
CR003222	8.96	3.22	0.20	0.20	8.76	3.11
CR003223	2.34	0.63	0.08	0.05	2.25	0.58
CR003224	6.15	0.89	1.40	0.35	4.75	0.55
CR003225	37.34	5.44	2.36	0.26	34.98	5.45

引導物ID	平均編輯%	標準差編輯%	平均Ins%	標準偏差Ins%	平均Del%	標準偏差Del%
CR003226	40.66	8.86	11.85	2.34	28.81	7.97
CR003227	4.49	0.87	0.37	0.30	4.12	1.17
CR003235	14.85	3.18	0.89	0.55	13.96	2.78
CR003236	49.76	2.18	0.67	0.34	49.09	1.84
CR003237	16.95	3.22	2.23	0.62	14.72	2.86
CR003238	8.94	1.34	0.52	0.10	8.42	1.26
CR003240	18.79	3.80	2.29	0.42	16.50	3.38
CR003241	9.49	1.91	1.62	0.50	7.88	1.43
CR003242	4.86	0.69	0.53	0.21	4.32	0.82
CR003243	4.02	1.43	0.22	0.17	3.80	1.27
CR003244	4.61	1.51	0.36	0.30	4.25	1.22
CR003245	6.01	3.48	0.44	0.11	5.56	3.41
CR003246	8.91	2.65	0.23	0.16	8.67	2.50

選自各細胞株之引導序列用於形成供用於進一步分析的30個crRNA之組(表7)。上覆有與外顯子2至外顯子5相關的所選*SERPINA1*引導物的染色體位置之示意圖展示在圖1中。編輯百分比及AAT分泌量展示在圖2中。

表7：靶向HUH7細胞中之SERPINA1的crRNA之ELISA及西方墨點法(WB)資料

引導物ID	編輯%	ELISA下降%	WB下降%
CR001370	89	78	16
CR001373	86	90	37
CR001374	84	86	28
CR001376	81	83	42
CR001379	87	78	58
CR001380	85	79	49
CR001386	74	74	43
CR001391	74	74	45
CR001392	64	71	37
CR001395	88	88	47

引導物ID	編輯%	ELISA下降%	WB下降%
CR001397	82	75	40
CR001400	96	92	57
CR001404	97	82	47
CR001405	84	81	70
CR001409	91	84	70
CR001413	92	88	72
CR001421	78	84	55
CR001422	88	91	36
CR001427	87	60	66
CR001439	79	89	54
CR001450	90	84	68
CR001453	82	85	49
CR001475	94	75	0
CR001476	95	78	16
CR003196	70	74	50
CR003208	92	88	68
CR003214	未獲得	未獲得	59
CR003217	80	87	23
CR003225	75	78	25
CR003226	未獲得	未獲得	38

2. SERPINA1引導物之脫靶分析

使用基於寡核苷酸插入之分析(參見例如Tsai等人, *Nature Biotechnology* 33, 187-197; 2015)來測定藉由靶向*SERPINA1*之Cas9裂解的可能存在之脫靶染色體組位點。如上文所述在HEK293-Cas9細胞中篩選表7中之30個引導物(及具有已知脫靶特徵之兩個對照引導物)，且脫靶結果標繪於圖3中。分析鑑別crRNA中之一些的可能存在之脫靶位點且鑑別沒有可偵測脫靶之其他者。

實例3.表型分析

1. 經分泌之α-1抗胰蛋白酶之ELISA分析

一式四份用來自表1之引導物如實例1中所述轉染肝細胞癌細胞株，HUH7。轉染後兩天，針對染色體組DNA及藉由NGS定序之分析收集一份。全部引導物，包括對照引導物，具有大於70%之編輯百分比，其中一些引導物達至95%。轉染後六天，為培養基採集準備一份以用於如先前所述藉由ELISA進行經分泌之AAT的分析。當與對照引導物相比時，全部AAT crRNA均會降低培養基中所分泌之AAT含量5至10倍。各引導物之編輯%及細胞外AAT之降低量的資料提供於表7中。

2. 胞內α-1抗胰蛋白酶之西方分析

用包含來自表1之引導物的crRNA如實例1中所述轉染肝細胞癌細胞株，HUH7。將經轉染之細胞池保留在組織培養物中且進行繼代以用於進一步分析。轉染後十一天，收集細胞且製備全細胞提取物(WCE)且如先前所述藉由西方墨點法進行分析。

當細胞繼代時，收集樣品且如本文所述針對NGS定序加以處理。隨時間推移針對編輯%比較自第2天、第23天、第32天及第40天選擇之樣品(表8)。此結果表明關於HUH7細胞生長不存在與AAT編輯相關聯之增殖性變化。

表8：HUH7細胞中編輯%之時間過程

引導物	第2天	第23天	第32天	第40天
CR001261	95	96	97	96
CR001263	66	70	71	70
CR001373	86	NA	83	85
CR001391	85	87	90	91
CR001400	96	89	90	90
CR001422	88	86	88	87
CR001427	85	93	95	93
CR001439	79	78	79	79
CR003208	92	91	92	94

針對AAT蛋白質之降低量藉由西方墨點法分析WCE。全長AAT蛋白質具有418個胺基酸，但該蛋白質在經分泌之前已大量糖基化。未糖基化AAT具有46 kD之預測分子量且在西方墨點法中之對照道(lane)中觀測到此分子量下之帶以及對應於不同AAT蛋白質物種之52及56 kD下之帶(圖4)。

使用Licor Odyssey Image Studio 5.2版軟體計算AAT蛋白質之下降百分比。使用GAPDH作為內參考物且同時用AAT進行探測。與涵蓋全部三個針對AAT之帶的總區域相比，計算各樣品中GAPDH之密度測定法值的比率。在將比率標準化為對照道之後，測定AAT蛋白質之下降百分比。結果展示在表7中。

3. 針對選定引導物之合併活體外資料

藉由分析本文所述之資料來產生針對獨立引導物之集中資料包。經由經分泌之AAT的降低量(ELISA)、總AAT蛋白質之降低量相對於額外帶之產生(西方墨點法)及脫靶分析之對比表徵主要候選物且加以等級排序。亦展現與食蟹獼猴之同源性，包括任何序列錯配(mm)。參見圖5至圖10。

實例4.將脂質奈米粒子(LNP)遞送至原生人類肝細胞(PHH)及HepG2細胞

在PHH及HepG2細胞上以劑量反應曲線測試Cas9 mRNA及靶向人類SERPINA1之經修飾sgRNA的脂質奈米粒子調配物。如實例1中所述塗鋪PHH及HepG2細胞(但以15,000個PHH細胞/孔，其與33,000個/孔形成對照)。在37℃，5% CO_2下培育細胞24小時，之後用LNP處理。實驗中所用之LNP如實例1中所述製備，各含有圖11及圖12中所指定之sgRNA及Cas9 mRNA。在37℃下在含有6%食蟹獼猴血清之肝細胞維持液中培育LNP持續5分鐘。培育後，以起始於100 ng mRNA之8點2倍劑量反應曲線將LNP添加於細胞上。如實例1中所述，處理後72小時裂解細胞以用於NGS分

析。兩種細胞類型中的引導序列之劑量反應曲線資料展示在圖11及圖12中。資料顯示，調配物對編輯HepG2細胞以及原生人類肝細胞兩者有效，其為人類中之預期活體內細胞靶向物。

實例5. 脂質奈米粒子(LNP)遞送及活體內人類PiZ變異體之編輯

向攜帶人類PiZ變異體之複本的轉殖基因小鼠投與實例4中所測試的六種LNP調配物中之五種及包含靶向鼠TTR基因之sgRNA的對照LNP。先前已描述PiZ轉殖基因小鼠(參見例如Carlson JA, Rogers BB, Sifers RN等人, Accumulation of PiZ alpha 1-antitrypsin causes liver damage in transgenic mice. J Clin Invest 1989;83:1183-1190)，且咸信其在串聯體異種接合之小鼠中攜載7至8個人類PiZ變異體之串聯複本(資料未示)。

在此研究中使用在15至39週齡範圍內的PiZ小鼠(雄性與雌性混合)。以0.2 mL之體積，以4 mg/kg (每公斤4 mg 總RNA含量)之劑量經由側尾靜脈向每隻動物(各群組n=5)投配LNP。投與LNP後兩週將動物安樂死。在LNP投與之前及屍體剖檢時收集血液用於血清分析。屍體剖檢時自各動物收集肝臟組織用於蛋白質及DNA提取，之後進行蛋白質定量(分別針對PiZ蛋白質之血清及組織含量進行ELISA及西方墨點分析)且使用實例1中所述之試劑及方法進行NGS分析。下表9顯示調配於所測試的各LNP中之sgRNA。

表9

sgRNA	LNP	標靶物
G000407	641	hAAT
G000408	642	hAAT
G000409	643	hAAT
G000413	644	hAAT
G000414	645	hAAT
G000282	647	mTTR

G000282 (* = PS鍵；'m' = 2'-O-Me核苷酸)：mU*mU*mA*CAGCC ACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGm CmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO:424)

如圖13A中所示，在各群組中偵測到SERPINA1 (或關於小鼠對照物之TTR)之PiZ變異體的穩定編輯，而在媒劑對照物(TSS = Tris/氯化鈉/蔗糖緩衝液)中未偵測到編輯。在實驗群組中的一些動物中亦未偵測到編輯，且隨後之基因型分析(資料未示)顯示，此等動物對於PiZ轉殖基因為陰性的，且因此預期將不會產生可偵測編輯、PiZ蛋白質表現或血清中PiZ分泌之基因減弱。此藉由蛋白質表現分析(ELISA及西方墨點法；參見圖13B及圖13C)得到進一步確認。

另外，PiZ變異體之編輯與經處理小鼠中血清含量方面的基因減弱相關。此外，如西方墨點法(圖13C)所示，編輯亦與肝臟組織中PiZ蛋白質之基因減弱相關。此等資料說明調配物對活體內人類PiZ對偶基因之基因減弱及分泌有效。

【序列表】

<110> 美商英特利亞醫療公司(INTELLIA THERAPEUTICS, INC.)

<120> 用於治療α-1抗胰蛋白酶缺乏症之組合物及方法

<130> 01155-0005-00PCT

<140> TW 106145118
<141> 2016-12-22

<150> US 62/438,219
<151> 2017-12-21

<160> 424

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 1
gccagacucc aaguucugcc 20

<210> 2
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 2
uaaggccagu ggaaagaauu 20

<210> 3
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 3
ggcagcgagg aguccacagu 20

<210> 4
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 4
ucuuuccacu ggccuuaacc 20

<210> 5
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 5
caaugccguc uucugucucg 20

<210> 6
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 6
aaugccgucu ucugucucgu 20

<210> 7
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 7

augccgucuu cugucucgug 20

<210> 8
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 8
augccccacg agacagaaga 20

<210> 9
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 9
cucgugggggc auccuccugc 20

<210> 10
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 10
ggauccucag ccagggagac 20

<210> 11
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 11
ucccuggcug aggauccccа 20

<210> 12
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 12
ucccuggggga uccucagcca 20

<210> 13
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 13
cucccuggggg auccucagcc 20

<210> 14
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 14
gugggaugua ucugucuucu 20

<210> 15
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 15
ggugggaugu aucugucuuc 20

<210> 16

<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 16
agauacaucc caccaugauc 20

<210> 17
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 17
ugggugaucc ugaucauggu 20

<210> 18
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 18
uugggugauc cugaucaugg 20

<210> 19
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 19
agguugggug auccugauca 20

<210> 20
<211> 20
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 20
gggugaucuu guugaagguu 20

<210> 21
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 21
ggggugaucu uguugaaggu 20

<210> 22
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 22
caacaagauc acccccaacc 20

<210> 23
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 23
aggcgaacuc agccagguug 20

<210> 24
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 24
gaaggcgaac ucagccaggu 20

<210> 25
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 25
ggcugaaggc gaacucagcc 20

<210> 26
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 26
cagcuggcgg uauaggcuga 20

