



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113748127 B

(45) 授权公告日 2025.01.10

(21) 申请号 202080032593.3

(22) 申请日 2020.04.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113748127 A

(43) 申请公布日 2021.12.03

(30) 优先权数据
62/841,753 2019.05.01 US
62/841,748 2019.05.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.10.29

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/030818 2020.04.30

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/223537 EN 2020.11.05

(73) 专利权人 派克特制药公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 芭芭拉·森尼诺 凯尔·雅各比
斯蒂芬妮·曼德尔-卡什曼
迈克尔·M·杜布勒伊
约翰·加农
亚历克斯·弗兰祖索夫

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021
专利代理师 张国梁

(51) Int.Cl.
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/73 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C12N 5/0783 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2018058002 A1, 2018.03.29
WO 2018170338 A2, 2018.09.20
Rémy Bosselut et al..Role of CD8b
Domains in CD8 Coreceptor Function:
Importance for MHC I Binding, Signaling,
and Positive Selection of CD81 T Cells in
the Thymus.Immunity.2000,摘要.
Ondrej Stepanek et al..Coreceptor
Scanning by the T Cell Receptor Provides
a Mechanism for T Cell
Tolerance.Cell.2014,第336页右栏第2段,第
337页. (续)

审查员 赵鹏

权利要求书5页 说明书40页
序列表41页 附图52页

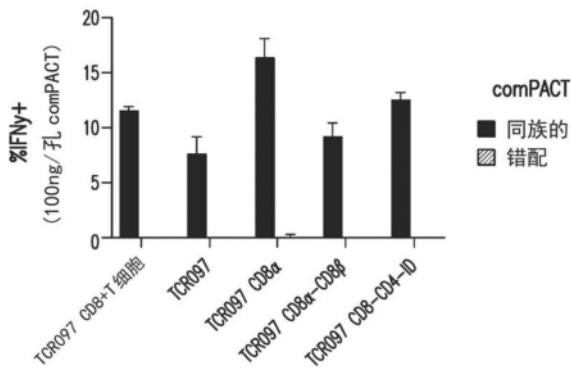
(54) 发明名称

使用CD8改造的T细胞疗法治疗癌症的组合物和方法

(57) 摘要

包含具有CD8表达构建体的基于neoTCR的细胞疗法的组合物和用于治疗癌症的方法。在某些实施方案中,当前公开的主题提供了细胞,其包含外源性T细胞受体(TCR)和外源性CD8。在某些实施方案中,外源性CD8包含至少一个单体。在某些实施方案中,外源性CD8的至少一个单体包含细胞外结构域、跨膜结构域、细胞内结构域、其片段或其组合。

特异性



CN 113748127 B

[接上页]

(56) 对比文件

Andrea Itano et AL..The Cytoplasmic

Domain of CD4 Promotes the Development of
CD4 Lineage T Cells.J. Exp. Med..1996,摘
要.

1. 外周T细胞,其包含:
 - a) 识别新抗原的外源性T细胞受体 (TCR) ;和
 - b) 外源性CD8,其包含CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。
2. 权利要求1所述的细胞,其中所述外源性CD8包含至少一个单体。
3. 权利要求2所述的细胞,其中所述至少一个单体包含CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。
4. 权利要求2-3中任一项所述的细胞,其中所述至少一个单体包含信号肽。
5. 权利要求4所述的细胞,其中所述信号肽是CD8信号肽。
6. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中所述CD8 α 细胞外结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 140所示。
7. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中所述CD8 α 跨膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 141所示。
8. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中所述CD4细胞内结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 148所示。
9. 权利要求4所述的细胞,其中所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 139所示。
10. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中所述外源性CD8包含2A序列。
11. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中所述外源性CD8包含接头。
12. 权利要求11所述的细胞,其中所述接头的氨基酸序列如SEQ ID NO: 137所示。
13. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中所述外源性CD8包含蛋白酶切割位点。
14. 权利要求13所述的细胞,其中所述蛋白酶切割位点是弗林蛋白酶切割位点。
15. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中所述外源性TCR是患者来源的TCR。
16. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中所述外源性TCR包含信号序列、第一和第二2A序列以及TCR多肽序列。
17. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中所述细胞是原代细胞。
18. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中所述细胞是患者来源的细胞。
19. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中所述细胞是年轻的T细胞。
20. 权利要求19所述的细胞,其中所述细胞是CD45RA⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁻、CCR7⁺和CD27⁺。
21. 权利要求19所述的细胞,其中所述细胞是CD45RA⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁺、CD27⁺、CCR7⁺。
22. 权利要求19所述的细胞,其中所述细胞是CD45RO⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺。
23. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其进一步包含基因修饰以增强细胞持久性和/或增强记忆细胞分化。
24. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中与不具有外源性CD8的细胞的杀伤活性相比,所述细胞的杀伤活性增加了10%至500%。
25. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中与不具有外源性CD8的细胞的增殖相比,在TCR与抗原结合后所述细胞的增殖增加了10%至500%。
26. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中与不具有外源性CD8的细胞的分泌相比,在

TCR与抗原结合时,所述细胞的促炎性细胞因子的分泌增加10%至500%。

27. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中与不具有外源性CD8的细胞的LCK亲和力相比,所述细胞的LCK亲和力增加了10%至500%。

28. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中与不具有外源性CD8的细胞的持久性相比,所述细胞的持久性增加了10%至500%。

29. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中与不具有外源性CD8的细胞的肿瘤浸润能力相比,所述细胞的肿瘤浸润能力增加了10%至500%。

30. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中所述外源性TCR是CD8依赖性TCR。

31. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中所述外源性TCR是CD8非依赖性TCR。

32. 权利要求1-3中任一项所述的细胞,其中所述外源性CD8由SEQ ID NO:136所示的CD8构建体4编码。

33. 权利要求1所述的细胞,其中所述外源性CD8包含CD8 α 信号肽、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。

34. 权利要求1所述的细胞,其中所述外源性CD8包含SEQ ID NO:139所示的CD8 α 信号肽、SEQ ID NO:140所示的CD8 α 细胞外结构域、SEQ ID NO:141所示的CD8 α 跨膜结构域和SEQ ID NO:148所示的CD4细胞内结构域。

35. 修饰外周T细胞的方法,所述方法包括:

a) 将同源重组(HR)模板核酸序列引入细胞中,其中所述HR模板包含:

i) 与第一和第二靶核酸序列同源的第一和第二同源臂;

ii) 位于第一和第二同源臂之间的编码识别新抗原的外源TCR的TCR基因序列;

iii) 位于第一和第二同源臂之间的CD8基因序列;其中所述CD8基因序列包含CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域;和

b) 将HR模板核酸重组到细胞的内源基因座中。

36. 权利要求35所述的方法,其中所述HR模板包含位于CD8基因序列上游的第一2A编码序列、位于CD8基因序列下游和TCR基因序列上游的第二2A编码序列和位于TCR基因序列下游的第三2A编码序列;其中第一、第二和第三2A编码序列编码相同的氨基酸序列并且相对于彼此密码子趋异。

37. 权利要求35或36所述的方法,其中所述HR模板包含编码紧邻第一、第二和/或第三2A编码序列上游的氨基酸序列Gly Ser Gly的序列。

38. 权利要求36所述的方法,其中所述HR模板还包含编码位于第一、第二和/或第三2A编码序列上游的弗林蛋白酶切割位点的序列。

39. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述HR模板进一步包含编码位于紧邻TCR基因序列和/或CD8基因序列上游的信号序列的序列。

40. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述HR模板包含位于第三2A编码序列和第二同源臂之间的第二TCR序列。

41. 权利要求40所述的方法,其中所述HR模板包含:

a. 编码位于紧邻第一TCR基因序列上游的第一信号序列的序列;和

b. 编码位于紧邻第二TCR基因序列上游的第二信号序列的序列。

42. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述HR模板包含位于第一CD8基因序列

和第二A编码序列之间的第二CD8基因序列。

43. 权利要求42所述的方法,其中2A编码序列位于第一和第二CD8基因序列之间。

44. 权利要求42所述的方法,其中编码氨基酸序列Gly Ser Gly的序列位于第一和第二CD8基因序列之间。

45. 权利要求42所述的方法,其中编码弗林蛋白酶切割位点的序列位于第一和第二CD8基因序列之间。

46. 权利要求42所述的方法,其中所述HR模板包含:

a. 编码位于紧邻第一CD8基因序列上游的第一信号序列的序列;和

b. 编码位于紧邻第二CD8基因序列上游的第二信号序列的序列。

47. 权利要求46所述的方法,其中所述信号序列是CD8信号序列、人生长激素信号序列、其片段或其组合。

48. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述HR模板的第一和第二同源臂各自的长度为300个碱基至2,000个碱基。

49. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述HR模板的第一和第二同源臂各自的长度为600个碱基至2,000个碱基。

50. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述外源性TCR是患者来源的TCR。

51. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述外源性TCR包含信号序列、第一和第二2A序列以及TCR多肽序列。

52. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述HR模板是非病毒性的。

53. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述HR模板是环状DNA。

54. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述HR模板是线性DNA。

55. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中通过电穿孔进行引入。

56. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述重组包含:

a. 通过核酸酶切割内源基因座;和

b. 通过同源定向修复将HR模板核酸序列重组到所述内源基因座中。

57. 权利要求56所述的方法,其中所述核酸酶是成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)家族核酸酶或其衍生物。

58. 权利要求57所述的方法,还包括gRNA。

59. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述方法还包括培养细胞。

60. 权利要求59所述的方法,其中所述培养在至少一种细胞因子存在下进行。

61. 权利要求59所述的方法,其中所述培养在IL2、IL7、IL15或其任何组合的存在下进行。

62. 权利要求59所述的方法,其中所述培养在IL7和IL15的存在下进行。

63. 权利要求35-36中任一项所述的方法,进一步包括基因修饰以增强细胞持久性和/或增强记忆细胞分化。

64. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述细胞是原代细胞。

65. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述细胞是患者来源的细胞。

66. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述细胞是年轻的T细胞。

67. 权利要求66所述的细胞,其中所述细胞是CD45RA+、CD62L+、CD28+、CD95-、CCR7+和

CD27+。

68. 权利要求66所述的细胞,其中所述细胞是CD45RA+、CD62L+、CD28+、CD95+、CD27+、CCR7+。

69. 权利要求66所述的细胞,其中所述细胞是CD45RO+、CD62L+、CD28+、CD95+、CCR7+、CD27+、CD127+。

70. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中与不具有CD8基因序列的细胞的杀伤活性相比,细胞的杀伤活性增加了10%至500%。

71. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中与不具有CD8基因序列的细胞的增殖相比,在TCR与抗原结合时细胞的增殖增加了10%至500%。

72. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中与不具有CD8基因序列的细胞的分泌相比,当TCR与抗原结合时,细胞的促炎性细胞因子的分泌增加10%至500%。

73. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中与不具有CD8基因序列的细胞的LCK亲和力相比,细胞的LCK亲和力增加了10%至500%。

74. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中与不具有CD8基因序列的细胞的持久性相比,所述细胞的持久性增加了10%至500%。

75. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中与不具有CD8基因序列的细胞的肿瘤浸润能力相比,细胞的肿瘤浸润能力增加了10%至500%。

76. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述TCR基因编码CD8依赖性TCR。

77. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述TCR基因编码CD8非依赖性TCR。

78. 权利要求35-36中任一项所述的方法,其中所述CD8基因序列由SEQ ID NO:136所示的CD8构建体4编码。

79. 权利要求35所述的方法,其中所述CD8基因序列编码包含下述的外源性CD8:CD8 α 信号肽、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。

80. 权利要求38所述的方法,其中所述CD8基因序列编码包含下述的外源性CD8:SEQ ID NO:139所示的CD8 α 信号肽、SEQ ID NO:140所示的CD8 α 细胞外结构域、SEQ ID NO:141所示的CD8 α 跨膜结构域和SEQ ID NO:148所示的CD4细胞内结构域。

81. 通过权利要求35-80中任一项所述的方法修饰的细胞。

82. 组合物,其包含有效量的权利要求1-34中任一项所述的细胞或权利要求81的细胞。

83. 权利要求82的所述组合物,其中所述组合物是进一步包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

84. 权利要求82或83的所述组合物,其中将所述组合物施用于有需要的患者以治疗癌症。

85. 权利要求82-83中任一项的所述组合物,其中所述组合物包含冷冻保存剂。

86. 权利要求82-83中任一项的所述组合物,其中所述组合物包含血清白蛋白。

87. 权利要求82-83中任一项的所述组合物,其中所述组合物包含Plasma-Lyte A、HSA和CryoStor CS10。

88. 权利要求1-34中任一项的细胞、权利要求81的细胞或权利要求82-87中任一项的组合物在制备治疗有需要的受试者的癌症的药物中的用途。

89. 权利要求88所述的用途,其中所述癌症是实体瘤。

90. 权利要求88所述的用途,其中所述癌症是液体瘤。

91. 权利要求89所述的用途,其中所述实体瘤选自由黑色素瘤、胸癌、肺癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、头颈癌、前列腺癌、妇科癌、中枢神经系统癌、皮肤癌、HPV+癌、食道癌、甲状腺癌、胃癌、肝细胞癌、胆管癌、肾细胞癌、睾丸癌、肉瘤和结直肠癌组成的组。

92. 权利要求90所述的用途,其中所述液体瘤选自由滤泡性淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤组成的组。

93. 试剂盒,其包含权利要求1-34中任一项的细胞、用于执行权利要求35-80中任一项的方法的试剂、权利要求81的细胞或权利要求82-87中任一项的组合物。

94. 权利要求93所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包括用于治疗癌症的书面说明。

使用CD8改造的T细胞疗法治疗癌症的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年5月1日提交的美国临时申请号62/841,748和于2019年5月1日提交的美国临时申请号62/841,753的优先权,其全部内容纳入本文并要求其优先权。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已以ASCII格式以电子方式提交,并通过引用全部纳入本文。所述ASCII副本创建于2020年4月30日,命名为087520_0145_SL.txt,大小为120,294字节。

背景技术

[0005] T细胞的激活需要通过T细胞受体(TCR)及其辅助受体分子进行信号传递。CD4和CD8是在T辅助细胞和细胞毒性T淋巴细胞上表达的膜蛋白,它们作为辅助受体,通过稳定肽主要组织相容性(pMHC)配体和TCR之间的相互作用来增强TCR信号传递(Li QJ, et al. (2004) CD4 enhances T cell sensitivity to antigen by coordinating Lck accumulation at the immunological synapse. *Nat Immunol* 5:791-799; Holler PD, Kranz DM (2003) Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation. *Immunity* 18:255-264)。具体而言,CD4和CD8辅助受体对于启动信号传导至关重要,因为它们有助于将激酶招募到TCR-pMHC复合体上。此外,研究表明,虽然CD4和CD8辅助受体都增强了T细胞对其配体的敏感性,但只有CD8在稳定TCR-pMHC相互作用中起作用。

[0006] 此外,虽然推测天然存在的MHC-I TCR需要同时存在的CD8辅助受体帮助稳定肽-MHC结合,但更高亲和力的TCR驱动CD8非依赖性靶标结合和T细胞激活。CD4 T细胞在使用高亲和力NeoTCR进行改造时,因此能够识别肽-MHC-I靶标并触发效应T细胞功能。然而,较低亲和力的TCR依赖于CD8辅助受体来触发T细胞激活。

[0007] 因此,被改造为具有CD8辅助受体表达的NeoTCR细胞疗法可以稳定TCR-pMHC相互作用并提高包含依赖于此类CD8辅助受体的低亲和力TCR的NeoTCR细胞疗法的功效。

发明内容

[0008] 在某些实施方案中,当前公开的主题提供了细胞,其包含外源性T细胞受体(TCR)和外源性CD8。在某些实施方案中,外源性CD8包含至少一个单体。在某些实施方案中,外源性CD8的至少一个单体包含细胞外结构域、跨膜结构域、细胞内结构域、其片段或其组合。在某些实施方案中,细胞外结构域包含CD8 α 细胞外结构域或CD8 β 细胞外结构域。在某些实施方案中,跨膜CD8 α 跨膜结构域或CD8 β 跨膜结构域。在某些实施方案中,细胞内结构域包含CD8 α 细胞内结构域或CD8 β 细胞内结构域。在某些实施方案中,细胞内结构域包含CD4细胞内结构域。

[0009] 在某些实施方案中,至少一个单体包含CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域。在某些实施方案中,至少一个单体包含CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构

域和CD8 β 细胞内结构域。在某些实施方案中,至少一个单体包含CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域。在某些实施方案中,至少一个单体包含CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。在某些实施方案中,至少一个单体包含信号肽。在某些实施方案中,信号肽是CD8信号肽。

[0010] 在某些实施方案中,细胞外结构域包含在SEQ ID NO:140或SEQ ID NO:145中列出的氨基酸序列。在某些实施方案中,跨膜结构域包含在SEQ ID NO:141或SEQ ID NO:146中列出的氨基酸序列。在某些实施方案中,细胞内结构域包含在SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:147或SEQ ID NO:148中列出的氨基酸序列。在某些实施方案中,信号肽包含在SEQ ID NO:139或SEQ ID NO:144中列出的氨基酸序列。

[0011] 在某些实施方案中,外源性CD8包含2A序列。在某些实施方案中,外源性CD8包含接头。在某些实施方案中,接头包含在SEQ ID NO:137中列出的氨基酸序列。在某些实施方案中,外源性CD8包含蛋白酶切割位点。在某些实施方案中,蛋白酶切割位点是弗林蛋白酶切割位点。

[0012] 在某些实施方案中,外源性TCR是源自患者的TCR。在某些实施方案中,外源性TCR包含信号序列、第一和第二2A序列以及TCR多肽序列。在某些实施方案中,外源性TCR识别癌抗原。在某些实施方案中,癌抗原是新抗原。在某些实施方案中,癌抗原是患者特异性抗原。

[0013] 在某些实施方案中,细胞是原代细胞。在某些实施方案中,细胞是患者来源的细胞。在某些实施方案中,细胞是淋巴细胞。在某些实施方案中,细胞是T细胞。在某些实施方案中,细胞是年轻的T细胞。在某些实施方案中,细胞是CD45RA⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁻、CCR7⁺和CD27⁺。在某些实施方案中,细胞是CD45RA⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁺、CD27⁺、CCR7⁺。在某些实施方案中,细胞是CD45RO⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺。

[0014] 在某些实施方案中,细胞进一步包含基因修饰以增强细胞持久性和/或增强记忆细胞分化。在某些实施方案中,与不具有外源性CD8的细胞的杀伤活性相比,细胞的杀伤活性增加了约10%至约500%。在某些实施方案中,与不具有外源性CD8的细胞的增殖相比,在TCR与抗原结合后细胞的增殖增加了约10%至约500%。在某些实施方案中,与不具有外源性CD8的细胞的分泌相比,当TCR与抗原结合时,细胞的促炎性细胞因子的分泌增加约10%至约500%。在某些实施方案中,与不具有外源性CD8的细胞的LCK亲和力相比,细胞的LCK亲和力增加了约10%至约500%。在某些实施方案中,与不具有外源性CD8的细胞的持久性相比,细胞的持久性增加了约10%至约500%。在某些实施方案中,与不具有外源性CD8的细胞的肿瘤浸润能力相比,细胞的肿瘤浸润能力增加了约10%至约500%。

[0015] 在某些实施方案中,其中外源性TCR是CD8依赖性TCR。在某些实施方案中,外源性TCR是CD8非依赖性TCR。在某些实施方案中,外源性CD8由CD8构建体1、CD8构建体2、CD8构建体3或CD8构建体4编码。在某些实施方案中,外源性CD8包括:CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;或CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。在某些实施方案中,外源性CD8包含:CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:

141)、CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142)、CD8 β 信号肽(SEQ ID NO:144)、CD8 β 细胞外结构域(SEQ ID NO:145)、CD8 β 跨膜结构域(SEQ ID NO:146)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);或CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD4细胞内结构域(SEQ ID NO:148)。

[0016] 在某些实施方案中,当前公开的主题提供了修饰细胞的方法,所述方法包括将同源重组(HR)模板核酸序列引入细胞中,其中所述HR模板包含与第一和第二靶核酸序列同源的第一和第二同源臂、位于第一和第二同源臂之间的TCR基因序列、位于第一和第二同源臂之间的CD8基因序列,以及将所述HR模板核酸重组到细胞的内源基因座中。在某些实施方案中,HR模板包含位于CD8基因序列上游的第一2A编码序列、位于CD8基因序列下游和TCR基因序列上游的第二2A编码序列和位于TCR基因序列下游的第三2A编码序列;其中所述第一、第二和第三2A编码序列编码相同的氨基酸序列并且相对于彼此密码子发散。在某些实施方案中,HR模板包含编码紧邻第一、第二和/或第三2A编码序列上游的氨基酸序列Gly Ser Gly的序列。在某些实施方案中,HR模板还包含编码位于第一、第二和/或第三2A编码序列上游的弗林蛋白酶切割位点的序列。在某些实施方案中,HR模板进一步包含编码位于紧邻TCR基因序列和/或CD8基因序列上游的信号序列的序列。

[0017] 在某些实施方案中,HR模板包含位于第三2A编码序列和第二同源臂之间的第二TCR序列。在某些实施方案中,HR模板包含编码位于紧邻第一TCR基因序列上游的第一信号序列的序列和编码位于紧邻第二TCR基因序列上游的第二信号序列的序列。在某些实施方案中,HR模板包含位于第一CD8基因序列和第二2A编码序列之间的第二CD8基因序列。在某些实施方案中,2A编码序列位于第一和第二CD8基因序列之间。在某些实施方案中,编码氨基酸序列Gly Ser Gly的序列位于第一和第二CD8基因序列之间。在某些实施方案中,编码弗林蛋白酶切割位点的序列位于第一和第二CD8基因序列之间。