<210> 27
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 27
cuucagccua uaccgccagc 20

<210> 28
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 28
ggugugccag cuggcgguau 20

<210> 29
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 29
uguuggacug gugugccagc 20

<210> 30
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 30
agauauuggu gcuguuggac 20

<210> 31
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 31
gaagaagaua uuggugcugu 20

<210> 32
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 32

cacuggggag aagaagauau 20

<210> 33
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 33
ggcuguagcg augcucacug 20

<210> 34
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 34
aggcuguagc gaugcucacu 20

<210> 35
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 35
aaggcuguag cgaugcucac 20

<210> 36
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 36
ugacacucac gaugaaaucc 20

<210> 37
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 37
cacucacgau gaaauccugg 20

<210> 38
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 38
acucacgaug aaauccugga 20

<210> 39
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 39
gguugaaauu caggcccucc 20

<210> 40
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 40
gggccugaau uucaaccuca 20

<210> 41

<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 41
uuucaaccuc acggagauuc 20

<210> 42
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 42
caaccucacg gagauuccgg 20

<210> 43
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 43
gagccuccgg aaucuccgug 20

<210> 44
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 44
ccggaggcuc agauccauga 20

<210> 45
<211> 20
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 45
ugaggguacg gaggaguucc 20

<210> 46
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 46
cuggcugguu gaggguacgg 20

<210> 47
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 47
cuggcugucu ggcugguuga 20

<210> 48
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 48
cuccagcuga ccaccggcaa 20

<210> 49
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 49
ggccauugcc gguggucagc 20

<210> 50
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 50
gaggaacagg ccauugccgg 20

<210> 51
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 51
gcugaggaac aggccauugc 20

<210> 52
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 52
caauggccug uuccucagcg 20

<210> 53
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 53
aauggccugu uccucagcga 20

<210> 54
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 54
ucaggcccuc gcugaggaac 20

<210> 55
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 55
cuagcuucag gcccucgcug 20

<210> 56
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 56
cagcgagggc cugaagcuag 20

<210> 57
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 57

aaaacuuauc cacuagcuuc 20

<210> 58
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 58
gaagcuagug gauaaguuuu 20

<210> 59
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 59
gcuaguggau aaguuuuugg 20

<210> 60
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 60
ugacagugaa ggcuucugag 20

<210> 61
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 61
aagccuucac ugucaacuuc 20

<210> 62
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 62
agccuucacu gucaacuucg 20

<210> 63
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 63
gucccgaag uugacaguga 20

<210> 64
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 64
caacuucggg gacaccgaag 20

<210> 65
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 65
gaucuguuuc uuggccucuu 20

<210> 66

<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 66
guaaucguug aucuguuucu 20

<210> 67
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 67
gaaacagauc aacgauuacg 20

<210> 68
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 68
gaucaacgau uacguggaga 20

<210> 69
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 69
aucaacgauu acguggagaa 20

<210> 70
<211> 20
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 70
uacguggaga aggguacuca 20

<210> 71
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 71
acguggagaa ggguacucaa 20

<210> 72
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 72
ucaagggaaa auuguggauu 20

<210> 73
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 73
gaaaauugug gauuugguca 20

<210> 74
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 74
cagagacaca guuuuugcuc 20

<210> 75
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 75
uccccucucu ccaggcaaau 20

<210> 76
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 76
cucggugucc uugacuucaa 20

<210> 77
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 77
cuuugaaguc aaggacaccg 20

<210> 78
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 78
cacguggaag uccucuuccu 20

<210> 79
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 79
cgaggaagag gacuuccacg 20

<210> 80
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 80
agaggacuuc cacguggacc 20

<210> 81
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 81
cgguggucac cugguccacg 20

<210> 82
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 82

ggaccaggug accaccguga 20

<210> 83
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 83
gcaccuucac gguggucacc 20

<210> 84
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 84
caucauaggc accuucacgg 20

<210> 85
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 85
gugccuauga ugaagcguuu 20

<210> 86
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 86
augccuaaac gcuucaucau 20

<210> 87
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 87
uggacagcuu cuuacagugc 20

<210> 88
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 88
cuguaagaag cuguccagcu 20

<210> 89
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 89
ggugcugcug augaaauacc 20

<210> 90
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 90
gugcugcuga ugaaauaccu 20

<210> 91

<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 91
agauggcggu ggcauugccc 20

<210> 92
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 92
aggcaggaag aagauggcgg 20

<210> 93
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 93
ggucagcaca gccuuaugca 20

<210> 94
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 94
agaaagggac ugaagcugcu 20

<210> 95
<211> 20
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 95
gaaagggacu gaagcugcug 20

<210> 96
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 96
ugcuggggcc auguuuuuag 20

<210> 97
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 97
gggguauggcc ucuaaaaaca 20

<210> 98
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 98
uguugaacuu gaccucgggg 20

<210> 99
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 99
ggguuuguug aacuugaccu 20

<210> 100
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 100
uucugggcag caucucccug 20

<210> 101
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 101
ucuucugggc agcaucuccc 20

<210> 102
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 102
uggacuggug ugccagcugg 20

<210> 103
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 103
agccuuugca augcucuccc 20

<210> 104
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 104
uucaucguga gugucagccu 20

<210> 105
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 105
ucuccgugag guugaaauuc 20

<210> 106
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 106
gucagcugga gcuggcuguc 20

<210> 107
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 107

agccagcucc agcugaccac 20

<210> 108
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 108
aucaggcagg aagaagaugg 20

<210> 109
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 109
caucuucuuc cugccugaug 20

<210> 110
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 110
aucuucuucc ugccugauga 20

<210> 111
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 111
cgauaucauc accaaguucc 20

<210> 112
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 112
cagaucauag guuccaguaa 20

<210> 113
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 113
aucacuaagg ucuucagcaa 20

<210> 114
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 114
ucacuaaggu cuucagcaau 20

<210> 115
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 115
cacuaagguc uucagcaaug 20

<210> 116

<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 116
cucaccuugg agagcuucag 20

<210> 117
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 117
ucucaccuug gagagcuuca 20

<210> 118
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 118
aucucaccuu ggagagcuuc 20

<210> 119
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 119
uuguugaacu ugaccucggg 20

<210> 120
<211> 20
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 120
uuuguugaac uugaccucgg 20

<210> 121
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 121
guuuguugaa cuugaccucg 20

<210> 122
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 122
gguuuguuga acuugaccuc 20

<210> 123
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 123
ucaaucauua agaagacaaa 20

<210> 124
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 124
uucaaucauu aagaagacaa 20

<210> 125
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 125
uaccaagucu ccccucuuca 20

<210> 126
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 126
accaagucuc cccucuucau 20

<210> 127
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 127
uccccucuuc augggaaaag 20

<210> 128
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 128
caccacuuuu cccaugaaga 20

<210> 129
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 129
ucaccacuuu ucccaugaag 20

<210> 130
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> n爲a、c、g或u

<400> 130
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 131
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 131
agccagcucc agcugaccac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 132
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 132
gcugaggaac aggccauugc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 133
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 133
acucacgaug aaauccugga guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 134
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 134
uuggggugauc cugaucaugg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 135
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 135
ugggugaucc ugaucauggu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 136
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 136
gaucuguuuc uuggccucuu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 137
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 137
gaaggcgaac ucagccaggu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 138
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 138
caaccucacg gagauuccgg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 139

<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 139
uguuggacug gugugccagc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 140
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 140
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 141
<211> 80
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 141
guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 142
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 142
gaggagtcca cagtaggatt gatt 24

<210> 143
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 143
agctagttgg taaggtcagt gtg 23

<210> 144
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 144
agctagttgg taaggtcagt gtg 23

<210> 145
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 145
agctagttgg taaggtcagt gtg 23

<210> 146
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 146
tcatggtggg atgtatctgt cttc 24

<210> 147

<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 147
tcatggtggg atgtatctgt cttc 24

<210> 148
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 148
tcatggtggg atgtatctgt cttc 24

<210> 149
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 149
gatcctgatc atggtgggat gtat 24

<210> 150
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 150
tcatggtggg atgtatctgt cttc 24

<210> 151
<211> 24
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 151
gatattggtg ctgttggact ggtg 24

<210> 152
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 152
atgctcactg gggagaagaa gata 24

<210> 153
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 153
atgctcactg gggagaagaa gata 24

<210> 154
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 154
atgctcactg gggagaagaa gata 24

<210> 155
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 155
gggagaagaa gatattggtg ctgt 24

<210> 156
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 156
gggagaagaa gatattggtg ctgt 24

<210> 157
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 157
gggagaagaa gatattggtg ctgt 24

<210> 158
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 158
gggagaagaa gatattggtg ctgt 24

<210> 159
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 159
gggagaagaa gatattggtg ctgt 24

<210> 160
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 160
gatattggtg ctgttggact ggtg 24

<210> 161
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 161
gggagaagaa gatattggtg ctgt 24

<210> 162
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 162
gggagaagaa gatattggtg ctgt 24

<210> 163
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 163

attgcaaagg ctgtagcgat gctc 24

<210> 164
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 164
attgcaaagg ctgtagcgat gctc 24

<210> 165
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 165
attgcaaagg ctgtagcgat gctc 24

<210> 166
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 166
attgcaaagg ctgtagcgat gctc 24

<210> 167
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 167
atttcatcgt gagtgtcagc ctt 23

<210> 168
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 168
atttcatcgt gagtgtcagc ctt 23

<210> 169
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 169
atttcatcgt gagtgtcagc ctt 23

<210> 170
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 170
atttcatcgt gagtgtcagc ctt 23

<210> 171
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 171
ccaggatttc atcgtgagtg tcag 24

<210> 172

<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 172
ctccaggatt tcatcgtgag tgtc 24

<210> 173
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 173
cggaatctcc gtgaggttga aat 23

<210> 174
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 174
cggaatctcc gtgaggttga aat 23

<210> 175
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 175
cggaatctcc gtgaggttga aat 23

<210> 176
<211> 24
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 176
ttcatggatc tgagcctccg gaat 24

<210> 177
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 177
aaaacttatc cactagcttc aggc 24

<210> 178
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 178
aaaacttatc cactagcttc aggc 24

<210> 179
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 179
aaaacttatc cactagcttc aggc 24

<210> 180
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 180
aaaacttatc cactagcttc aggc 24

<210> 181
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 181
aaaacttatc cactagcttc aggc 24

<210> 182
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 182
ttatccacta gcttcaggcc ctc 23

<210> 183
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 183
aggcttctga gtggtacaac tttt 24

<210> 184
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 184
aaaacttatc cactagcttc aggc 24

<210> 185
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 185
aggcttctga gtggtacaac tttt 24

<210> 186
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 186
aggcttctga gtggtacaac tttt 24

<210> 187
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 187
aggcttctga gtggtacaac tttt 24

<210> 188
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 188

aggcttctga gtggtacaac tttt 24

<210> 189
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 189
attttccctt gagtaccctt ctcc 24

<210> 190
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 190
attttccctt gagtaccctt ctcc 24

<210> 191
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 191
ttgagtaccc ttctccacgt aatc 24

<210> 192
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 192
attttccctt gagtaccctt ctcc 24

<210> 193
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 193
ccacaatttt cccttgagta ccct 24

<210> 194
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 194
tctccacgta atcgttgatc tgtt 24

<210> 195
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 195
tctccacgta atcgttgatc tgtt 24

<210> 196
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 196
tctccacgta atcgttgatc tgtt 24

<210> 197

<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 197
attttccctt gagtaccctt ctcc 24

<210> 198
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 198
tctccacgta atcgttgatc tgtt 24

<210> 199
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 199
tctccacgta atcgttgatc tgtt 24

<210> 200
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 200
aaaactgtgt ctctgtcaag ctcc 24

<210> 201
<211> 24
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 201
ccacaatttt cccttgagta ccct 24

<210> 202
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 202
gcaaccttac ctttaaagaa gatgtaat 28

<210> 203
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 203
gcaaccttac ctttaaagaa gatgtaat 28

<210> 204
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 204
acctttaaag aagatgtaat tcaccaga 28

<210> 205
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 205
acctttaaag aagatgtaat tcaccaga 28

<210> 206
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 206
acctttaaag aagatgtaat tcaccaga 28

<210> 207
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 207
acctttaaag aagatgtaat tcaccaga 28

<210> 208
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 208
gcaaccttac ctttaaagaa gatgtaat 28

<210> 209
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 209
cttgtttcta tgggaacagc tcag 24

<210> 210
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 210
cttgtttcta tgggaacagc tcag 24

<210> 211
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 211
cttgtttcta tgggaacagc tcag 24

<210> 212
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 212
cttgtttcta tgggaacagc tcag 24

<210> 213
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 213

cttgtttcta tgggaacagc tcag 24

<210> 214
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 214
cttgtttcta tgggaacagc tcag 24

<210> 215
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 215
aactgaagaa tccacgctga aaag 24

<210> 216
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 216
catgcctaaa cgcttcatca tagg 24

<210> 217
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 217
ggcattgccc aggtatttca tc 22

<210> 218
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 218
ggcattgccc aggtatttca tc 22

<210> 219
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 219
cattgcccag gtatttcatc agc 23

<210> 220
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 220
gttcattttc caggtgctgt agtt 24

<210> 221
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 221
gagttcattt tccaggtgct gtag 24

<210> 222

<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 222
gagttcattt tccaggtgct gtag 24

<210> 223
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 223
gagttcattt tccaggtgct gtag 24

<210> 224
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 224
tatcgtgggt gagttcattt tcca 24

<210> 225
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 225
tatcgtgggt gagttcattt tcca 24

<210> 226
<211> 24
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 226
gagttcattt tccaggtgct gtag 24

<210> 227
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 227
gagttcattt tccaggtgct gtag 24

<210> 228
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 228
tatcgtgggt gagttcattt tcca 24

<210> 229
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 229
tatcgtgggt gagttcattt tcca 24

<210> 230
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 230
aggaacttgg tgatgatatc gtgg 24

<210> 231
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 231
cttcattttc caggaacttg gtga 24

<210> 232
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 232
gggaatcacc ttctgtcttc attttc 26

<210> 233
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 233
gggaatcacc ttctgtcttc attttc 26

<210> 234
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 234
caaagggttt gttgaacttg acct 24

<210> 235
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 235
aggggagact tggtattttg ttca 24

<210> 236
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 236
aggggagact tggtattttg ttca 24

<210> 237
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 237
aggggagact tggtattttg ttca 24

<210> 238
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 238

aggggagact tggtattttg ttca 24

<210> 239
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 239
acccttcttt aatgtcatcc aggg 24

<210> 240
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 240
acccttcttt aatgtcatcc aggg 24

<210> 241
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 241
gatattggtg ctgttggact ggtg 24

<210> 242
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 242
gatattggtg ctgttggact ggtg 24

<210> 243
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 243
caggatttca tcgtgagtgt cagc 24

<210> 244
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 244
gttgagggta cggaggagtt c 21

<210> 245
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 245
aaaacttatc cactagcttc aggc 24

<210> 246
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 246
aaaacttatc cactagcttc aggc 24

<210> 247

<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 247
aggcttctga gtggtacaac tttt 24

<210> 248
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 248
attttccctt gagtaccctt ctcc 24

<210> 249
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 249
tcaccttctg tcttcatttt ccag 24

<210> 250
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 250
gtcccaacat ggctaagagg tg 22

<210> 251
<211> 22
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 251
gtcccaacat ggctaagagg tg 22

<210> 252
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 252
tatacagagt agcagtgacc cagg 24

<210> 253
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 253
tacagatacc agggtgcaac aag 23

<210> 254
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 254
ataccagggt gcaacaaggt cg 22

<210> 255
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 255
cccacacatt cttccctaca gata 24

<210> 256
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 256
cccacacatt cttccctaca gata 24

<210> 257
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 257
tcagtgaatc acgggcatct tc 22

<210> 258
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 258
gaatcacggg catcttcagg ag 22

<210> 259
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 259
tcagtgaatc acgggcatct tc 22

<210> 260
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 260
gctcaaccct tctttaatgt catcc 25

<210> 261
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 261
acccttcttt aatgtcatcc aggg 24

<210> 262
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 262
acccttcttt aatgtcatcc aggg 24

<210> 263
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 263

accttcttt aatgtcatcc aggg 24

<210> 264
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 264
accttcttt aatgtcatcc aggg 24

<210> 265
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 265
accttcttt aatgtcatcc aggg 24

<210> 266
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 266
gctcaaccct tctttaatgt catcc 25

<210> 267
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 267
gctcaaccct tctttaatgt catcc 25

<210> 268
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 268
aaacatggga gggatttaca gtca 24

<210> 269
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 269
gctcaaccct tctttaatgt catcc 25

<210> 270
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 270
gctcaaccct tctttaatgt catcc 25

<210> 271
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 271
guugaggaac aggccguugc 20

<210> 272

<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 272
acucacagug aaauccugga 20

<210> 273
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 273
gaagccgaac ucagccaggc 20

<210> 274
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 274
caacgucacg gagauuccgg 20

<210> 275

<400> 275
000

<210> 276

<400> 276
000

<210> 277

<400> 277
000

<210> 278

<400> 278
000

<210> 279

<400> 279
000

<210> 280
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 280
ccatcggacg atcctatctg atta 24

<210> 281
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 281
aaatcctaac tgggctggaa gg 22

<210> 282
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 282
aaatcctaac tgggctggaa gg 22

<210> 283
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 283
aaatcctaac tgggctggaa gg 22

<210> 284
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 284
cttggcacag gctggtttaa taat 24

<210> 285
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 285
cttggcacag gctggtttaa taat 24

<210> 286
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 286
cttggcacag gctggtttaa taat 24

<210> 287
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 287
ttctttcagt gttactgatg tcgg 24

<210> 288
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 288
cttggcacag gctggtttaa taat 24

<210> 289
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 289
gtgtcaatcc ctgatcactg gg 22

<210> 290
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 290
tcatcatgtg ccttgactcg g 21

<210> 291
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 291
tcatcatgtg ccttgactcg g 21

<210> 292
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 292
tcatcatgtg ccttgactcg g 21

<210> 293
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 293
gatcactggg agtcatcatg tgc 23

<210> 294
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 294
gatcactggg agtcatcatg tgc 23

<210> 295
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 295
gatcactggg agtcatcatg tgc 23

<210> 296
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 296
gatcactggg agtcatcatg tgc 23

<210> 297
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 297
gatcactggg agtcatcatg tgc 23

<210> 298
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 298
gtgtcaatcc ctgatcactg gg 22

<210> 299
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 299
gatcactggg agtcatcatg tgc 23

<210> 300
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 300
gatcactggg agtcatcatg tgc 23

<210> 301
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 301
gtcttgcagg acaatgccgt c 21

<210> 302
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 302
gtcttgcagg acaatgccgt c 21

<210> 303
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 303
gtcttgcagg acaatgccgt c 21

<210> 304
<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 304
gtcttgcagg acaatgccgt c 21

<210> 305
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 305
aatgccgtct tctgtctcgt g 21

<210> 306
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 306
aatgccgtct tctgtctcgt g 21

<210> 307
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 307
aatgccgtct tctgtctcgt g 21

<210> 308
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 308
aatgccgtct tctgtctcgt g 21

<210> 309
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 309
gagatgctgc ccagaagaca gata 24

<210> 310
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 310
ccagaagaca gatacatccc acc 23

<210> 311
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 311
ctgcccagaa gacagataca tcc 23

<210> 312
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 312
atgatcagga tcacccaacc ttc 23

<210> 313
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 313
atgatcagga tcacccaacc ttc 23

<210> 314
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 314
caccatgatc aggatcaccc aac 23

<210> 315
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 315
ctgagttcgc cttcagccta tac 23

<210> 316
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 316
ctgagttcgc cttcagccta tac 23

<210> 317
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 317
ctgagttcgc cttcagccta tac 23

<210> 318
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 318
ctgagttcgc cttcagccta tac 23

<210> 319
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 319
ccaacagcac caatatcttc ttct 24

<210> 320
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 320
ccaacagcac caatatcttc ttct 24

<210> 321
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 321
agtccaacag caccaatatc ttct 24

<210> 322
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 322
acagcaccaa tatcttcttc tccc 24

<210> 323
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 323
agtccaacag caccaatatc ttct 24

<210> 324
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 324
agtccaacag caccaatatc ttct 24

<210> 325
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 325
agtccaacag caccaatatc ttct 24

<210> 326
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 326
agtccaacag caccaatatc ttct 24

<210> 327
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 327
ctgacactca cgatgaaatc ctgg 24

<210> 328
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 328
ctgacactca cgatgaaatc ctgg 24

<210> 329
<211> 24

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 329
gatgaaatcc tggagggcct gaat 24

<210> 330
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 330
ctgacactca cgatgaaatc ctgg 24

<210> 331
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 331
atcctggagg gcctgaattt caac 24

<210> 332
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 332
aaggctgaca ctcacgatga aatc 24

<210> 333
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 333
aaggctgaca ctcacgatga aatc 24

<210> 334
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 334
aaggctgaca ctcacgatga aatc 24

<210> 335
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 335
ctgacactca cgatgaaatc ctgg 24

<210> 336
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 336
aaggctgaca ctcacgatga aatc 24

<210> 337
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 337
aaggctgaca ctcacgatga aatc 24

<210> 338
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 338
gagattccgg aggctcagat ccat 24

<210> 339
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 339
gatgaaatcc tggagggcct gaat 24

<210> 340
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 340
ggaactcctc cgtaccctca a 21

<210> 341
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 341
ggaactcctc cgtaccctca a 21

<210> 342
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 342
cttccaggaa ctcctccgta cc 22

<210> 343
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 343
cttccaggaa ctcctccgta cc 22

<210> 344
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 344
cttccaggaa ctcctccgta cc 22

<210> 345
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 345
cttccaggaa ctcctccgta cc 22

<210> 346
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 346
ggaactcctc cgtaccctca a 21

<210> 347
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 347
gggcctgaag ctagtggata ag 22

<210> 348
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 348
gggcctgaag ctagtggata ag 22

<210> 349
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 349
gggcctgaag ctagtggata ag 22

<210> 350
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 350
gggcctgaag ctagtggata ag 22

<210> 351
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 351
gggcctgaag ctagtggata ag 22

<210> 352
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 352
gggcctgaag ctagtggata ag 22

<210> 353
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 353
tcagaagcct tcactgtcaa cttc 24

<210> 354
<211> 24

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 354
gatggtcagt ttcagcacct ttta 24

<210> 355
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 355
gagggatgtg tgtcgtcaag g 21

<210> 356
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 356
gagggatgtg tgtcgtcaag g 21

<210> 357
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 357
ggaggggact catggtttct ttat 24

<210> 358
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 358
tggtttcttt attctgctac actct 25

<210> 359
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 359
attctgctac actcttccaa acct 24

<210> 360
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 360
attctgctac actcttccaa acct 24

<210> 361
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 361
attctgctac actcttccaa acct 24

<210> 362
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 362
tacactcttc caaaccttca ctca 24

<210> 363
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 363
tacactcttc caaaccttca ctca 24

<210> 364
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 364
attctgctac actcttccaa acct 24

<210> 365
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 365
attctgctac actcttccaa acct 24

<210> 366
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 366
tacactcttc caaaccttca ctca 24

<210> 367
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 367
tacactcttc caaaccttca ctca 24

<210> 368
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 368
aaatgggaga gacccтttga agtc 24

<210> 369
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 369
tttgaagtca aggacaccga ggaa 24

<210> 370
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 370
cctttgaagt caaggacacc gag 23

<210> 371
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 371
tttgaagtca aggacaccga ggaa 24

<210> 372
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 372
ctatgtgaca gggagggaga ggat 24

<210> 373
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 373
ctatgtgaca gggagggaga ggat 24

<210> 374
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 374
ctatgtgaca gggagggaga ggat 24