[0018] 在某些实施方案中,CD8基因序列包含编码细胞外结构域的序列、编码细胞内结构域的序列、编码细胞内结构域的序列、其片段或其组合。在某些实施方案中,编码细胞外结构域的序列包含编码CD8 α 细胞外结构域或CD8 β 细胞外结构域的序列。在某些实施方案中,编码跨膜结构域的序列包括编码CD8 α 跨膜结构域或CD8 β 跨膜结构域的序列。在某些实施方案中,编码细胞内结构域的序列包含编码CD8 α 细胞内结构域或CD8 β 细胞内结构域的序列。在某些实施方案中,编码细胞内结构域的序列包含编码CD4细胞内结构域的序列。

[0019] 在某些实施方案中,CD8基因序列包含编码CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域的序列。在某些实施方案中,CD8基因序列包含编码CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域的序列。在某些实施方案中,CD8基因序列包含编码CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域的序列。在某些实施方案中,CD8基因序列包含编码CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域的序列。

[0020] 在某些实施方案中,HR模板包含编码位于紧邻第一CD8基因序列上游的第一信号序列的序列和编码位于紧邻第二CD8基因序列上游的第二信号序列的序列。在某些实施方案中,信号序列是CD8信号序列、人生长激素信号序列、其片段或其组合。在某些实施方案中,HR模板的第一和第二同源臂各自的长度为约300个碱基至约2,000个碱基。在某些实施

方案中,HR模板的第一和第二同源臂各自的长度为约600个碱基至约2,000个碱基。

[0021] 在某些实施方案中,外源性TCR是源自患者的TCR。在某些实施方案中,外源性TCR包含信号序列、第一和第二2A序列以及TCR多肽序列。在某些实施方案中,外源性TCR识别癌抗原。在某些实施方案中,癌抗原是新抗原。在某些实施方案中,癌抗原是患者特异性抗原。在某些实施方案中,HR模板是非病毒性的。在某些实施方案中,HR模板是环状DNA。在某些实施方案中,HR模板是线性DNA。在某些实施方案中,引入通过电穿孔发生。

[0022] 在某些实施方案中,重组包括通过核酸酶切割内源基因座,以及通过同源定向修复将HR模板核酸序列重组到所述内源基因座中。在某些实施方案中,核酸酶是成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)家族核酸酶或其衍生物。在某些实施方案中,核酸酶还包含gRNA。

[0023] 在某些实施方案中,该方法进一步包括培养细胞。在某些实施方案中,培养在至少一种细胞因子存在下进行。在某些实施方案中,培养在IL2、IL7、IL15或其任何组合的存在下进行。在某些实施方案中,培养在IL7和IL15存在下进行。在某些实施方案中,所述方法包括基因修饰以增强细胞持久性和/或增强记忆细胞分化。

[0024] 在某些实施方案中,细胞是原代细胞。在某些实施方案中,细胞是患者来源的细胞。在某些实施方案中,细胞是淋巴细胞。在某些实施方案中,细胞是T细胞。在某些实施方案中,细胞是年轻的T细胞。在某些实施方案中,细胞是CD45RA⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁻、CCR7⁺和CD27⁺。在某些实施方案中,细胞是CD45RA⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁺、CD27⁺、CCR7⁺。在某些实施方案中,细胞是CD45R0⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺。

[0025] 在某些实施方案中,与不具有CD8基因序列的细胞的杀伤活性相比,细胞的杀伤活性增加了约10%至约500%。在某些实施方案中,与不具有CD8基因序列的细胞的增殖相比,在TCR与抗原结合后细胞的增殖增加了约10%至约500%。在某些实施方案中,与不具有CD8基因序列的细胞的分泌相比,在TCR与抗原结合后细胞的促炎性细胞因子的分泌增加了约10%至约500%。在某些实施方案中,与不具有CD8基因序列的细胞的LCK亲和力相比,细胞的LCK亲和力增加了约10%至约500%。权利要求43-95中任一项的所述方法,其中与不具有CD8基因序列的细胞的持久性相比,所述细胞的持久性增加了约10%至约500%。在某些实施方案中,与不具有CD8基因序列的细胞的肿瘤浸润能力相比,细胞的肿瘤浸润能力增加了约10%至约500%。

[0026] 在某些实施方案中,TCR基因编码CD8依赖性TCR。在某些实施方案中,TCR基因编码CD8非依赖性TCR。在某些实施方案中,CD8基因序列由CD8构建体1、CD8构建体2、CD8构建体3或CD8构建体4编码。在某些实施方案中,其中CD8基因序列包含:CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;或CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD4细胞内结构域。在某些实施方案中,CD8基因序列包含:CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)、CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142)、CD8 β 信号肽(SEQ ID NO:144)、CD8 β 细胞外结构域(SEQ ID NO:145)、CD8 β 跨膜结构域(SEQ ID NO:146)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID

NO:147);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);或CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD4细胞内结构域(SEQ ID NO:148)。

[0027] 在某些实施方案中,当前公开的主题提供了通过本文公开的任何方法修饰的细胞。

[0028] 在某些实施方案中,当前公开的主题提供包含有效量的本文公开的细胞的组合物。在某些实施方案中,组合物是进一步包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在某些实施方案中,将组合物施用于有需要的患者以治疗癌症。在某些实施方案中,组合物包含冷冻保存剂。在某些实施方案中,组合物包含血清白蛋白。在某些实施方案中,组合物包含Plasma-Lyte A、HSA和CryoStor CS10。

[0029] 在某些实施方案中,当前公开的主题提供了在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的本文公开的细胞或组合物。

[0030] 在某些实施方案中,在施用治疗有效量的本文公开的细胞之前,向受试者施用非清髓性淋巴去除方案。在某些实施方案中,癌症是实体瘤。在某些实施方案中,癌症是液体瘤。在某些实施方案中,实体瘤选自黑色素瘤、肺癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、头颈癌、前列腺癌、妇科癌、中枢神经系统癌、皮肤癌、HPV+癌、食道癌、甲状腺癌、胃癌、肝细胞癌、胆管癌、肾细胞癌、睾丸癌、肉瘤和结直肠癌组成的组。在某些实施方案中,液体瘤选自滤泡性淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤组成的组。

[0031] 在某些实施方案中,当前公开的主题提供包含本文公开的细胞、用于执行本文公开的方法的试剂或本文公开的组合物的试剂盒。在某些实施方案中,试剂盒还包括用于治疗癌症的书面说明。

[0032] 在某些实施方案中,当前公开的主题提供了细胞,其包含:外源性T细胞受体(TCR);外源性CD8,所述外源性CD8包括:CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;或CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。

[0033] 在某些实施方案中,当前公开的主题提供了细胞,其包含:外源T细胞受体(TCR);和外源性CD8,所述外源性CD8包括:CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)、CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142)、CD8 β 信号肽(SEQ ID NO:144)、CD8 β 细胞外结构域(SEQ ID NO:145)、CD8 β 跨膜结构域(SEQ ID NO:146)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);或CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD4细胞内结构域(SEQ ID NO:148)。

[0034] 在某些实施方案中,当前公开的主题提供了修饰细胞的方法,所述方法包括:将同源重组(HR)模板核酸序列引入细胞中,其中所述HR模板包含:与第一和第二靶核酸序列同

源的第一和第二同源臂;位于第一和第二同源臂之间的TCR基因序列;位于第一和第二同源臂之间的CD8基因序列;和将HR模板核酸重组到细胞的内源基因座中,其中CD8基因序列包括:CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 β 细胞内结构域;或CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。

[0035] 在某些实施方案中,当前公开的主题提供了修饰细胞的方法,所述方法包括:将同源重组(HR)模板核酸序列引入细胞中,其中所述HR模板包含:与第一和第二靶核酸序列同源的第一和第二同源臂;位于第一和第二同源臂之间的TCR基因序列;位于第一和第二同源臂之间的CD8基因序列;和将HR模板核酸重组到细胞的内源基因座中,其中CD8基因序列包括:CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)、CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142)、CD8 β 信号肽(SEQ ID NO:144)、CD8 β 细胞外结构域(SEQ ID NO:145)、CD8 β 跨膜结构域(SEQ ID NO:146)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);或CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD4细胞内结构域(SEQ ID NO:148)。

[0036] 在某些实施方案中,当前公开的主题提供包含细胞的组合物,其中所述细胞包含外源T细胞受体(TCR)和外源性CD8,其中外源性CD8包含:CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;或CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。

[0037] 在某些实施方案中,当前公开的主题提供包含细胞的组合物,其中所述细胞包含外源性T细胞受体(TCR)和外源性CD8,其中外源性CD8包含:CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)、CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142)、CD8 β 信号肽(SEQ ID NO:144)、CD8 β 细胞外结构域(SEQ ID NO:145)、CD8 β 跨膜结构域(SEQ ID NO:146)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);或CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD4细胞内结构域(SEQ ID NO:148)。

[0038] 在某些实施方案中,当前公开的主题提供了在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的细胞,其中所述细胞包含外源性T细胞受体(TCR)和外源性CD8,其中外源性CD8包含:CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;或CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。

[0039] 在某些实施方案中,当前公开的主题提供在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的细胞,其中所述细胞包含外源性T细胞受体(TCR)和外源性CD8,其中外源性CD8包含:CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)、CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142)、CD8 β 信号肽(SEQ ID NO:144)、CD8 β 细胞外结构域(SEQ ID NO:145)、CD8 β 跨膜结构域(SEQ ID NO:146)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);或CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD4细胞内结构域(SEQ ID NO:148)。

附图说明

[0040] 图1A-1C.图1A-1C示出了可用于制造NeoTCR产物的NeoE TCR盒和基因编辑方法的实例。图1A示出了示意图,表示用于将新抗原特异性TCR构建体(neoTCR)整合到TCR α 基因座中的一般靶向策略。图1B和1C示出了用于将NeoTCR整合到TCR α 基因座中的新抗原特异性TCR构建体设计,其中显示的盒带有信号序列(“SS”)、蛋白酶切割位点(“P”)和2A肽(“2A”)。图1B示出了靶TCR α 基因座(内源性TRAC,上图)及其CRISPR Cas9靶位点(水平条纹,箭头指示的切割位点),以及带有编码neoTCR的多核苷酸的环状质粒HR模板(下图),其整合前位于左右同源臂(分别为“LHA”和“RHA”)之间。图1C示出了TCR α 基因座中整合的neoTCR(上图)、转录和剪接的neoTCR mRNA(中图)以及表达的neoTCR的翻译和加工(下图)。