<210> 375
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 375
ctatgtgaca gggagggaga ggat 24

<210> 376
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 376
ctatgtgaca gggagggaga ggat 24

<210> 377
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 377
gatcagcctt acaacgtgtc tct 23

<210> 378
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 378
gatcagcctt acaacgtgtc tct 23

<210> 379
<211> 22

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 379
gtgtcaatcc ctgatcactg gg 22

<210> 380
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 380
gtgtcaatcc ctgatcactg gg 22

<210> 381
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 381
cttctgtctc gtggggcatc ctc 23

<210> 382
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 382
atgatcagga tcacccaacc ttc 23

<210> 383
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 383
ctgagttcgc cttcagccta tac 23

<210> 384
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 384
ctgagttcgc cttcagccta tac 23

<210> 385
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 385
agtccaacag caccaatatc ttct 24

<210> 386
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 386
ctgacactca cgatgaaatc ctgg 24

<210> 387
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 387
gagagaccct ttgaagtcaa ggac 24

<210> 388
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 388
gaaggtgcct atgatgaagc gt 22

<210> 389
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 389
gaaggtgcct atgatgaagc gt 22

<210> 390
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 390
ttaacatcca gcactgtaag aagc 24

<210> 391
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 391
aggagtaagt ggcagaaata atcaga 26

<210> 392
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 392
gacacaggag taagtggcag aaat 24

<210> 393
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 393
cagaagaaca agaggaatgc tgtg 24

<210> 394
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 394
cagaagaaca agaggaatgc tgtg 24

<210> 395
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 395
tctgccagct tacatttacc caaa 24

<210> 396
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 396
acaggtctgc cagcttacat ttac 24

<210> 397
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 397
tctgccagct tacatttacc caaa 24

<210> 398
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 398
ccttacaacg tgtctctgct tct 23

<210> 399
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 399
gatcagcctt acaacgtgtc tct 23

<210> 400
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 400
gatcagcctt acaacgtgtc tct 23

<210> 401
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 401
gatcagcctt acaacgtgtc tct 23

<210> 402
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 402
gatcagcctt acaacgtgtc tct 23

<210> 403
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 403
gatcagcctt acaacgtgtc tct 23

<210> 404
<211> 23

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 404
ccttacaacg tgtctctgct tct 23

<210> 405
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 405
ccttacaacg tgtctctgct tct 23

<210> 406
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 406
catcgacgag aaagggactg aag 23

<210> 407
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 407
ccttacaacg tgtctctgct tct 23

<210> 408
<211> 80
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 408
guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 409
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 409
ccttacaacg tgtctctgct tct 23

<210> 410
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> n爲a、c、g或u

<400> 410
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 411
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> n爲a、c、g或u

<400> 411
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 412
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> n爲a、c、g或u

<400> 412
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 413
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> n爲a、c、g或u

<400> 413
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 414
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> n爲a、c、g或u

<400> 414
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 415
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> n爲a、c、g或u

<400> 415
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 416
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> n爲a、c、g或u

<400> 416
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 417
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> n爲a、c、g或u

<400> 417
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 418
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> n爲a、c、g或u

<400> 418
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 419
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> n爲a、c、g或u

<400> 419
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 420
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> n爲a、c、g或u

<400> 420
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 421
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> n爲a、c、g或u

<400> 421
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 422
<211> 4526
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 422
taatacgact cactataggg tcccgcagtc ggcgtccagc ggctctgctt gttcgtgtgt 60

gtgtcgttgc aggccttatt cggatccatg gataagaagt actcaatcgg gctggatatc 120

ggaactaatt ccgtgggttg ggcagtgatc acggatgaat acaaagtgcc gtccaagaag 180

ttcaaggtcc tggggaacac cgatagacac agcatcaaga aaaatctcat cggagccctg 240

ctgtttgact ccggcgaaac cgcagaagcg acccggctca aacgtaccgc gaggcgacgc 300

tacacccggc ggaagaatcg catctgctat ctgcaagaga tcttttcgaa cgaaatggca 360

aaggtcgacg acagcttctt ccaccgcctg gaagaatctt tcctggtgga ggaggacaag 420

aagcatgaac ggcatcctat ctttggaaac atcgtcgacg aagtggcgta ccacgaaaag 480

tacccgacca tctaccatct gcggaagaag ttggttgact caactgacaa ggccgacctc 540

agattgatct acttggccct cgcccatatg atcaaattcc gcggacactt cctgatcgaa 600

ggcgatctga accctgataa ctccgacgtg gataagcttt tcattcaact ggtgcagacc 660

tacaaccaac tgttcgaaga aaacccaatc aatgctagcg gcgtcgatgc caaggccatc 720

ctgtccgccc ggctgtcgaa gtcgcggcgc ctcgaaaacc tgatcgcaca gctgccggga 780

gagaaaaaga acggactttt cggcaacttg atcgctctct cactgggact cactcccaat 840

ttcaagtcca attttgacct ggccgaggac gcgaagctgc aactctcaaa ggacacctac 900

gacgacgact tggacaattt gctggcacaa attggcgatc agtacgcgga tctgttcctt 960

gccgctaaga acctttcgga cgcaatcttg ctgtccgata tcctgcgcgt gaacaccgaa 1020

ataaccaaag cgccgcttag cgcctcgatg attaagcggt acgacgagca tcaccaggat 1080

ctcacgctgc tcaaagcgct cgtgagacag caactgcctg aaaagtacaa ggagatcttc 1140

ttcgaccagt ccaagaatgg gtacgcaggg tacatcgatg gaggcgctag ccaggaagag 1200

ttctataagt tcatcaagcc aatcctggaa aagatggacg gaaccgaaga actgctggtc 1260

aagctgaaca gggaggatct gctccggaaa cagagaacct ttgacaacgg atccattccc 1320

caccagatcc atctgggtga gctgcacgcc atcttgcggc gccaggagga cttttaccca 1380

ttcctcaagg acaaccggga aaagatcgag aaaattctga cgttccgcat cccgtattac 1440

gtgggcccac tggcgcgcgg caattcgcgc ttcgcgtgga tgactagaaa atcagaggaa 1500

accatcactc cttggaattt cgaggaagtt gtggataagg gagcttcggc acaaagcttc 1560

atcgaacgaa tgaccaactt cgacaagaat ctcccaaacg agaaggtgct tcctaagcac 1620

agcctccttt acgaatactt cactgtctac aacgaactga ctaaagtgaa atacgttact 1680

gaaggaatga ggaagccggc ctttctgtcc ggagaacaga agaaagcaat tgtcgatctg 1740

ctgttcaaga ccaaccgcaa ggtgaccgtc aagcagctta aagaggacta cttcaagaag 1800

atcgagtgtt tcgactcagt ggaaatcagc ggggtggagg acagattcaa cgcttcgctg 1860

ggaacctatc atgatctcct gaagatcatc aaggacaagg acttccttga caacgaggag 1920

aacgaggaca tcctggaaga tatcgtcctg accttgaccc ttttcgagga tcgcgagatg 1980

atcgaggaga ggcttaagac ctacgctcat ctcttcgacg ataaggtcat gaaacaactc 2040

aagcgccgcc ggtacactgg ttggggccgc ctctcccgca agctgatcaa cggtattcgc 2100

gataaacaga gcggtaaaac tatcctggat ttcctcaaat cggatggctt cgctaatcgt 2160

aacttcatgc aattgatcca cgacgacagc ctgaccttta aggaggacat ccaaaaagca 2220

caagtgtccg gacagggaga ctcactccat gaacacatcg cgaatctggc cggttcgccg 2280

gcgattaaga agggaattct gcaaactgtg aaggtggtcg acgagctggt gaaggtcatg 2340

ggacggcaca aaccggagaa tatcgtgatt gaaatggccc gagaaaacca gactacccag 2400

aagggccaga aaaactcccg cgaaaggatg aagcggatcg aagaaggaat caaggagctg 2460

ggcagccaga tcctgaaaga gcacccggtg gaaaacacgc agctgcagaa cgagaagctc 2520

tacctgtact atttgcaaaa tggacgggac atgtacgtgg accaagagct ggacatcaat 2580

cggttgtctg attacgacgt ggaccacatc gttccacagt cctttctgaa ggatgactcg 2640

atcgataaca aggtgttgac tcgcagcgac aagaacagag ggaagtcaga taatgtgcca 2700

tcggaggagg tcgtgaagaa gatgaagaat tactggcggc agctcctgaa tgcgaagctg 2760

attacccaga gaaagtttga caatctcact aaagccgagc gcggcggact ctcagagctg 2820

gataaggctg gattcatcaa acggcagctg gtcgagactc ggcagattac caagcacgtg 2880

gcgcagatct tggactcccg catgaacact aaatacgacg agaacgataa gctcatccgg 2940

gaagtgaagg tgattaccct gaaaagcaaa cttgtgtcgg actttcggaa ggactttcag 3000

ttttacaaag tgagagaaat caacaactac catcacgcgc atgacgcata cctcaacgct 3060

gtggtcggta ccgccctgat caaaaagtac cctaaacttg aatcggagtt tgtgtacgga 3120

gactacaagg tctacgacgt gaggaagatg atagccaagt ccgaacagga aatcgggaaa 3180

gcaactgcga aatacttctt ttactcaaac atcatgaact ttttcaagac tgaaattacg 3240

ctggccaatg gagaaatcag gaagaggcca ctgatcgaaa ctaacggaga aacgggcgaa 3300

atcgtgtggg acaagggcag ggacttcgca actgttcgca aagtgctctc tatgccgcaa 3360

gtcaatattg tgaagaaaac cgaagtgcaa accggcggat tttcaaagga atcgatcctc 3420

ccaaagagaa atagcgacaa gctcattgca cgcaagaaag actgggaccc gaagaagtac 3480

ggaggattcg attcgccgac tgtcgcatac tccgtcctcg tggtggccaa ggtggagaag 3540

ggaaagagca aaaagctcaa atccgtcaaa gagctgctgg ggattaccat catggaacga 3600

tcctcgttcg agaagaaccc gattgatttc ctcgaggcga agggttacaa ggaggtgaag 3660

aaggatctga tcatcaaact ccccaagtac tcactgttcg aactggaaaa tggtcggaag 3720

cgcatgctgg cttcggccgg agaactccaa aaaggaaatg agctggcctt gcctagcaag 3780

tacgtcaact tcctctatct tgcttcgcac tacgaaaaac tcaaagggtc accggaagat 3840

aacgaacaga agcagctttt cgtggagcag cacaagcatt atctggatga aatcatcgaa 3900

caaatctccg agttttcaaa gcgcgtgatc ctcgccgacg ccaacctcga caaagtcctg 3960

tcggcctaca ataagcatag agataagccg atcagagaac aggccgagaa cattatccac 4020

ttgttcaccc tgactaacct gggagcccca gccgccttca agtacttcga tactactatc 4080

gatcgcaaaa gatacacgtc caccaaggaa gttctggacg cgaccctgat ccaccaaagc 4140

atcactggac tctacgaaac taggatcgat ctgtcgcagc tgggtggcga tggcggtgga 4200

tctccgaaaa agaagagaaa ggtgtaatga gctagccatc acatttaaaa gcatctcagc 4260

ctaccatgag aataagagaa agaaaatgaa gatcaatagc ttattcatct ctttttcttt 4320

ttcgttggtg taaagccaac accctgtcta aaaaacataa atttctttaa tcattttgcc 4380

tcttttctct gtgcttcaat taataaaaaa tggaaagaac ctcgagaaaa aaaaaaaaaa 4440

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4500

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 4526

<210> 423
<211> 4615
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 423
taatacgact cactataggg tcccgcagtc ggcgtccagc ggctctgctt gttcgtgtgt 60