[0041] 图2A-2D.图2A-2D示出了用于编码CD8构建体1、2、3和4的环状质粒。图2A示出了用于生产CD8产物1的CD8构建体1。图2B示出了用于生产CD8产物2的CD8构建体2。图2C示出了用于生产CD8产物3的CD8构建体3。图2D示出了用于生产CD8产物4的CD8构建体4。如图2A-2D所示,SS代表信号序列。如图6、7、8和9中所述,SS可以是HGH;然而,可以根据需要使用其他信号序列以进行适当的运输(trafficking)。如图2A-2D所示,P代表蛋白酶切割位点。如图6、7、8和9中所述,P可以是弗林蛋白酶;然而,可以适当地使用其他蛋白酶切割位点以提供本文所述的切割作用。如图2A-2D所示,2A代表2A肽。如图6、7、8和9中所述,2A可以是P2A肽;但是,也可以使用其他2A肽。

[0042] 图3.图3A-3D示出了每个CD8构建体1、2、3和4的转录/剪接和翻译加工,以产生CD8产物1、2、3和4。如图3A-3D所示,SS代表信号序列。如图6、7、8和9中所述,SS可以是HGH;然而,可以根据需要使用其他信号序列以进行适当的运输(trafficking)。如图3A-3D所示,P代表蛋白酶切割位点。如图6、7、8和9中所述,P可以是弗林蛋白酶;然而,可以适当地使用其他蛋白酶切割位点以提供本文所述的切割作用。如图3A-3D所示,2A代表2A肽。如图6、7、8和9中所述,2A可以是P2A肽;但是,也可以使用其他2A肽。

[0043] 图4A和4B.图4A示出了CD8产物1和CD8产物2的翻译产物。图4B示出了CD8产物3和CD8产物4的翻译产物。

[0044] 图5.图5提供了图1A-1C中描述的NeoTCR构建体的示例性DNA序列。核酸的保守取代可以贯穿始终使用以产生相同的翻译产物。此外,当氨基酸可以在功能上没有改变的情

况下被取代时,图5中提供的核酸的取代也可以用于实现被取代的氨基酸赋予翻译的蛋白质基本相似或相同的功能。

[0045] 图6.图6提供了图2A、3A和4A中描述的CD8构建体1(和翻译的CD8产物1)的示例性DNA序列。核酸的保守取代可以贯穿始终使用以产生相同的翻译产物。此外,当氨基酸可以在功能上没有改变的情况下被取代时,图6中提供的核酸的取代也可以用于实现被取代的氨基酸赋予翻译的蛋白质基本相似或相同的功能。

[0046] 图7.图7提供了图2B、3B和4A中描述的CD8构建体2(和翻译的CD8产物2)的示例性DNA序列。核酸的保守取代可以贯穿始终使用以产生相同的翻译产物。此外,当氨基酸可以在功能上没有改变的情况下被取代时,图7中提供的核酸的取代也可以用于实现被取代的氨基酸赋予翻译的蛋白质基本相似或相同的功能。

[0047] 图8.图8提供了图2C、3C和4B中描述的CD8构建体3(和翻译的CD8产物3)的示例性DNA序列。核酸的保守取代可以贯穿始终使用以产生相同的翻译产物。此外,当氨基酸可以在功能上没有改变的情况下被取代时,图8中提供的核酸的取代也可以用于实现被取代的氨基酸赋予翻译的蛋白质基本相似或相同的功能。

[0048] 图9.图9提供了图2D、3D和4B中描述的CD8构建体4(和翻译的CD8产物4)的示例性DNA序列。核酸的保守取代可以贯穿始终使用以产生相同的翻译产物。此外,当氨基酸可以在功能上没有改变的情况下被取代时,图9中提供的核酸的取代也可以用于实现被取代的氨基酸赋予翻译的蛋白质基本相似或相同的功能。

[0049] 图10.图10展示了CD8产物1、2、3和4以及每个CD8产物1、2、3和4的预测的LCK活性的可视描述。

[0050] 图11A-11D.图11A提供了CD8产物1的示例性表达构建体。图11B提供了CD8产物2的示例性表达构建体。图11C提供了CD8产物3的示例性表达构建体。图11D提供了CD8产物4的示例性表达构建体。

[0051] 图12.图12图示了Incucyte实验的设计,以显示CD8产物的杀伤能力。

[0052] 图13A和13B.图13A和13B示出在CD4 T细胞群中,与具有与CD8产物4相同的NeoTCR的NeoTCR产物相比,CD8产物4的肿瘤杀伤能力增加。具体来说,CD8产物4和NeoTCR产物都表达TCR097。然而,CD8产物4也表达CD8构建体4,其包含CD8 α 的细胞外结构域和CD4的细胞内结构域。效应物:靶细胞比值(E:T比值)为1:1(图13A)或2:1(图13B),并且每个都针对每个细胞系的基因编辑进行了归一化。本实验中使用的SW620 COX6C R20Q杂合肿瘤细胞是表达TCR097(CD8依赖性TCR)同族抗原的细胞系。这表明TCR097的低亲和力结合可以通过共表达CD8 α 的细胞外结构域和CD4的细胞内结构域来挽救。

[0053] 图14.图14示出在CD4 T细胞群中,与具有与CD8产物4相同的NeoTCR的NeoTCR产物相比,CD8产物4的肿瘤杀伤能力增加。具体来说,CD8产物4和NeoTCR产物都表达TCR097。然而,CD8产物4也表达CD8构建体4,其包含CD8 α 的细胞外结构域和CD4的细胞内结构域。效应物:靶细胞比值(E:T比值)为1:1、1:2或1:4,并且每个都针对每个细胞系的基因编辑进行了归一化。本实验中使用的SW620 COX6C R20Q纯合肿瘤细胞是表达TCR097同族抗原的细胞系。与图13A和13B所示的相比,在该实验中可以看到增加的杀伤力,因为该细胞系对于同族抗原表达是纯合的;因此,即使TCR97是一种低亲和力的TCR,但同族抗原的增加量克服了低亲和力的限制。

[0054] 图15A和15B.图15A和15B提供示例性对照实验,显示在CD4⁺T细胞群(图15A和15B中的上图)或CD8⁺T细胞群(图15A和15B中的下图)中,与具有与CD8产物4相同的NeoTCR的NeoTCR产物相比,CD8产物4的肿瘤杀伤能力增加,并且CD8产物4更有效地杀死肿瘤而不是简单地在CD8⁺T细胞中表达NeoTCR构建体和CD8产物4。图15A显示E:T比为2:1,图15B显示E:T比为1:1。

[0055] 图16.图16示出了CD8构建体4的表面表达。峰#1是CD4⁺/CD8⁺-T细胞(表达TCR089)中的NeoTCR产物。峰#2是CD8⁺/CD4⁺T细胞中的CD8产物4。峰#3是CD8⁺/CD4⁻T细胞中的NeoTCR产物。如所示,CD8构建体4表现出与NeoTCR产物适当且相当的表面表达。其他CD8构建体也获得了类似的结果(数据未显示)。

[0056] 图17A和17B.图17A和17B显示CD8 α 表达增强CD4⁺T细胞敏感性,同时保持特异性。图17A显示CD8构建体1-4的表达增加了T细胞的敏感性并且不改变CD8产物对NeoTCR的特异性。如所示,CD8构建体的共表达降低了EC50,这表明对NeoTCR的敏感性增加。图17B显示CD8产物1-4对NeoTCR 097的同族抗原具有特异性,因为在存在同族抗原的情况下,CD8产物1-4的CD8细胞仅产生INF γ (即,存在错配抗原时CD8产物1-4的CD8细胞不产生INF γ)。图17A和17B中所示的相同实验是用CD107a代替INF γ 进行的,并且显示了相同的增加的敏感性并且对NeoTCR保持特异性(数据未显示)以确认使用INF γ 的结果。

[0057] 图18.图18显示CD8 α 表达增加了CD8非依赖性NeoTCR中CD4⁺T细胞的敏感性。该图显示了来自不依赖CD8的NeoTCR089的数据。这表明即使NeoTCR不依赖CD8,CD8产物4的敏感性也会增加。这是令人意外的结果:发现即使对于不依赖CD8的TCR也可以提高敏感性。用CD8产物1-3也获得了类似的结果(数据未显示)。因此,与表达相同NeoTCR的NeoTCR产物相比,CD8依赖性(例如NeoTCR097)和CD8非依赖性(例如NeoTCR089)表现出增加的敏感性。

[0058] 详细说明

[0059] 定义

[0060] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有本领域技术人员通常理解的含义。以下参考文献为技术人员提供了本公开主题中使用的许多术语的一般定义: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed.1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed.,1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R.Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 和Hale&Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。如本文所用,除非另有说明,否则以下术语具有以下赋予它们的含义。

[0061] 应当理解,本文描述的本发明的方面和实施方案包括“包括”、“由……组成”和“基本上由……组成”方面和实施方案。术语“包括 (comprises)”和“包含 (comprising)”旨在具有美国专利法赋予它们的广泛含义,可以表示“包括 (includes)”、“包含 (including)”等。

[0062] 如本文所用,术语“约”或“大约”是指在由本领域技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,这将部分取决于如何测量或确定该值,即,测量系统的局限性。例如,根据本领域的实践,“大约”可以表示在3个或超过3个标准差内。或者,“约”可表示给定值的最多20%,例如最多10%、最多5%或最多1%的范围。或者,特别是就生物系统或过程而言,该术语可表示值的数量级内,例如在5倍或2倍内。

[0063] 如本文所用,术语“抗体”以最广泛的含义使用并涵盖各种抗体结构,包括但不限

于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性和三特异性抗体)和抗体片段(例如,双-Fab),只要它们表现出所需的抗原结合活性。如本文所用,“抗体片段”是指除完整抗体之外的分子,其包含完整抗体的一部分,与完整抗体结合的抗原结合。抗体片段的实例包括但不限于双-Fab;Fv;Fab';Fab,Fab'-SH;F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如,scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0064] 术语“癌症”和“肿瘤”在本文中可互换使用。如本文所用,术语“癌症”或“肿瘤”是指所有肿瘤细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,以及所有癌前和癌细胞和组织。这些术语还用于指或描述哺乳动物的生理状况,其通常以不受调控的细胞生长/增殖为特征。癌症可影响多种细胞类型、组织或器官,包括但不限于选自膀胱、骨、脑、乳腺、软骨、神经胶质、食道、输卵管、胆囊、心脏、肠、肾、肝、肺、淋巴结、神经组织、卵巢、胰腺、前列腺、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、泌尿生殖道、输尿管、尿道、子宫和阴道组成的组的器官,或其组织或细胞类型。癌症包括癌症,例如肉瘤、癌或浆细胞瘤(浆细胞的恶性肿瘤)。癌症的实例包括但不限于本文描述的那些。如本文所用,术语“癌症”或“肿瘤”和“增殖性病征”并不相互排斥。