gtgtcgttgc aggccttatt cggatccatg gataagaagt actcaatcgg gctggatatc 120

ggaactaatt ccgtgggttg ggcagtgatc acggatgaat acaaagtgcc gtccaagaag 180

ttcaaggtcc tggggaacac cgatagacac agcatcaaga aaaatctcat cggagccctg 240

ctgtttgact ccggcgaaac cgcagaagcg acccggctca aacgtaccgc gaggcgacgc 300

tacacccggc ggaagaatcg catctgctat ctgcaagaga tcttttcgaa cgaaatggca 360

aaggtcgacg acagcttctt ccaccgcctg gaagaatctt tcctggtgga ggaggacaag 420

aagcatgaac ggcatcctat ctttggaaac atcgtcgacg aagtggcgta ccacgaaaag 480

tacccgacca tctaccatct gcggaagaag ttggttgact caactgacaa ggccgacctc 540

agattgatct acttggccct cgcccatatg atcaaattcc gcggacactt cctgatcgaa 600

ggcgatctga accctgataa ctccgacgtg gataagcttt tcattcaact ggtgcagacc 660

tacaaccaac tgttcgaaga aaacccaatc aatgctagcg gcgtcgatgc caaggccatc 720

ctgtccgccc ggctgtcgaa gtcgcggcgc ctcgaaaacc tgatcgcaca gctgccggga 780

gagaaaaaga acggactttt cggcaacttg atcgctctct cactgggact cactcccaat 840

ttcaagtcca attttgacct ggccgaggac gcgaagctgc aactctcaaa ggacacctac 900

gacgacgact tggacaattt gctggcacaa attggcgatc agtacgcgga tctgttcctt 960

gccgctaaga acctttcgga cgcaatcttg ctgtccgata tcctgcgcgt gaacaccgaa 1020

ataaccaaag cgccgcttag cgcctcgatg attaagcggt acgacgagca tcaccaggat 1080

ctcacgctgc tcaaagcgct cgtgagacag caactgcctg aaaagtacaa ggagatcttc 1140

ttcgaccagt ccaagaatgg gtacgcaggg tacatcgatg gaggcgctag ccaggaagag 1200

ttctataagt tcatcaagcc aatcctggaa aagatggacg gaaccgaaga actgctggtc 1260

aagctgaaca gggaggatct gctccggaaa cagagaacct ttgacaacgg atccattccc 1320

caccagatcc atctgggtga gctgcacgcc atcttgcggc gccaggagga cttttaccca 1380

ttcctcaagg acaaccggga aaagatcgag aaaattctga cgttccgcat cccgtattac 1440

gtgggcccac tggcgcgcgg caattcgcgc ttcgcgtgga tgactagaaa atcagaggaa 1500

accatcactc cttggaattt cgaggaagtt gtggataagg gagcttcggc acaaagcttc 1560

atcgaacgaa tgaccaactt cgacaagaat ctcccaaacg agaaggtgct tcctaagcac 1620

agcctccttt acgaatactt cactgtctac aacgaactga ctaaagtgaa atacgttact 1680

gaaggaatga ggaagccggc ctttctgtcc ggagaacaga agaaagcaat tgtcgatctg 1740

ctgttcaaga ccaaccgcaa ggtgaccgtc aagcagctta aagaggacta cttcaagaag 1800

atcgagtgtt tcgactcagt ggaaatcagc ggggtggagg acagattcaa cgcttcgctg 1860

ggaacctatc atgatctcct gaagatcatc aaggacaagg acttccttga caacgaggag 1920

aacgaggaca tcctggaaga tatcgtcctg accttgaccc ttttcgagga tcgcgagatg 1980

atcgaggaga ggcttaagac ctacgctcat ctcttcgacg ataaggtcat gaaacaactc 2040

aagcgccgcc ggtacactgg ttggggccgc ctctcccgca agctgatcaa cggtattcgc 2100

gataaacaga gcggtaaaac tatcctggat ttcctcaaat cggatggctt cgctaatcgt 2160

aacttcatgc aattgatcca cgacgacagc ctgaccttta aggaggacat ccaaaaagca 2220

caagtgtccg gacagggaga ctcactccat gaacacatcg cgaatctggc cggttcgccg 2280

gcgattaaga agggaattct gcaaactgtg aaggtggtcg acgagctggt gaaggtcatg 2340

ggacggcaca aaccggagaa tatcgtgatt gaaatggccc gagaaaacca gactacccag 2400

aagggccaga aaaactcccg cgaaaggatg aagcggatcg aagaaggaat caaggagctg 2460

ggcagccaga tcctgaaaga gcacccggtg gaaaacacgc agctgcagaa cgagaagctc 2520

tacctgtact atttgcaaaa tggacgggac atgtacgtgg accaagagct ggacatcaat 2580

cggttgtctg attacgacgt ggaccacatc gttccacagt cctttctgaa ggatgactcg 2640

atcgataaca aggtgttgac tcgcagcgac aagaacagag ggaagtcaga taatgtgcca 2700

tcggaggagg tcgtgaagaa gatgaagaat tactggcggc agctcctgaa tgcgaagctg 2760

attacccaga gaaagtttga caatctcact aaagccgagc gcggcggact ctcagagctg 2820

gataaggctg gattcatcaa acggcagctg gtcgagactc ggcagattac caagcacgtg 2880

gcgcagatct tggactcccg catgaacact aaatacgacg agaacgataa gctcatccgg 2940

gaagtgaagg tgattaccct gaaaagcaaa cttgtgtcgg actttcggaa ggactttcag 3000

ttttacaaag tgagagaaat caacaactac catcacgcgc atgacgcata cctcaacgct 3060

gtggtcggta ccgccctgat caaaaagtac cctaaacttg aatcggagtt tgtgtacgga 3120

gactacaagg tctacgacgt gaggaagatg atagccaagt ccgaacagga aatcgggaaa 3180

gcaactgcga aatacttctt ttactcaaac atcatgaact ttttcaagac tgaaattacg 3240

ctggccaatg gagaaatcag gaagaggcca ctgatcgaaa ctaacggaga aacgggcgaa 3300

atcgtgtggg acaagggcag ggacttcgca actgttcgca aagtgctctc tatgccgcaa 3360

gtcaatattg tgaagaaaac cgaagtgcaa accggcggat tttcaaagga atcgatcctc 3420

ccaaagagaa atagcgacaa gctcattgca cgcaagaaag actgggaccc gaagaagtac 3480

ggaggattcg attcgccgac tgtcgcatac tccgtcctcg tggtggccaa ggtggagaag 3540

ggaaagagca aaaagctcaa atccgtcaaa gagctgctgg ggattaccat catggaacga 3600

tcctcgttcg agaagaaccc gattgatttc ctcgaggcga agggttacaa ggaggtgaag 3660

aaggatctga tcatcaaact ccccaagtac tcactgttcg aactggaaaa tggtcggaag 3720

cgcatgctgg cttcggccgg agaactccaa aaaggaaatg agctggcctt gcctagcaag 3780

tacgtcaact tcctctatct tgcttcgcac tacgaaaaac tcaaagggtc accggaagat 3840

aacgaacaga agcagctttt cgtggagcag cacaagcatt atctggatga aatcatcgaa 3900

caaatctccg agttttcaaa gcgcgtgatc ctcgccgacg ccaacctcga caaagtcctg 3960

tcggcctaca ataagcatag agataagccg atcagagaac aggccgagaa cattatccac 4020

ttgttcaccc tgactaacct gggagcccca gccgccttca agtacttcga tactactatc 4080

gatcgcaaaa gatacacgtc caccaaggaa gttctggacg cgaccctgat ccaccaaagc 4140

atcactggac tctacgaaac taggatcgat ctgtcgcagc tgggtggcga tggctcggct 4200

tacccatacg acgtgcctga ctacgcctcg ctcggatcgg gctcccccaa aaagaaacgg 4260

aaggtggacg gatccccgaa aaagaagaga aaggtggact ccggatgaga attatgcagt 4320

ctagccatca catttaaaag catctcagcc taccatgaga ataagagaaa gaaaatgaag 4380

atcaatagct tattcatctc ttttttcttt tcgttggtgt aaagccaaca ccctgtctaa 4440

aaaacataaa tttctttaat cattttgcct cttttctctg tgcttcaatt aataaaaaat 4500

ggaaagaacc tcgagaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4560

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 4615

<210> 424
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 424
uuacagccac gucuacagca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

202509233

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種誘發*SERPINA1*基因中之雙鏈斷裂(DSB)之方法，該方法包括向細胞遞送組合物，其中該組合物包含引導RNA，該引導RNA包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列或與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

【請求項2】

一種修飾*SERPINA1*基因之方法，該方法包括向細胞遞送組合物，其中該組合物包含(i)經RNA引導之DNA結合劑或編碼經RNA引導之DNA結合劑的核酸及(ii)引導RNA，其包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列或與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

【請求項3】

一種治療α-1抗胰蛋白酶缺乏症(AATD)之方法，該方法包括向有需要之個體投與組合物，藉此治療AATD，其中該組合物包含(i)經RNA引導之DNA結合劑或編碼經RNA引導之DNA結合劑的核酸及(ii)引導RNA，其包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列或與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

【請求項4】

一種減少或防止α-1抗胰蛋白酶(AAT)在個體之肝臟中積聚的方法，

該方法包括向有需要之個體投與組合物，藉此減少AAT在肝臟中積聚，其中該組合物包含(i)經RNA引導之DNA結合劑或編碼經RNA引導之DNA結合劑的核酸及(ii)引導RNA，其包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列或與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

【請求項5】

一種組合物，其包含引導RNA，該引導RNA包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列或與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

【請求項6】

一種組合物，其包含編碼引導RNA之載體，其中該引導RNA包含選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列或與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

【請求項7】

如請求項5或6之組合物，其用於誘發細胞或個體之*SERPINA1*基因中之雙鏈斷裂(DSB)。

【請求項8】

如請求項5或6之組合物，其用於修飾細胞或個體中之*SERPINA1*基因。

【請求項9】

如請求項5或6之組合物，其用於治療個體中之α-1抗胰蛋白酶缺乏症(AATD)。

【請求項10】

如請求項5或6之組合物，其用於降低個體中之血清或肝臟AAT濃度。

【請求項11】

如請求項5或6之組合物，其用於減少或防止α-1抗胰蛋白酶(AAT)在個體之肝臟中積聚。

【請求項12】

如請求項1至4中任一項之方法或如請求項5至11中任一項所使用之組合物，其中該組合物會降低血清及/或肝臟AAT含量。

【請求項13】

如請求項12所使用之方法或組合物，其中相較於投與該組合物之前的血清及/或AAT含量，該等血清及/或肝臟AAT含量降低至少40%。

【請求項14】

如請求項12所使用之方法或組合物，其中相較於投與該組合物之前的血清及/或AAT含量，該等血清及/或肝臟AAT含量降低40%至50%、50%至60%、60%至70%、70%至80%、80%至90%、90%至95%、95%至98%、98%至99%或99%至100%。

【請求項15】

如請求項1至4或7至14中任一項所使用之方法或組合物，其中該組合物引起編輯*SERPINA1*基因。

【請求項16】

如請求項15所使用之方法或組合物，其中該編輯係計算所編輯的基因群之百分比(編輯百分比)。

【請求項17】

如請求項16所使用之方法或組合物，其中該編輯百分比在30%與99%之間。

【請求項18】

如請求項17所使用之方法或組合物，其中該編輯百分比在30%與35%之間、35%與40%之間、40%與45%之間、45%與50%之間、50%與55%之間、55%與60%之間、60%與65%之間、65%與70%之間、70%與75%之間、75%與80%之間、80%與85%之間、85%與90%之間、90%與95%之間或95%與99%之間。

【請求項19】

如請求項1至4或7至18中任一項所使用之方法或組合物，其中投與或遞送該組合物至少兩次。

【請求項20】

如請求項19所使用之方法或組合物，其中投與或遞送該組合物至少三次。

【請求項21】

如請求項19所使用之方法或組合物，其中投與或遞送該組合物至少四次。

【請求項22】

如請求項19所使用之方法或組合物，其中投與或遞送該組合物至多五、六、七、八、九或十次。

【請求項23】

如請求項19至22中任一項所使用之方法或組合物，其中該投與或遞送以1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15天之間隔進行。

【請求項24】

如請求項19至22中任一項所使用之方法或組合物，其中該投與或遞送以1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15週之間隔進行。

【請求項25】

如請求項19至22中任一項所使用之方法或組合物，其中該投與或遞送以1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個月之間隔進行。

【請求項26】

如前述請求項中任一項之方法或組合物，其中該引導序列係選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129。

【請求項27】

如前述請求項中任一項之方法或組合物，其中該引導RNA與人類*SERPINA1*基因中所存在之靶序列至少部分互補。

【請求項28】

如請求項27之方法或組合物，其中該靶序列處於人類*SERPINA1*基因之外顯子2、3、4或5中。

【請求項29】

如請求項27之方法或組合物，其中該靶序列處於人類*SERPINA1*基因

之外顯子2中。

【請求項30】

如請求項27之方法或組合物，其中該靶序列處於人類*SERPINA1*基因之外顯子3中。

【請求項31】

如請求項27之方法或組合物，其中該靶序列處於人類*SERPINA1*基因之外顯子4中。

【請求項32】

如請求項27之方法或組合物，其中該靶序列處於人類*SERPINA1*基因之外顯子5中。

【請求項33】

如請求項1至32中任一項之方法或組合物，其中該引導序列與*SERPINA1*之正鏈中的靶序列互補。

【請求項34】

如請求項1至32中任一項之方法或組合物，其中該引導序列與*SERPINA1*之負鏈中的靶序列互補。

【請求項35】

如請求項1至32中任一項之方法或組合物，其進一步包含第二引導序列，其中第一引導序列與*SERPINA1*基因之正鏈中的第一靶序列互補，且其中該第二引導序列與*SERPINA1*基因之負鏈中的第二靶序列互補。

【請求項36】

如前述請求項中任一項之方法或組合物，其中該引導RNA包含crRNA，其包含該引導序列且進一步包含SEQ ID NO:140之核苷酸序列，

其中SEQ ID NO:140之核苷酸在該引導序列之3'端後。

【請求項37】

如前述請求項中任一項之方法或組合物，其中該引導RNA為雙引導(dgRNA)。

【請求項38】

如請求項37之方法或組合物，其中該雙引導RNA包含crRNA及trRNA，該crRNA包含SEQ ID NO:140之核苷酸序列，其中SEQ ID NO:140之核苷酸在該引導序列之3'端後。

【請求項39】

如請求項1至36中任一項之方法或組合物，其中該引導RNA為單引導(sgRNA)。

【請求項40】

如請求項39之方法或組合物，其中該sgRNA包含具有SEQ ID NO:130之修飾的引導序列。

【請求項41】

如請求項39之方法或組合物，其中該sgRNA包含SEQ ID NO:130。

【請求項42】

如請求項40或41之方法或組合物，其中SEQ ID NO:130中之各N為任何天然或非天然核苷酸，其中該等N形成該引導序列，且該引導序列使經RNA引導之DNA結合劑靶向*SERPINA1*基因。

【請求項43】

如請求項39至42中任一項之方法或組合物，其中該sgRNA包含該等SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列及該等SEQ ID NO:140之核

苷酸中之任一者。

【請求項44】

如請求項39至43中任一項之方法或組合物，其中該sgRNA包含與選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%或90%一致性之引導序列。

【請求項45】

如請求項42之方法或組合物，其中SEQ ID NO:130中之各N共同地經選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之引導序列置換。

【請求項46】

如前述請求項中任一項之方法或組合物，其中該引導RNA包含至少一種修飾。

【請求項47】

如請求項46之方法或組合物，其中該至少一種修飾包括經2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾之核苷酸。

【請求項48】

如請求項46或47之方法或組合物，其中該至少一種修飾包括各核苷酸之間的硫代磷酸酯(PS)鍵。

【請求項49】

如請求項46至48中任一項之方法或組合物，其中該至少一種修飾包括經2'-氟基(2'-F)修飾之核苷酸。

【請求項50】

如請求項46至49中任一項之方法或組合物，其中該至少一種修飾包括在5’端前五個核苷酸中之一或多處進行修飾。

【請求項51】

如請求項46至50中任一項之方法或組合物，其中該至少一種修飾包括在3’端最後五個核苷酸中之一或多處進行修飾。

【請求項52】

如請求項46至51中任一項之方法或組合物，其中該至少一種修飾包括在前四個核苷酸之間的PS鍵。

【請求項53】

如請求項46至52中任一項之方法或組合物，其中該至少一種修飾包括在最後四個核苷酸之間的PS鍵。

【請求項54】

如請求項46至53中任一項之方法或組合物，其中該至少一種修飾包括在5’端前三個核苷酸處的經2'-O-Me修飾之核苷酸。

【請求項55】

如請求項46至54中任一項之方法或組合物，其中該至少一種修飾包括在3’端最後三個核苷酸處的經2'-O-Me修飾之核苷酸。

【請求項56】

如請求項46至55中任一項之方法或組合物，其中該引導RNA包含SEQ ID NO:130之經修飾核苷酸。

【請求項57】

如請求項1至56中任一項之方法或組合物，其中該組合物進一步包含醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項58】

如請求項1至57中任一項之方法或組合物，其中該引導RNA及視情況

選用之該經RNA引導之DNA結合劑或編碼經RNA引導之DNA結合劑之核酸係與脂質奈米粒子(LNP)締合。

【請求項59】

如請求項58之方法或組合物，其中該LNP包含CCD脂質。

【請求項60】

如請求項59之方法或組合物，其中該CCD脂質為脂質A。

【請求項61】

如請求項58至60之方法或組合物，其中該LNP包含中性脂質。

【請求項62】

如請求項61之方法或組合物，其中該中性脂質為DSPC。

【請求項63】

如請求項58至62中任一項之方法或組合物，其中該LNP包含輔助脂質。

【請求項64】

如請求項63之方法或組合物，其中該輔助脂質為膽固醇。

【請求項65】

如請求項58至64中任一項之方法或組合物，其中該LNP包含隱形脂質(stealth lipid)。

【請求項66】

如請求項58至65之方法或組合物，其中該隱形脂質為PEG2k-DMG。

【請求項67】

如前述請求項中任一項之方法或組合物，其中該組合物進一步包含

經RNA引導之DNA結合劑。

【請求項68】

如前述請求項中任一項之方法或組合物，其中該組合物進一步包含編碼經RNA引導之DNA結合劑的mRNA。

【請求項69】

如請求項67或68之方法或組合物，其中該經RNA引導之DNA結合劑為Cas裂解酶。

【請求項70】

如請求項69之方法或組合物，其中該經RNA引導之DNA結合劑為Cas9。

【請求項71】

如請求項67至70中任一項之方法或組合物，其中該經RNA引導之DNA結合劑係經修飾。

【請求項72】

如請求項67至71中任一項之方法或組合物，其中該經RNA引導之DNA結合劑為切口酶(nickase)。

【請求項73】

如請求項71或72之方法或組合物，其中該經修飾的經RNA引導之DNA結合劑包含核定位信號(NLS)。

【請求項74】

如請求項67至73中任一項之方法或組合物，其中該經RNA引導之DNA結合劑為來自II型CRISPR/Cas系統之Cas。

【請求項75】

如前述請求項中任一項之方法或組合物，其中該組合物為醫藥調配物且進一步包含醫藥學上可接受之載劑。

【請求項76】

如請求項1至4或7至75中任一項所使用之方法或組合物，其中該組合物會減少或防止α-1抗胰蛋白酶(AAT)在肝臟中積聚。

【請求項77】

如請求項76所使用之方法或組合物，其中該AAT為變形的。

【請求項78】

如請求項1至4或7至77中任一項所使用之方法或組合物，其中非同源末端連接(non-homologous ending joining；NHEJ)在修復*SERPINA1*基因中之DSB期間引起突變。

【請求項79】

如請求項78所使用之方法或組合物，其中NHEJ在修復*SERPINA1*基因中之DSB期間引起核苷酸缺失或插入。

【請求項80】

如請求項79所使用之方法或組合物，其中核苷酸之該缺失或插入誘發*SERPINA1*基因中發生框移或無意義突變。

【請求項81】

如請求項80所使用之方法或組合物，其中在至少50%之肝臟細胞的*SERPINA1*基因中誘發框移或無意義突變。

【請求項82】

如請求項81所使用之方法或組合物，其中在50%至60%、60%至70%、70%或80%、80%至90%、90%至95%、95%至99%或99%至100%

之肝臟細胞的*SERPINA1*基因中誘發框移或無意義突變。

【請求項83】

如請求項79至82中任一項所使用之方法或組合物，其中發生在*SERPINA1*基因中的核苷酸缺失或插入為在脫靶位點處的至少50倍或大於50倍。

【請求項84】

如請求項83所使用之方法或組合物，其中發生在*SERPINA1*基因中的核苷酸缺失或插入比在脫靶位點處多50倍至150倍、150倍至500倍、500倍至1500倍、1500倍至5000倍、5000倍至15000倍、15000倍至30000倍或30000倍至60000倍。

【請求項85】

如請求項1至4或7至84中任一項所使用之方法或組合物，其中投與該組合物會降低該個體中之AAT含量。

【請求項86】

如請求項85所使用之方法或組合物，其中該等AAT含量降低至少40%。

【請求項87】

如請求項86所使用之方法或組合物，其中該等AAT含量降低40%至50%、50%至60%、60%至70%、70%或80%、80%至90%、90%至95%、95%至99%或99%至100%。

【請求項88】

如請求項86或87所使用之方法或組合物，其中在血清、血漿、血液、大腦脊髓液或痰中量測該等AAT含量。

【請求項89】

如請求項86或87所使用之方法或組合物，其中在肝臟及/或血清中量測該等AAT含量。

【請求項90】

如請求項85至89中任一項所使用之方法或組合物，其中經由酶聯免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay；ELISA)量測該等AAT含量。