[0065] “CD8”是一种在大多数细胞毒性T淋巴细胞上发现的细胞表面糖蛋白,其介导免疫系统内的有效细胞-细胞相互作用。CD8抗原作为辅助受体,与T淋巴细胞上的T细胞受体一起,在I类MHC分子的背景下识别由抗原呈递细胞展示的抗原。

[0066] 如本文所用,“CD8细胞”是指精确改造以表达一种或多种NeoTCR和CD8构建体的一种或多种细胞。

[0067] 如本文所用,“CD8构建体”是指CD8构建体1、CD8构建体2、CD8构建体3或CD8构建体4中的任何一种。

[0068] 如本文所用,“CD8产物”是指包含CD8细胞的产物。

[0069] “CD8构建体1”和“CD8产物1”是指包含NeoTCR和CD8 α (CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域)的构建体,以及包含表达的NeoTCR和CD8 α 的所得产物。图2A、3A和图6中提供了CD8产物1的非限制性实例。图4A中提供了CD8产物1的非限制性实例。

[0070] “CD8构建体2”和“CD8产物2”是指包含NeoTCR、CD8 α (CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域)和CD8 β (CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域)的构建体,和包含表达的NeoTCR、CD8 α 和CD8 β 的所得产物。图2B、图3B和图7中提供了CD8产物2的非限制性实例。图4A中提供了CD8产物1的非限制性实例。

[0071] “CD8构建体3”和“CD8产物3”是指包含NeoTCR、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域的构建体以及包含表达的NeoTCR、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域的所得产物。图2C、图3C和图8中提供了CD8产物3的非限制性实例。图4B中提供了CD8产物1的非限制性实例。

[0072] “CD8构建体4”和“CD8产物4”是指包含NeoTCR、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域的构建体和包含表达的NeoTCR、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域的所得产物。图2D、图3D和图9中提供了CD8产物4的非限制性实例。图4B中提供了CD8产物1的非限制性实例。

[0073] “保守取代”或“保守氨基酸”是指用化学或功能相似的氨基酸取代氨基酸。提供相似氨基酸的保守取代表是本领域公知的。

[0074] 在某些实施方案中,酸性氨基酸D和E是彼此的保守取代;碱性氨基酸K、R和H是彼此的保守取代;亲水性不带电氨基酸S、T、N和Q是彼此的保守取代;脂肪族不带电荷的氨基酸G、A、V、L和I是彼此的保守取代;非极性不带电荷的氨基酸C、M和P是彼此的保守取代;芳香族氨基酸F、Y和W是彼此的保守取代;A、S和T是彼此的保守取代;D和E是彼此的保守取代;N和Q是彼此的保守取代;R和K是彼此的保守取代;I、L和M是彼此的保守取代;F、Y和W是彼此的保守取代;A和G是彼此的保守取代;D和E是彼此的保守取代;N和Q是彼此的保守取代;R、K和H是彼此的保守取代;I、L、M和V是彼此的保守取代;F、Y和W是彼此的保守取代;S和T是彼此的保守取代;C和M是彼此的保守取代。

[0075] 例如,可以在Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties 2nd ed. (1993) W. H. Freeman & Co., New York, NY 找到其他保守取代。

[0076] “治疗(treat)”、“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”可互换使用,并且如本文所用是指获得有益的或期望的结果,包括临床结果。治疗的理想效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、减轻疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展速度、改善或缓解疾病状态、缓解或改善预后。在一些实施方案中,本发明的NeoTCR产物用于延迟增殖性病症(例如,癌症)的发展或减缓此类疾病的进展。

[0077] 如本文所用,“dextramer”是指与其同族的NeoTCR特异性结合的多聚化新表位-HLA复合物。

[0078] 如本文所用,术语“新抗原”、“新表位”或“neoE”是指新形成的抗原决定簇,其产生于例如体细胞突变并被识别为“非自身的”。产生“新抗原”、“新表位”或“neoE”的突变可包括移码或非移码插入缺失、错义或无义替换、剪接位点改变(例如,选择性剪接转录物)、基因组重排或基因融合、任何基因组或表达改变,或任何翻译后修饰。

[0079] 如本文所用,“NeoTCR”、“NeoE TCR”和“外源性TCR”是指例如通过基因编辑方法引入T细胞中的新表位特异性T细胞受体。如本文所用,术语“TCR基因序列”是指NeoTCR基因序列。

[0080] 如本文所用,“NeoTCR细胞”是指精确改造以表达一种或多种NeoTCR的一种或多种细胞。在某些实施方案中,细胞是T细胞。在某些实施方案中,T细胞是CD8⁺和/或CD4⁺T细胞。在某些实施方案中,CD8⁺和/或CD4⁺T细胞是来自将为其施用NeoTCR产物的患者的自体细胞。术语“NeoTCR细胞”和“NeoTCR-P1 T细胞”和“NeoTCR-P1细胞”在本文中可互换使用。

[0081] 如本文所用,“NeoTCR产物”是指包含一种或多种NeoTCR细胞的药物制剂。NeoTCR产物由自体精确基因组改造的CD8⁺和CD4⁺T细胞组成。使用靶向DNA介导的非病毒精确基因组改造方法,内源性TCR的表达被消除,并被从外周CD8⁺T细胞中分离出的患者特异性NeoTCR替代,该NeoTCR靶向肿瘤独有的新表位。在某些实施方案中,所得改造的CD8⁺或CD4⁺T细胞在其天然序列表面、天然表达水平和天然TCR功能上表达NeoTCR。NeoTCR外部结合结构域和细胞质信号传递结构域的序列未从天然CD8⁺T细胞中分离的TCR修饰。NeoTCR基因表达的调控由位于NeoTCR基因盒整合到基因组中位置的上游的天然内源性TCR启动子驱动。通过这种方法,在未刺激和抗原激活的T细胞状态中观察到NeoTCR表达的天然水平。

[0082] 为每位患者生产的NeoTCR产物代表一定剂量的自体CD8⁺和/或CD4⁺T细胞,这些细胞进行精确基因组改造,以表达从NeoE特异性CD8⁺T细胞克隆的单个NeoE特异性TCR,所述NeoE特异性CD8⁺T细胞从相同患者的外周血中单独分离。

[0083] 除了使用病毒介导的方法进行基因组改造外,本文所用的“NeoTCR病毒产物”具有与NeoTCR产物相同的定义。

[0084] “药物制剂”是指这样一种制剂,其形式允许包含在其中的活性成分的生物活性是有效的,并且不包含对将要施用该制剂的受试者具有不可接受的毒性的额外组分。为清楚起见,NeoTCR产物中使用的DMSO数量被认为不具有不可接受的毒性。

[0085] 用于治疗目的的“受试者”、“患者”或“个体”是指归类为哺乳动物的任何动物,包括人类、家养和农场动物以及动物园、运动或宠物动物,例如狗、马、猫、牛等。优选地,哺乳动物是人。

[0086] 如本文所用,“TCR”是指T细胞受体。

[0087] 如本文所用,术语“肿瘤抗原”是指与正常或非肿瘤细胞相比在肿瘤细胞上独特或差异表达的抗原(例如,多肽)。在某些实施方案中,肿瘤抗原包括由肿瘤表达的能够通过抗原识别受体激活或诱导免疫应答或能够通过受体-配体结合抑制免疫应答的任何多肽。

[0088] 在本文中,“2A”和“2A肽”可互换使用,是指一类长度为18-22个氨基酸的病毒自切割肽,它们能够在真核细胞翻译过程中介导肽的切割。

[0089] 2A肽类的四个众所周知的成员是T2A、P2A、E2A和F2A。T2A肽首先在Thosea asigna病毒2A中鉴定。P2A肽首先在猪猪肠病毒(teschovirus)-1 2A中鉴定。E2A肽首先在马鼻炎A病毒中被发现。F2A肽首先在口蹄疫病毒中被鉴定。

[0090] 2A肽的自切割机制是核糖体跳跃在2A的C端形成甘氨酸-脯氨酸肽键的结果。具体而言,2A肽具有C端保守序列,这是产生空间位阻和核糖体跳跃所必需的。核糖体跳跃可能导致以下三种选择之一:1)成功跳跃和重新开始翻译,导致两个切割的蛋白质(除了C端脯氨酸,连接到完整的2A肽的2A蛋白的上游,和连接到N-末端的一个脯氨酸的2A蛋白的下游;2)成功跳跃但核糖体脱落导致翻译中断,只有2A上游的蛋白质;或3)不成功的跳跃和继续翻译(即融合蛋白)。

[0091] 如本文所用,术语“内源性的”是指通常在细胞或组织中表达的核酸分子或多肽。

[0092] 如本文所用,术语“外源性的”是指非内源性存在于细胞中的核酸分子或多肽。因此,术语“外源性的”将包括在细胞中表达的任何重组核酸分子或多肽,例如外来的、异源的和过表达的核酸分子和多肽。“外源性的”核酸是指不存在于天然野生型细胞中的核酸;例如,外源性核酸可以在序列、位置/定位或两者上与内源性对应物不同。为清楚起见,相对于其天然内源性对应物,外源性核酸可具有相同或不同的序列;它可以通过基因工程引入细胞本身或其祖细胞中,并且可以任选地连接到替代控制序列,例如非天然启动子或分泌序列。

[0093] 与T细胞相关的“年轻”或“更年轻”或“年轻T细胞”是指记忆干细胞(T_{MSC})和中枢记忆细胞(T_{CM})。这些细胞在特异性激活时具有T细胞增殖,并且能够进行多次细胞分裂。它们还具有在重新输注后植入的能力,在暴露于其同族抗原后迅速分化为效应T细胞并靶向和杀死肿瘤细胞,以及持续进行癌症监测和控制。

[0094] NeoTCR产物

[0095] 在一些实施方案中,使用PCT/US2020/17887和PCT/US2019/025415(将其全部纳入本文)中描述的基因编辑技术和neoTCR分离技术,通过精确基因组改造将NeoTCR克隆到来自患有癌症的同一患者的自体CD8⁺和CD4⁺T细胞中(使用图1A-1C中描述的DNA介导的(非病

毒)方法),以表达neoTCR。换句话说,在癌症患者中识别出具有肿瘤特异性的NeoTCR,然后克隆此类NeoTCR,然后将克隆的NeoTCR插入癌症患者的T细胞中。然后以保留“年轻”T细胞表型的方式扩增表达NeoTCR的T细胞,产生NeoTCR-P1产物(即NeoTCR产物),其中大多数T细胞表现出T记忆干细胞和T中枢记忆表型。

[0096] 这些“年轻的”或“更年轻的”或分化程度较低的T细胞表型被描述为赋予改善的植入潜力和输注后延长的持久性。因此,NeoTCR产物(主要由“年轻”T细胞表型组成)的施用有可能使癌症患者受益,通过提高植入潜力、延长输注后的持久性以及快速分化为效应T细胞以在整个身体中根除肿瘤细胞。