【請求項91】

如請求項1至4或7至90中任一項所使用之方法或組合物，其中該個體患有AATD。

【請求項92】

如請求項1至4或7至91中任一項所使用之方法或組合物，其中該個體為人類。

【請求項93】

如請求項91或92所使用之方法或組合物，其中該個體患有AATD。

【請求項94】

如請求項91或92所使用之方法或組合物，其中該個體患有遺傳性AATD。

【請求項95】

如請求項1至4、7至92或94中任一項所使用之方法或組合物，其中該個體具有AATD家族病史。

【請求項96】

如請求項1至4或7至95中任一項所使用之方法或組合物，其中該個體

僅具有或主要具有AATD之肝臟症狀。

【請求項97】

如請求項1至4或7至96中任一項所使用之方法或組合物，其中該個體在SERPINA1基因座的Z對偶基因為異種接合的。

【請求項98】

如請求項97之方法，其中該個體在SERPINA1基因座處具有一個Z對偶基因及一個S對偶基因。

【請求項99】

如請求項1至4或7至98中任一項所使用之方法或組合物，其中該個體在AAT之胺基酸序列處不具有E342K突變，但具有降低含量之野生型AAT。

【請求項100】

如請求項1至4或7至99中任一項所使用之方法或組合物，其中該個體之水腫、腹水或黃疸有所改善、穩定或減緩，或已延緩對肝臟移植之需要。

【請求項101】

如請求項1至4或7至99中任一項所使用之方法或組合物，其中如藉由成像方法或肝酶含量所量測，個體由於投藥而具有改善、穩定或減緩變化。

【請求項102】

如請求項1至4或7至101中任一項所使用之方法或組合物，其中該組合物或醫藥調配物經由病毒載體投與。

【請求項103】

如請求項1至4或7至102中任一項所使用之方法或組合物，其中該組合物或醫藥調配物經由脂質奈米粒子投與。

【請求項104】

如請求項1至4或7至103中任一項所使用之方法或組合物，其中在投與該組合物或調配物之前，測試該個體之*SERPINA1*基因中之特定突變。

【請求項105】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:5。

【請求項106】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:6。

【請求項107】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:7。

【請求項108】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:8。

【請求項109】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:9。

【請求項110】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:10。

【請求項111】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:11。

【請求項112】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:12。

【請求項113】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:13。

【請求項114】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:14。

【請求項115】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:15。

【請求項116】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:16。

【請求項117】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:17。

【請求項118】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5

至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:18。

【請求項119】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:19。

【請求項120】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:20。

【請求項121】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:21。

【請求項122】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:22。

【請求項123】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:23。

【請求項124】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:24。

【請求項125】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:25。

【請求項126】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:26。

【請求項127】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:27。

【請求項128】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:28。

【請求項129】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:29。

【請求項130】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:30。

【請求項131】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:31。

【請求項132】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:32。

【請求項133】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:33。

【請求項134】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:34。

【請求項135】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:35。

【請求項136】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:36。

【請求項137】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:37。

【請求項138】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:38。

【請求項139】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:39。

【請求項140】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:40。

【請求項141】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5

至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:41。

【請求項142】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:42。

【請求項143】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:43。

【請求項144】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:44。

【請求項145】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:45。

【請求項146】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:46。

【請求項147】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:47。

【請求項148】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:48。

【請求項149】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:49。

【請求項150】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:50。

【請求項151】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:51。

【請求項152】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:52。

【請求項153】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:53。

【請求項154】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:54。

【請求項155】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:55。

【請求項156】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:56。

【請求項157】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:57。

【請求項158】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:58。

【請求項159】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:59。

【請求項160】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:60。

【請求項161】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:61。

【請求項162】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:62。

【請求項163】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:63。

【請求項164】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5

至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:64。

【請求項165】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:65。

【請求項166】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:66。

【請求項167】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:67。

【請求項168】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:68。

【請求項169】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:69。

【請求項170】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:70。

【請求項171】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:71。

【請求項172】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:72。

【請求項173】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:73。

【請求項174】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:74。

【請求項175】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:75。

【請求項176】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:76。

【請求項177】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:77。

【請求項178】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:78。

【請求項179】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:79。

【請求項180】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:80。

【請求項181】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:81。

【請求項182】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:82。

【請求項183】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:83。

【請求項184】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:84。

【請求項185】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:85。

【請求項186】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:86。

【請求項187】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5

至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:87。

【請求項188】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:88。

【請求項189】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:89。

【請求項190】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:90。

【請求項191】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:91。

【請求項192】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:92。

【請求項193】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:93。

【請求項194】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:94。

【請求項195】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:95。

【請求項196】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:96。

【請求項197】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:97。

【請求項198】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:98。

【請求項199】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:99。

【請求項200】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:100。

【請求項201】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:101。

【請求項202】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:102。

【請求項203】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:103。

【請求項204】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:104。

【請求項205】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:105。

【請求項206】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:106。

【請求項207】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:107。

【請求項208】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:108。

【請求項209】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:109。

【請求項210】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5

至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:110。

【請求項211】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:111。

【請求項212】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:112。

【請求項213】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:113。

【請求項214】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:114。

【請求項215】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:115。

【請求項216】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:116。

【請求項217】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:117。

【請求項218】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:118。

【請求項219】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:119。

【請求項220】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:120。

【請求項221】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:121。

【請求項222】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:122。

【請求項223】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:123。

【請求項224】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:124。

【請求項225】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:125。

【請求項226】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:126。

【請求項227】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:127。

【請求項228】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:128。

【請求項229】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:129之該序列為SEQ ID NO:129。

【請求項230】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其進一步包含SEQ ID NO:140或SEQ ID NO:141之序列。

【請求項231】

如請求項230之方法或組合物，其包含SEQ ID NO:130之修改模式。

【請求項232】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中該序列係選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139。

【請求項233】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之該序列為SEQ ID NO:131。

【請求項234】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之該序列為SEQ ID NO:132。

【請求項235】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之該序列為SEQ ID NO:133。

【請求項236】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之該序列為SEQ ID NO:134。

【請求項237】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之該序列為SEQ ID NO:135。

【請求項238】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之該序列為SEQ ID NO:136。

【請求項239】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之該序列為SEQ ID NO:137。

【請求項240】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之該序列為SEQ ID NO:138。

【請求項241】

如請求項1至104中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID

NO:131至SEQ ID NO:139之該序列為SEQ ID NO:139。

【請求項242】

如請求項232至241中任一項之方法或組合物，其中選自SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:139之該序列包含表2中之相應序列所示之修飾。

【請求項243】

一種如請求項5至242中任一項之組合物或調配物之用途，其用於製備供治療患有AATD之人類個體的藥劑。

[發明圖式]

SERPINA1 Gene
94376747
94339692
5'
3'
1
2
3
4
5
CR00:427
CR00:422
CR00:421
CR00:418
CR00:408
CR00:405
CR00:404
CR00:400
CR00:397
CR00:395
CR00:392
CR00:390
CR00:388
CR00:386
CR00:385
CR00:383
CR00:380
CR00:379
CR00:376
CR00:374
CR00:373
CR00:370
CR00:457
CR00:454
CR00:453
CR00:452
CR00:450
CR00:447

圖 27
CR001261
CR001263
CR001262
CR003198
CR003196
CR001397
CR001475
CR003225
CR001476
CR001370
CR001379
CR001380
CR001405
CR001404
CR001376
CR001386
CR001450
CR001409
CR001421
CR001453
CR001374
CR003271
CR001395
CR001413
CR001391
CR003208
CR001439
CR001427
CR001373
CR001422
CR001451
CR001400
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
濃度(pg/m)

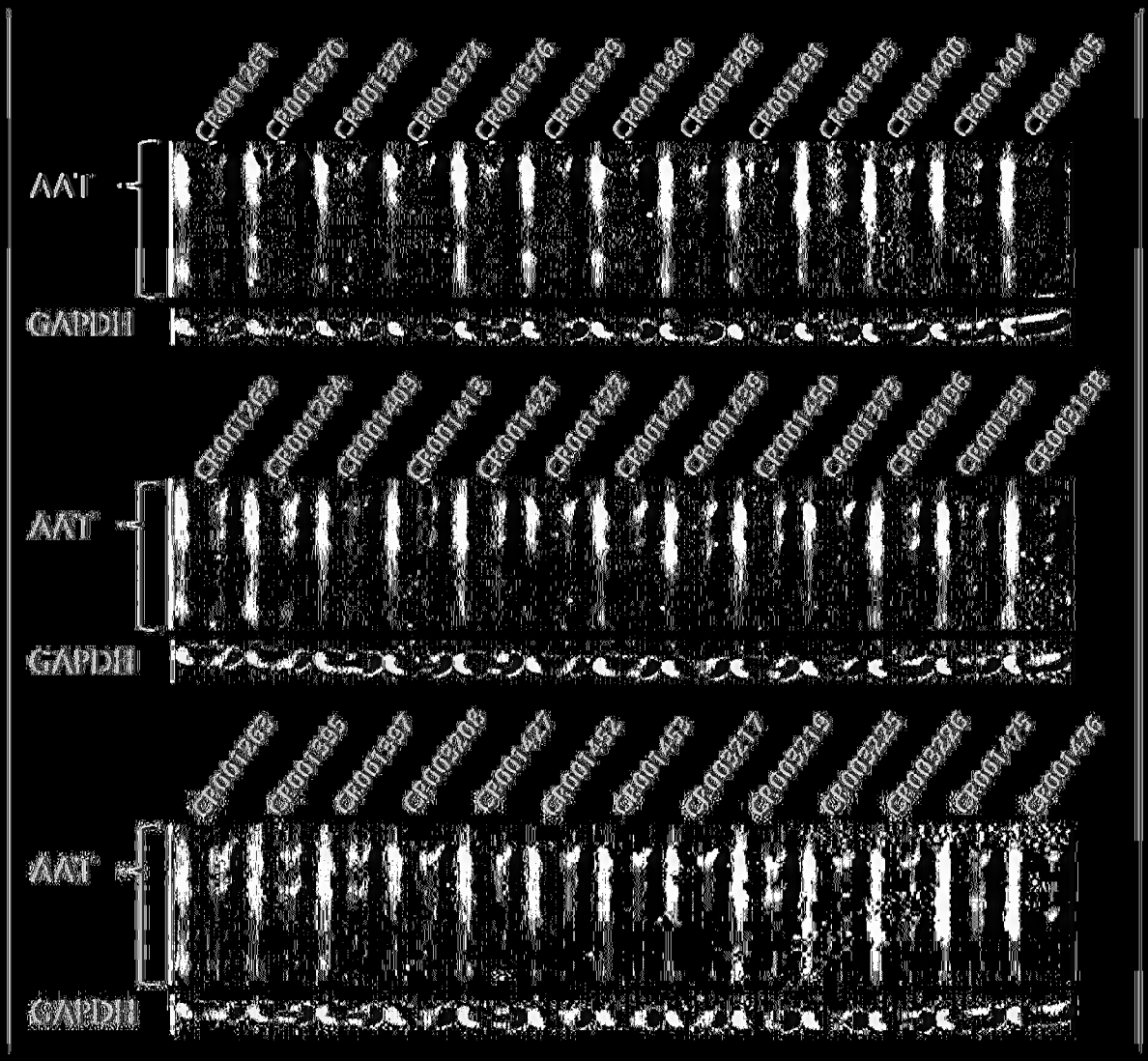

CR001261
CR001270
CR001273
CR001274
CR001276
CR001279
CR001280
CR001286
CR001291
CR001295
CR001400
CR001404
CR001405
AAT
GAPDH
CR001262
CR001264
CR001405
CR001415
CR001421
CR001422
CR001427
CR001428
CR001450
CR001275
CR003206
CR001291
CR003195
AAT
GAPDH
CR001262
CR001295
CR001297
CR003206
CR001427
CR001452
CR001452
CR003217
CR003219
CR003225
CR003226
CR001475
CR001476
AAT
GAPDH

圖4

圖式
CR003708
SER2-VA2
1.08*10#切割仆篇南山浩數
圖7
圖式
AA-1
CACCTTE
圖6
圖式
圖5A
圖5B
圖5C
圖式
%88.66 率
%
%
%

圖式
CR003186
CR003187
CR003188
CR003189
CR003190
CR003191
CR003192
CR003193
CR003194
CR003195
CR003196
CR003197
CR003198
CR003199
CR003200
CR003201
CR003202
CR003203
CR003204
CR003205
CR003206
CR003207
CR003208
CR003209
CR003210
CR003211
CR003212
CR003213
CR003214
CR003215
CR003216
CR003217
CR003218
CR003219
CR003220
CR003221
CR003222
CR003223
CR003224
CR003225