[0097] 还对用癌症患者的T细胞制造的NeoTCR产物进行了离体作用机制研究。观察到如通过T细胞杀伤活性、增殖和细胞因子产生的抗原特异性测量的相当的基因编辑效率和功能活性,证明本文所述的制造过程用来自癌症患者的T细胞作为起始材料成功产生了产物。

[0098] 在某些实施方案中,NeoTCR产物制造过程涉及结合指导RNA序列的CRISPR-Cas9核酸酶的双核糖核蛋白类型的电穿孔,每个类型靶向基因组TCR α 和基因组TCR β 基因座。Cas9核酸酶靶向每个基因组基因座的特异性先前已在文献中描述为高度特异性的。分别使用COSMID和GUIDE-seq在体外和计算机分析中对NeoTCR产物进行了全面测试,以调查可能的脱靶基因组切割位点。通过深度测序评估了来自健康供体的多个NeoTCR产物或相当的细胞产物的候选脱靶位点的切割,支持已发表的证据,即所选核酸酶具有高度特异性。

[0099] 精确基因组改造过程的其他方面已经过安全性评估。在通过靶向基因座扩增(TLA)或标准FISH细胞遗传学评估多个NeoTCR产物时,没有发现精确基因组改造后基因组不稳定性的证据。没有检测到NeoTCR序列基因组中任何地方的脱靶整合。在细胞产物中没有发现残留Cas9的证据。

[0100] NeoTCR产物和精确基因组改造过程的综合评估表明,NeoTCR产物在输注回患者后将具有良好的耐受性。

[0101] 本文描述的基因组改造方法能够高效生成定制的NeoTCR T细胞(即NeoTCR产物),用于实体和液体瘤患者的个性化过继细胞疗法。此外,改造方法不限于在T细胞中的使用,也已成功应用于其他原代细胞类型,包括自然杀伤细胞和造血干细胞。

[0102] CD8产物

[0103] MHC I类限制性neoTCR和异位CD8受体在精确基因组改造CD4 T细胞中的共表达显著增强了抗原特异性效应子功能。

[0104] 来自肿瘤排他性突变的新表位代表了实体瘤患者个性化neoE特异性自体TCR-T细胞疗法的引人注目的靶标。在PCT/US2020/17887中描述的imPACT分离技术是一种超灵敏和高通量的过程,用于从实体癌患者的血液中捕获neoE特异性CD8 T细胞,该PCT/US2020/17887通过引用全部纳入本文。利用这项技术,从单独捕获的CD8 T细胞中克隆出新表位特异性MHC I类限制性TCR(“MHC-I neoTCR”)。使用如实施例1中描述的DNA介导的(非病毒)基因编辑,来自同一癌症患者的新鲜CD8和CD4 T细胞被改造为表达MHC-I neoTCR(同时消除内源性TCR)。

[0105] 虽然推测天然存在的MHC-I TCR需要同时存在的CD8辅助受体帮助稳定肽-MHC结合,但更高亲和力的TCR能够驱动不依赖CD8的靶标结合和T细胞激活。CD4 T细胞在使用高亲和力的neoTCR进行改造时,因此能够识别肽-MHC-I靶标并触发效应T细胞功能。然而,较

低亲和力的TCR依赖于CD8辅助受体来触发T细胞活化。通过将CD8辅助受体基因与neoTCR一起精确基因组改造到CD4 T细胞中,使MHC-I neoTCR能够触发抗原特异性效应T细胞功能。

[0106] CD8稳定TCR-pMHC相互作用并与TCR协同作用以获得亲合力。CD8还用于增强低亲和力和TCR的亲合力,而CD8 α 的细胞内结构域对于增强T细胞活化至关重要。CD8的表达可能会增强CD4 T细胞反应,这可能对pMHC的生理浓度没有反应。CD8与MHC结合的中断可以将捕获键TCR-pMHC转化为滑键,这突出了CD8-MHC相互作用的重要性,即使对于不依赖CD8结合pMHC的TCR。

[0107] CD8 α 对LCK的亲合力低于CD8 β ,这表明CD8 α 和CD8 β 的共表达或产生包含细胞外CD8 α 和CD8 β 细胞内结构域的嵌合CD8 α -CD8 β 分子可以提高有效性。本文所述的CD8构建体是:

[0108] 1. CD8 α 同源二聚体 (CD8构建体1)

[0109] 2. CD8 α -P2A-CD8 β (CD8构建体2)

[0110] 3. CD8 α 与CD8 β 细胞内结构域 (CD8构建体3)

[0111] 4. CD8 α 同源二聚体与CD4细胞内结构域 (CD8构建体4)

[0112] 在一些实施方案中,上述NeoTCR产品包括额外的修饰以包括CD8构建体1、CD8构建体2、CD8构建体3或CD8构建体4(每个都是CD8产物)的表达。具体而言,使用PCT/US2020/17887和PCT/US2019/025415中描述的基因编辑技术和neoTCR分离技术(将其全部纳入本文),通过精确基因组改造将NeoTCR克隆到来自患有癌症的同一患者的自体CD8 $^{+}$ 和CD4 $^{+}$ T细胞中(使用图1A-1C中描述的DNA介导的(非病毒)方法),以表达neoTCR。

[0113] 每个CD8构建体在表达时都会产生CD8产物。表1提供了每个构建体和产物的描述。

[0114] 表1 CD8产物和CD8构建体

CD8 构建体	CD8 产物	表达组件	示例性构建体	示例性产物
CD8 构建体 1	CD8产物1	NeoTCR、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域	图 2A、图 6	图 3A、图 4A
CD8 构建体 2	CD8 产物 1	NeoTCR、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域、CD8 β 细胞内结构域	图 2B、图 7	图 3B、图 4A
CD8 构建体 3	CD8 产物 1	NeoTCR、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 β 细胞内结构域	图 2C、图 8	图 3C、图 4B
CD8 构建体 4	CD8 产物 1	NeoTCR、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD4 细胞内结构域	图 2D、图 9	图 3D、图 4B

[0115] 在某些实施方案中,CD8产物1包含NeoTCR和CD8同源二聚体。在某些实施方案中,CD8产物1包含NeoTCR、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域的表达。在某些实施方案中,CD8产物1进一步包括CD8 α 信号肽的表达。在某些实施方案中,CD8产物1包含图3A中呈现的翻译元件。在非限制性示例性实施方案中,CD8产物1包含NeoTCR、CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:

141)和CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142)。在某些实施方案中,可以对CD8 α 信号肽、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域进行序列修饰,以保留或基本上保留每个元件的功能。在某些实施方案中,此类序列修饰是氨基酸的保守取代。

[0117] 在非限制性实施方案中,CD8产物1由图6中提供的CD8构建体1制造。在某些实施方案中,图6中提供的CD8构建体1的序列可以以任意数量的方式修饰,只要CD8 α 信号肽、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域的翻译使每个元件保持保守功能。在某些实施方案中,图6中CD8构建体1的每个元件的顺序保持相同,但可以改变每个单独元件的序列,只要核酸编码的氨基酸保持相同或仅包含保守取代。在某些实施方案中,图6中CD8构建体1的每个元件的顺序保持相同,但可以改变每个单独元件的序列,只要所编码蛋白质的功能基本保持不变。

[0118] 在某些实施方案中,CD8产物2包含NeoTCR、CD8 α 和 α CD8 β 。在某些实施方案中,CD8 α 和CD8 β 被CD8产物2构建体中的蛋白酶切割位点和2A肽分开,用于表达。在某些实施方案中,CD8产物2包含NeoTCR、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域的表达。在某些实施方案中,CD8产物2进一步包含CD8 α 信号肽的表达。在某些实施方案中,CD8产物进一步包含CD8 β 信号肽的表达。在某些实施方案中,CD8产物进一步包含CD8 α 信号肽和CD8 β 信号肽的表达。在某些实施方案中,CD8产物2包含图3B中呈现的翻译元件。在非限制性示例性实施方案中,CD8产物2包含NeoTCR、CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)、CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142)、CD8 β 信号肽(SEQ ID NO:144)、CD8 β 细胞外结构域(SEQ ID NO:145)、CD8 β 跨膜结构域(SEQ ID NO:146)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147)。在某些实施方案中,可以对CD8 α 信号肽、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域进行序列修饰,以保留或基本上保留每个元件的功能。在某些实施方案中,此类序列修饰是氨基酸的保守取代。

[0119] 在非限制性实施方案中,CD8产物2由图7中提供的CD8构建体2制造。在某些实施方案中,图7中提供的CD8构建体2的序列可以以任意数量的方式修饰,只要CD8 α 信号肽、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域的翻译使每个元件保持保守功能。在某些实施方案中,图7中CD8构建体2的每个元件的顺序保持相同,但可以改变每个单独元件的序列,只要核酸编码的氨基酸保持相同或仅包含保守取代。在某些实施方案中,图7中CD8构建体2的每个元件的顺序保持相同,但可以改变每个单独元件的序列,只要所编码蛋白质的功能基本保持不变。

[0120] 在某些实施方案中,CD8产物3包含NeoTCR和CD8 α 及CD8 β 细胞内结构域。在某些实施方案中,CD8产物3包含NeoTCR、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域的表达。在某些实施方案中,CD8产物3进一步包括CD8 α 信号肽的表达。在某些实施方案中,CD8产物3包含图3C中呈现的翻译元件。在非限制性示例性实施方案中,CD8产物3包含NeoTCR、CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147)。在某些实施方案中,可以对CD8 α 信号肽、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域进行序列修饰,以保留或基本上保留每个元件的功能。在某些实施方案中,此类序列修饰是氨基酸的保守取代。

[0121] 在非限制性实施方案中,CD8产物3由图8中提供的CD8构建体3制造。在某些实施方案中,图8中提供的CD8构建体3的序列可以以任意数量的方式修饰,只要CD8 α 信号肽、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域的翻译使每个元件保持保守功能。在某些实施方案中,图8中CD8构建体3的每个元件的顺序保持相同,但可以改变每个单独元件的序列,只要核酸编码的氨基酸保持相同或仅包含保守取代。在某些实施方案中,图8中CD8构建体3的每个元件的顺序保持相同,但可以改变每个单独元件的序列,只要所编码蛋白质的功能基本保持不变。

[0122] 在某些实施方案中,CD8产物4包含NeoTCR和CD8 α 同源二聚体及CD4细胞内结构域。在某些实施方案中,CD8产物4包含NeoTCR、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域的表达。在某些实施方案中,CD8产物4进一步包括CD8 α 信号肽的表达。在某些实施方案中,CD8产物4包含图3D中呈现的翻译元件。在非限制性示例性实施方案中,CD8产物4包含NeoTCR、CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD4细胞内结构域(SEQ ID NO:148)。在某些实施方案中,可以对CD8 α 信号肽、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域进行序列修饰,以保留或基本上保留每个元件的功能。在某些实施方案中,此类序列修饰是氨基酸的保守取代。

[0123] 在非限制性实施方案中,CD8产物4由图9中提供的CD8构建体4制造。在某些实施方案中,图9中提供的CD8构建体4的序列可以以任意数量的方式修饰,只要CD8 α 信号肽、CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域的翻译使每个元件保持保守功能。在某些实施方案中,图9中CD8构建体4的每个元件的顺序保持相同,但可以改变每个单独元件的序列,只要核酸编码的氨基酸保持相同或仅包含保守取代。在某些实施方案中,图9中CD8构建体4的每个元件的顺序保持相同,但可以改变每个单独元件的序列,只要所编码蛋白质的功能基本保持不变。

[0124] 在某些实施方案中,CD8产物包含TET2敲除或TET2敲减。在某些实施方案中,CD8产物的细胞被进一步改造以使用非病毒方法敲除TET2基因。在某些实施方案中,CD8产物的细胞被进一步改造以使用病毒方法敲除TET2基因。在某些实施方案中,CD8产物的细胞被进一步改造以通过使用非病毒方法敲除、敲减或修饰与T细胞持久性相关的基因的功能来增加T细胞持久性。在某些实施方案中,CD8产物的细胞被进一步改造以通过使用病毒方法敲除、敲减或修饰与T细胞持久性相关的基因的功能来增加T细胞持久性。

[0125] 在一些实施方案中,CD8产物包含使用病毒方法被改造以表达NeoTCR和CD8构建体的细胞(即,CD8病毒产物)。在某些实施方案中,CD8病毒产物的细胞被进一步改造以使用非病毒方法敲除TET2基因。在某些实施方案中,CD8病毒产物的细胞被进一步改造以使用病毒方法敲除TET2基因。在某些实施方案中,CD8病毒产物的细胞被进一步改造以通过使用非病毒方法敲除、敲减或修饰与T细胞持久性相关的基因的功能来增加T细胞持久性。在某些实施方案中,CD8病毒产物的细胞被进一步改造以通过使用病毒方法敲除、敲减或修饰与T细胞持久性相关的基因的功能来增加T细胞持久性。

[0126] 在某些实施方案中,被敲除、敲减或具有修饰功能的T细胞持久性基因是赋予T细胞活性下调的基因。在某些实施方案中,被敲除、敲减或修饰的基因是下调T细胞记忆功能的基因。在某些实施方案中,被敲除、敲减或修饰的基因是降低T细胞功能、增殖和/或存活力的基因。

[0127] 在某些实施方案中,对CD8产物及其CD8细胞的额外修饰包括增加肿瘤微环境恢复力、增加T细胞活性、增加肿瘤微环境归巢(homing)/保留、增加T细胞持久性和增加T细胞的异位效应子功能的修饰。在某些实施方案中,肿瘤微环境恢复力包括但不限于转换/抵消负面环境信号。在某些实施方案中,TCR介导的信号增强包括但不限于增加T细胞活性。在某些实施方案中,肿瘤微环境归巢/保留包括但不限于增强肿瘤浸润。在某些实施方案中,功能性T细胞持久性包括但不限于代谢和转录调控。在某些实施方案中,异位效应子功能包括但不限于TCR诱导的抗体、细胞因子或肽分泌。

[0128] 在某些实施方案中,功能性T细胞持久性可通过如本文所述的基因工程、通过改善经修饰的T细胞的功能性T细胞持久性的药剂的共同施用来实现(经修饰以掺入如本文所述的至少neoTCR),并且通过修饰的T细胞的制造和培养条件(修饰以掺入至少本文所述的neoTCR)来实现。

[0129] 在某些实施方案中,用于改善异位效应子功能的TCR诱导的抗体是本文所述的抗体或其功能片段的任何一种。在某些实施方案中,用于改善异位效应子功能的TCR诱导的细胞因子是天然存在的细胞因子、修饰的细胞因子、细胞因子的融合蛋白或其任何组合。在某些实施方案中,TCR诱导的细胞因子不是细胞因子,而是诱导内源性细胞因子产生的其他辅助因子或表达元件。

[0130] 在某些实施方案中,对CD8产物及其CD8细胞的额外修饰包括敲入一种或多种额外基因和/或功能蛋白的修饰。在某些实施方案中,敲入的基因和/或功能蛋白包括但不限于c-Myb、显性失活FAS、FAS截短、FBXW7、CTP1A、OPA1、GLUT1、CA-STAT5A、显性失活TGF β R、DNMT3a、显性失活PD-1R、显性失活PD-1或PD-L1、或PD-L2、显性失活SHIP-1蛋白、整联蛋白、趋化因子受体、细胞因子和白细胞介素。在某些实施方案中,基因的显性失活形式是作为基因拮抗剂的抗体或其功能片段。例如,显性失活PD-1可以是抗PD-1抗体或其功能片段。在某些实施方案中,基因和/或功能蛋白中的任何敲入是基因和/或蛋白的功能片段(包括但不限于截短)。

[0131] 在某些实施方案中,对CD8产物及其CD8细胞的额外修饰包括敲除或敲减一种或多种额外基因和/或功能蛋白的修饰。在某些实施方案中,敲除或敲减的基因和/或功能蛋白包括但不限于TET2、IFNGR1、RICTOR、NR4A1、DNMT3A、SUV39H1、PPP2RD、腺苷2A受体、PP2A3和PP2A4。

[0132] 在某些实施方案中,代替敲入用于表达功能性蛋白质的基因,可以通过本文所述的基因工程来调节不同的基因,其上调否则将被敲入的基因的表达。

[0133] 在某些实施方案中,代替敲除或敲除基因,可以通过本文所述的基因工程来调节不同的基因,其下调否则将被敲除的基因的表达。

[0134] CD8产物制造过程包括对结合至指导RNA序列的CRISPR-Cas9核酸酶的双核糖核蛋白类型进行电穿孔,每个类型都靶向基因组TCR α 和基因组TCR β 基因座。将Cas9核酸酶靶向每个基因组基因座的特异性先前已在文献中描述为高度特异的。分别使用COSMID和GUIDE-seq在体外和计算机分析中对CD8产物进行了全面测试,以调查可能的脱靶基因组切割位点。通过深度测序评估了来自健康供体的多个CD8产物或相当的细胞产物的候选脱靶位点的切割,支持已发表的证据,即所选核酸酶具有高度特异性。

[0135] 在某些实施方案中,本文描述的CD8产物可以是T细胞、NK细胞、NKT细胞、巨噬细

胞、造血干细胞(HSC)、源自HSC的细胞或树突/抗原呈递细胞。

[0136] 在某些实施方案中,CD8细胞以保留“年轻”T细胞表型的方式扩增,产生CD8产物,其中大部分T细胞表现出T记忆干细胞和T中枢记忆表型。

[0137] 这些“年轻的”或“更年轻的”或分化程度较低的T细胞表型被描述为赋予改善的植入潜力和输注后延长的持久性。因此,CD8产物(主要由“年轻”T细胞表型组成)的施用有可能使癌症患者受益,通过提高植入潜力、延长输注后的持久性以及快速分化为效应T细胞以在整个身体中根除肿瘤细胞。

[0138] 在某些实施方案中,CD8产物的CD8细胞主要包括记忆干细胞(Tmsc)和/或中枢记忆细胞(Tcm)。在某些实施方案中,CD8产物的至少25%的CD8细胞包含记忆干细胞(Tmsc)和/或中枢记忆细胞(Tcm)。在某些实施方案中,CD8产物的至少30%的CD8细胞包含记忆干细胞(Tmsc)和/或中枢记忆细胞(Tcm)。在某些实施方案中,CD8产物的至少35%的CD8细胞包含记忆干细胞(Tmsc)和/或中枢记忆细胞(Tcm)。在某些实施方案中,CD8产物的至少40%的CD8细胞包含记忆干细胞(Tmsc)和/或中枢记忆细胞(Tcm)。在某些实施方案中,CD8产物的至少45%的CD8细胞包含记忆干细胞(Tmsc)和/或中枢记忆细胞(Tcm)。在某些实施方案中,CD8产物的至少50%的CD8细胞包含记忆干细胞(Tmsc)和/或中枢记忆细胞(Tcm)。在某些实施方案中,CD8产物的至少55%的CD8细胞包含记忆干细胞(Tmsc)和/或中枢记忆细胞(Tcm)。在某些实施方案中,CD8产物的至少60%的CD8细胞包含记忆干细胞(Tmsc)和/或中枢记忆细胞(Tcm)。在某些实施方案中,CD8产物的至少65%的CD8细胞包含记忆干细胞(Tmsc)和/或中枢记忆细胞(Tcm)。在某些实施方案中,CD8产物的至少70%的CD8细胞包含记忆干细胞(Tmsc)和/或中枢记忆细胞(Tcm)。在某些实施方案中,CD8产物的至少75%的CD8细胞包含记忆干细胞(Tmsc)和/或中枢记忆细胞(Tcm)。在某些实施方案中,CD8产物的75%以上的CD8细胞包含记忆干细胞(Tmsc)和/或中枢记忆细胞(Tcm)。Tmsc被表征为CD45RA+CD62L+、CD28+CD95+和CCR7+CD27+的细胞。Tcm被表征为CD45RO+CD62L+、CD28+CD95+和CCR7+CD27+CD127+的细胞。Tmsc和Tcm都被表征为具有弱效应子T细胞功能、强增殖、强植入和长端粒。

[0139] 在某些实施方案中,与不具有CD8构建体的细胞相比,本文公开的CD8细胞显示出约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约100%、约150%、约200%、约250%、约300%、约350%、约400%、约450%或约500%的改善的特性(例如,杀伤活性、细胞增殖、细胞因子分泌、LCK亲和力、持久性、肿瘤浸润能力)。

[0140] 生产具有年轻表型的CD8产物的方法

[0141] 在某些实施方案中,本公开部分涉及改造的“年轻”T细胞的生产。在某些实施方案中,本公开包括用于离体产生抗原特异性细胞例如T细胞的方法,包括活化、改造和扩增最初从受试者获得或从此类样品分离的抗原特异性细胞。

[0142] 在某些实施方案中,激活细胞的方法包括激活TCR/CD3复合体的步骤。例如但不限于,T细胞可以与CD3激动剂、CD28激动剂或其组合一起温育和/或培养。

[0143] 在某些实施方案中,可以通过用细胞因子、趋化因子、可溶性肽或其组合培养改造的活化的抗原特异性细胞(例如T细胞)来扩增改造的活化的抗原特异性细胞,例如改造的活化的T细胞。在某些实施方案中,改造的活化的抗原特异性细胞,例如改造的活化的T细胞,可以与一种或多种细胞因子一起培养。在某些实施方案中,细胞因子可以是IL2、IL7、