CR003186
CR00318/
CR001400
10#以前小型制品試驗
圖7C

AA
CAP
WE
圖7B

CR001400
圖7A

圖 8

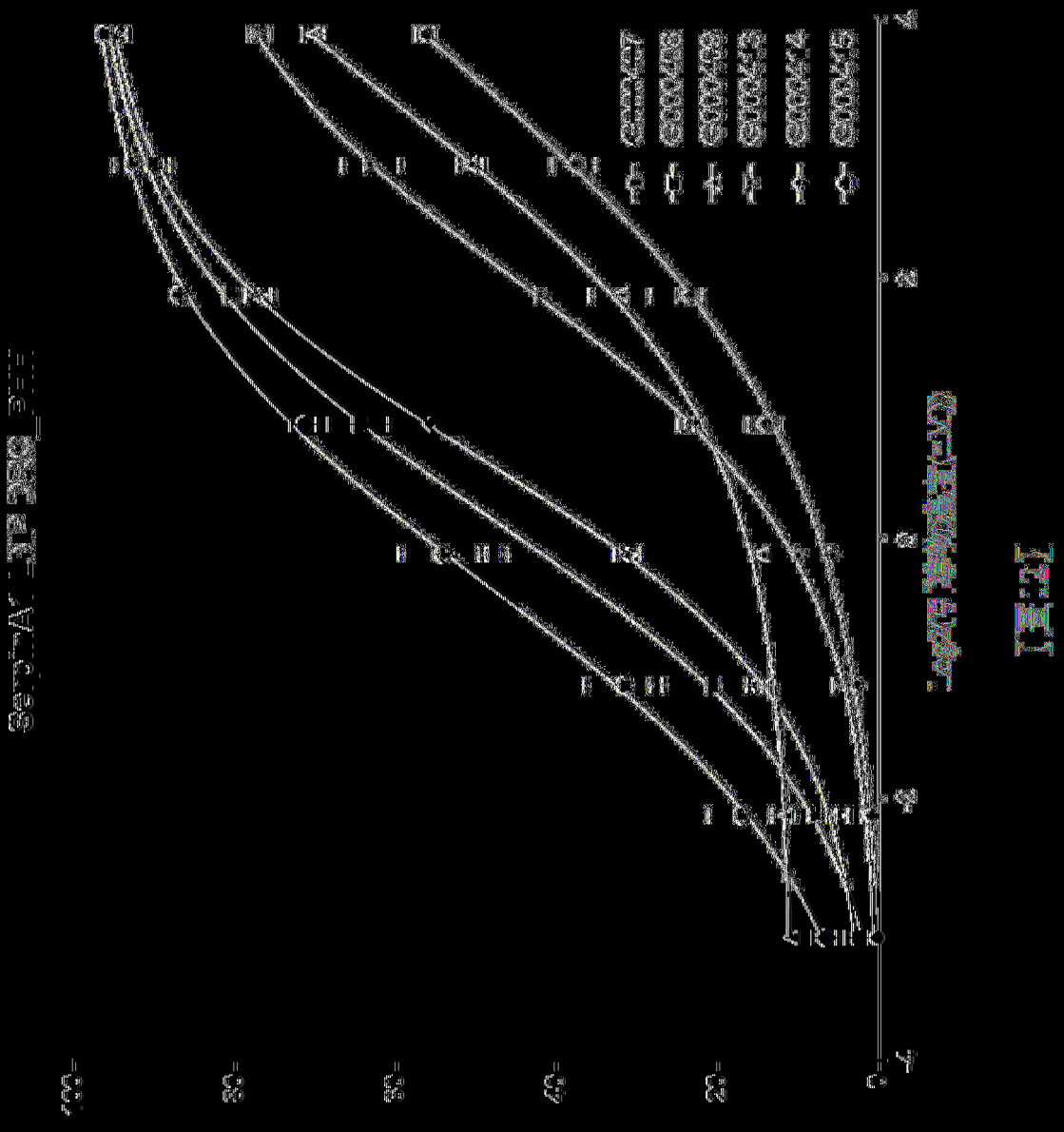
圖 9

圖 10(A)

鑽CTC休CII之AAT (p8/m)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
CA0001A7
CA0001261
E-USA
%09
%09
%001
%001
%
%
%

圖 7A
圖 7B
圖 7C
CR001386
CR001387
CR001388
CR001389
CR001390
CR001391
CR001392
CR001393
CR001394
CR001395
CR001396
CR001397
CR001398
CR001399
CR001400
CR001401
CR001402
CR001403
CR001404
CR001405
CR001406
CR001407
CR001408
CR001409
CR001410
CR001411
CR001412
CR001413
CR001414
CR001415
CR001416
CR001417
CR001418
CR001419
CR001420
CR001421
CR001422
CR001423
CR001424
CR001425

SERVA2
CR00140A
CR00318/
CR00318B
AA
CA3DE
(WCE)
%
SA
%
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
CR00140A
CR00130A
SA
%



%[illegible]

物業(RTE) 179-EN
576-EN
772-EN
643-EN
272-EN
179-EN
SS
MS 川以月
LS 川以月
AA1 (pg/ml)
0.0
200.0
400.0
600.0
800.0
1000.0
219
228
243
248
255
197
218
230
238
264
203
227
276
260
297
201
212
227
231
299
199
215
232
259
209
240
242
245
261
195
198
224
253
268

圖 7(E3E)

268
253
224
198
195
240
209
259
232
223
215
199
258
231
227
214
201
257
250
226
221
203
264
238
230
218
197
255
248
243
228
219
AA
JJ

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種組合物，其包含引導RNA，該引導RNA包含選自SEQ ID NO:29及38之引導序列。

【請求項2】

一種組合物，其包含編碼引導RNA之載體，其中該引導RNA包含選自SEQ ID NO:29及38之引導序列。

【請求項3】

如請求項1至2中任一項之組合物，其中該引導RNA包含crRNA，其自5'至3'包含(1)該引導序列及(2)SEQ ID NO:140之序列。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之組合物，其中該引導RNA為雙引導(dgRNA)。

【請求項5】

如請求項4之組合物，其中該雙引導RNA包含crRNA，其自5'至3'包含引導序列及SEQ ID NO:140之序列，及trRNA。

【請求項6】

如請求項1至3中任一項之組合物，其中該引導RNA為單引導(sgRNA)。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之組合物，其中引導RNA包含選自以下之修飾：

a. 經2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾之核苷酸；

b. 各核苷酸之間的硫代磷酸酯(PS)鍵；

c. 經2'-氟基(2'-F)修飾之核苷酸；

d. 在5’端前五個核苷酸中之一、二、三、四或五個個修飾；

e. 在3’端最後五個核苷酸中之一、二、三、四或五個進行修飾；

f. 在前四個核苷酸之間的PS鍵；

g. 在最後四個核苷酸之間的PS鍵；

h. 在5’端前三個核苷酸處的經2'-O-Me修飾之核苷酸；

i. 在3’端最後三個核苷酸處的經2'-O-Me修飾之核苷酸；及

j. a至i之2、3、4、5、6、7、8或9個組合。

【請求項8】

如請求項7之組合物，其中該修飾包括在前四個核苷酸之間的PS鍵及/或在後四個核苷酸之間的PS鍵。

【請求項9】

如請求項7或8之組合物，其中該修飾包括在5’端前三個核苷酸處的經2'-O-Me修飾之核苷酸及/或在3’端最後三個核苷酸處的經2'-O-Me修飾之核苷酸。

【請求項10】

如請求項1、2及6至9中任一項之組合物，其中該引導RNA為單引導(sgRNA)，該sgRNA包括含有上莖(US)區之支架序列，其中該引導RNA包括在5’端前三個核苷酸處的經2'-O-甲基(2'-O-Me)修飾之核苷酸及/或在3’端最後三個核苷酸處的經2'-O-Me修飾之核苷酸，且其中在該US區之各個核苷酸經2'-O-Me修飾。

【請求項11】

如請求項1、2及6至9中任一項之組合物，其中該引導RNA自5'至3'包括(1)該引導序列及(2)該SEQ ID NO:140之序列。

【請求項12】

如請求項1、2及6至9中任一項之組合物，其中該引導RNA包括含有SEQ ID NO:130、410至414及416至421中任一者之序列，其中該序列中各N共同地經引導序列置換。

【請求項13】

如請求項1至12中任一項之組合物，其中該組合物進一步包含經RNA引導之DNA結合劑或編碼經RNA引導之DNA結合劑的mRNA，其中該經RNA引導之DNA結合劑包括Cas核酸酶。

【請求項14】

如請求項13之組合物，其中該Cas核酸酶為Cas裂解酶。

【請求項15】

如請求項13之組合物，其中該Cas核酸酶為Cas切口酶(nickase)。

【請求項16】

如請求項13之組合物，其中該Cas核酸酶係經修飾。

【請求項17】

如請求項13至16中任一項之組合物，其中該Cas核酸酶為Cas9。

【請求項18】

如請求項1至17中任一項之組合物，其中該組合物包括脂質奈米粒子(LNP)調配物。

【請求項19】

如請求項18之組合物，其中該LNP包括(i)可離子化脂質；(ii)中性脂

質；(iii)輔助脂質；及(iv)隱形脂質(stealth lipid)。

【請求項20】

如請求項19之組合物，其中該可離子化脂質為十八-9,12-二烯酸(9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯。

【請求項21】

如請求項18之組合物，其中該LNP包括：

(i) 十八-9,12-二烯酸(9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯；

(ii) 二硬脂酸基磷脂醯膽鹼(DSPC)；

(iii) 膽固醇；及

(iv) 聚乙二醇-二肉豆蔻酸甘油酯(PEG-DMG)。

【請求項22】

如請求項18之組合物，其中該LNP調配物包括：

(i) 約50 mol%十八-9,12-二烯酸(9Z,12Z)-3-((4,4-雙(辛氧基)丁醯基)氧基)-2-((((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙酯；

(ii) 約9 mol%二硬脂酸基磷脂醯膽鹼(DSPC)；

(iii) 約38 mol%膽固醇；及

(iv) 約3 mol%聚乙二醇-二肉豆蔻酸甘油酯(PEG-DMG)。

【請求項23】

如請求項1至22中任一項之組合物，其中該組合物為醫藥調配物且進一步包含醫藥學上可接受之載劑。

【請求項24】

如請求項1至23中任一項之組合物，其中該選自SEQ ID NO:29及38之序列為SEQ ID NO:29。

【請求項25】

如請求項1至23中任一項之組合物，其中選自該SEQ ID NO:29及38之序列為SEQ ID NO:38。

【請求項26】

一種誘發*SERPINA1*基因中發生雙鏈斷裂(DSB)之方法，包括於活體外向細胞遞送如請求項1至25中任一項之組合物。

【請求項27】

一種修飾*SERPINA1*基因之方法，包括於活體外向細胞遞送如請求項1至25中任一項之組合物。

【請求項28】

一種如請求項1至25中任一項之組合物之用途，其用於製備治療患有α-1抗胰蛋白酶缺乏症(AATD)之個體之藥物。

【請求項29】

一種如請求項1至25中任一項之組合物之用途，其用於製備減少α-1抗胰蛋白酶(AAT)在個體之肝臟中積聚、誘發細胞或個體中之*SERPINA1*基因中發生雙鏈斷裂(DSB)、修飾細胞或個體中之*SERPINA1*基因、及/或降低個體中之血清及/或肝臟AAT濃度之藥物。

【請求項30】

如請求項28或29之用途，其中該組合物降低個體中之AAT含量。

【請求項31】

如請求項30之用途，其中相較於該組合物遞送至個體前之AAT含

量，該AAT含量降低至少40%。

【請求項32】

如請求項28或29之用途，其中該組合物引起編輯*SERPINA1*基因，其中該編輯計算為經編輯的基因群之百分比(編輯百分比)。

【請求項33】

如請求項32之用途，其中該編輯百分比在30%與99%之間。

【請求項34】

如請求項28或29之用途，其中非同源末端連接(non-homologous ending joining；NHEJ)在修復*SERPINA1*基因中之DSB期間引起突變。

【請求項35】

如請求項34之用途，其中該NHEJ在修復*SERPINA1*基因中之DSB期間引起核苷酸缺失或插入。

【請求項36】

如請求項35之用途，其中該核苷酸缺失或插入誘發*SERPINA1*基因中發生框移或無意義突變。

【請求項37】

如請求項28或29之用途，其中該個體為人類。

【請求項38】

如請求項28或29之用途，其中該個體患有AATD；

該個體具有AATD家族病史；或

該個體僅具有或主要具有AATD之肝臟症狀。

【請求項39】

如請求項28或29之用途，其中該個體在SERPINA1基因座之Z對偶基

因為異種接合；或

在AAT之胺基酸序列處不具有E342K突變，但具有降低含量之野生型AAT。

【請求項40】

如請求項28或29之用途，其中該個體之水腫、腹水或黃疸有所改善、穩定或減緩，或延緩對肝臟移植之需要。

【請求項41】

如請求項28或29之用途，其中該組合物經由病毒載體或經由脂質奈米粒子遞送。

【請求項42】

如請求項29之用途，其中該細胞為肝臟細胞(liver cell)。

【請求項43】

如請求項42之用途，其中該肝臟細胞為肝細胞(hepatocyte)。

【請求項44】

如請求項26或27之用途，其中該細胞為肝臟細胞(liver cell)。

【請求項45】

如請求項44之用途，其中該肝臟細胞為肝細胞(hepatocyte)。