IL15或其组合。例如,改造的活化的抗原特异性细胞,例如改造的活化的T细胞,可以与IL7和IL15一起培养。在某些实施方案中,与改造的活化的抗原特异性细胞(例如改造的活化的T细胞)培养物结合使用的细胞因子可以以约1pg/ml至约1g/ml、约1ng/ml至约1g/ml,约1 μ g/ml至约1g/ml,或约1mg/ml至约1g/ml,以及介于两者之间的任何值的浓度存在。

[0144] 药物制剂

[0145] CD8产物的药物制剂是通过将CD8细胞混合在溶液中来制备的,该溶液可以在冷冻保存状态下保存细胞的“年轻”表型。表1提供了一种此类药物制剂的实例。或者,CD8产物的药物制剂可以通过将CD8细胞混合在溶液中来制备,该溶液可以保存细胞的“年轻”表型,而无需冷冻或冷冻保存产品(即,CD8产物保存在水溶液中或作为非冷冻/冷冻保存的细胞沉淀)。

[0146] 还可以将额外的药学上可接受的载体、缓冲剂、稳定剂和/或防腐剂添加到冷冻保存溶液或水性保存溶液中(如果CD8产物不是冷冻保存的)。任何冷冻保存剂和/或培养基都可用于冷冻保存CD8产物,包括但不限于CryoStor、CryoStor CS5、CELLBANKER和定制的冷冻保存培养基(任选地包含DMSO)。

[0147] 基因编辑方法

[0148] 在某些实施方案中,本公开部分涉及改造人类细胞例如改造的T细胞或改造的人类干细胞的方法。在某些实施方案中,本公开部分涉及改造人类细胞,例如NK细胞、NKT细胞、巨噬细胞、造血干细胞(HSC)、源自HSC的细胞或树突/抗原呈递细胞的方法。在某些实施方案中,此类改造涉及基因组编辑。例如,但不作为限制,这种基因组编辑可以用靶向一个或多个内源基因座,例如TCR α (TCR α)基因座和TCR β (TCR β)基因座的核酸酶来完成。在某些实施方案中,核酸酶可以在内源性靶序列中产生单链DNA切口或双链DNA断裂。在某些实施方案中,核酸酶可以靶向基因组的编码或非编码部分,例如外显子、内含子。在某些实施方案中,本文设想的核酸酶包括归巢内切核酸酶、大范围核酸酶、megaTAL核酸酶、转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)和成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)/Cas核酸酶。在某些实施方案中,核酸酶本身可以被改造,例如通过引入氨基酸取代和/或缺失,以增加切割活性的效率。

[0149] 在某些实施方案中,CRISPR/Cas核酸酶系统用于改造人类细胞。在某些实施方案中,CRISPR/Cas核酸酶系统包含Cas核酸酶和一种或多种将Cas核酸酶招募到内源性靶序列例如单个指导RNA的RNA。在某些实施方案中,将Cas核酸酶和RNA分别引入细胞中,例如使用不同的载体或组合物,或一起使用,例如,在多顺反子构建体或单个蛋白质-RNA复合体中。在某些实施方案中,Cas核酸酶是Cas9或Cas12a。在某些实施方案中,Cas9多肽从细菌物种获得,包括但不限于酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)或脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)。CRISPR/Cas系统的其他实例是本领域已知的。见Adli, Mazhar. “The CRISPR tool kit for genome editing and beyond.” *Nature communications* vol.9,1 1911(2018),其教导的所有内容通过引用纳入本文。

[0150] 在某些实施方案中,基因组编辑发生在一个或多个调控免疫反应的基因组基因座。在某些实施方案中,基因座包括但不限于TCR α (TCR α)基因座、TCR β (TCR β)基因座、TCR γ (TCR γ)和TCR δ (TCR δ)。在某些实施方案中,用于插入CD8构建体的基因座位于基因组中的任何位置。在某些实施方案中,用于插入CD8构建体的基因座是TRAC基因座。在某些实施方

案中,用于插入CD8构建体的基因座是两个TRBC基因座之一。在某些实施方案中,用于插入CD8构建体的基因座是不同于TRAC基因座或TRAB基因座的基因座。在某些实施方案中,用于插入CD8构建体的基因座被插入到基因基因座中,其中该基因被敲除。作为非限制性实例,如果CD8产物的所需表型是NeoTCR的表达、CD8构建体的表达以及TET2基因或AAVS1基因的敲除,则CD8构建体可以插入在TET2基因座或AAVS1基因座。在某些实施方案中,CD8构建体的插入与NeoTCR插入串联。在某些实施方案中,CD8构建体的插入是与NeoTCR插入不同的基因座。

[0151] 在某些实施方案中,通过使用非病毒递送系统进行基因组编辑。例如,可以通过在脂质转染的存在下施用核酸(Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987; Ono et al., Neuroscience Letters 17:259, 1990; Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger et al., Methods in Enzymology 101:512, 1983), 无唾液酸血清类粘蛋白-聚赖氨酸缀合(Wu et al., Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu et al., Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989), 或通过手术条件下的显微注射(Wolff et al., Science 247:1465, 1990)来将核酸分子引入细胞中。用于基因转移的其他非病毒方法包括使用磷酸钙、DEAE葡聚糖、电穿孔和原生质体融合进行体外转染。脂质体也可能有利于将DNA递送到细胞中。将正常基因移植到受试者的受影响组织中也可以通过将正常核酸转移到离体可培养的细胞类型(例如,自体或异源原代细胞或其后代)中来实现,然后将该细胞(或其后代)注射到靶组织或全身注射。

[0152] 在某些实施方案中,通过使用病毒递送系统进行基因组编辑。在某些实施方案中,病毒方法包括靶向整合(包括但不限于AAV)和随机整合(包括但不限于慢病毒方法)。在某些实施方案中,病毒递送将在没有整合核酸酶的情况下完成。在这样的实施方案中,病毒递送系统可以是Lentiflash或另一个类似的递送系统。

[0153] 同源重组模板

[0154] 在某些实施方案中,本公开提供细胞的基因组编辑,通过将同源重组(HR)模板核酸序列引入和重组到细胞的内源基因座中进行。在某些实施方案中,HR模板核酸序列是线性的。在某些实施方案中,HR模板核酸序列是环状的。在某些实施方案中,环状HR模板可以是质粒、微环或纳米质粒。在某些实施方案中,HR模板核酸序列包含第一和第二同源臂。在某些实施方案中,同源臂可为约300个碱基至约2,000个碱基。例如,每个同源臂可以是1,000个碱基。在某些实施方案中,同源臂可以与细胞的第一和第二内源序列同源。在某些实施方案中,内源基因座是TCR基因座。例如,第一和第二内源序列在TCR α 基因座或TCR β 基因座内。在某些实施方案中,HR模板包含TCR基因序列。在非限制性实施方案中,TCR基因序列是患者特异性TCR基因序列。在非限制性实施方案中,TCR基因序列是肿瘤特异性的。在非限制性实施方案中,可以使用PCT/US2020/017887中描述的方法鉴定和获得TCR基因序列,将PCT/US2020/017887的内容通过引用纳入本文。在某些实施方案中,HR模板包含TCR α 基因序列和TCR β 基因序列。

[0155] 在某些实施方案中,HR模板是多顺反子多核苷酸。在某些实施方案中,HR模板包含编码灵活多肽序列(例如,Gly-Ser-Gly序列)的序列。在某些实施方案中,HR模板包含编码内部核糖体进入位点(IRES)的序列。在某些实施方案中,HR模板包含2A肽(例如,P2A、T2A、E2A和F2A)。关于HR模板核酸和修饰其细胞的方法的其他信息可以在国际专利申请号PCT/

US2018/058230中找到,其内容通过引用纳入本文。

[0156] 治疗方法

[0157] 当前公开的主题提供了在有需要的受试者中诱导和/或增加免疫应答的方法。CD8产物可用于治疗和/或预防受试者的癌症。CD8产物可用于延长患有癌症的受试者的生存期。CD8产物还可用于治疗 and/或预防受试者的癌症。CD8产物还可用于减少受试者的肿瘤负荷。此类方法包括以有效量施用CD8产物或包含其的组合物(例如,药物组合物)以实现所需效果,无论是缓解现有病症还是预防复发。对于治疗,给药量是产生所需效果的有效量。可以在一次或一系列给药中提供有效量。可以推注或通过连续灌注提供有效量。

[0158] 在某些实施方案中,CD8产物可用于治疗病毒或细菌疾病。在某些实施方案中,CD8产物可用于治疗自身免疫疾病。

[0159] 在某些实施方案中,有效量的CD8产物通过IV给药递送。在某些实施方案中,CD8产物通过IV给药在单次给药中递送。在某些实施方案中,CD8产物通过IV给药在多次给药中递送。在某些实施方案中,CD8产物通过IV给药在两次或更多次给药中递送。在某些实施方案中,CD8产物通过IV给药在两次给药中递送。在某些实施方案中,CD8产物通过IV给药在三次给药中递送。

[0160] 当前公开的主题提供了用于治疗 and/或预防受试者的癌症的方法。在某些实施方案中,该方法包括向患有癌症的受试者施用有效量的CD8产物。

[0161] 癌症的非限制性实例包括血癌(例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、卵巢癌、乳腺癌、膀胱癌、脑癌、结肠癌、肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、胶质母细胞瘤、喉癌、黑色素瘤、成神经细胞瘤、腺癌、胶质瘤、软组织肉瘤和各种癌症(包括前列腺癌和小细胞肺癌)。合适的癌还包括肿瘤学领域中任何已知的,包括但不限于星形细胞瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、原始神经外胚层肿瘤(PNET)、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、胰腺导管腺癌、小细胞和大细胞肺腺癌、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、鳞状细胞癌、支气管肺泡癌、上皮腺癌及其肝转移瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管成内皮肉瘤、肝细胞瘤、胆管癌、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、基底细胞癌、汗腺癌、乳头状癌、皮脂腺癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维尔姆斯瘤、睾丸肿瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤、白血病、多发性骨髓瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症和重链疾病,乳腺肿瘤,如导管和小叶腺癌,子宫颈鳞和腺癌,子宫和卵巢上皮癌,前列腺腺癌,膀胱移行性鳞状细胞癌,B和T细胞淋巴瘤(结节性和弥漫性)浆细胞瘤,急性和慢性白血病、恶性黑色素瘤、软组织肉瘤和平滑肌肉瘤。在某些实施方案中,瘤形成选自自由血癌(例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌、脑癌、结肠癌、肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、胶质母细胞瘤和喉癌组成的组。在某些实施方案中,当前公开的年轻T细胞和包含其的组合物可用于治疗和/或预防不愿接受常规治疗干预的血癌(例如,白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)或卵巢癌。

[0162] 在某些实施方案中,瘤形成是实体癌或实体瘤。在某些实施方案中,实体瘤或实体癌选自自由胶质母细胞瘤、前列腺腺癌、肾乳头状细胞癌、肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、直肠腺癌、结肠腺癌、食管癌、子宫内膜样癌、乳腺癌、皮肤皮肤黑色素瘤、肺腺癌、胃腺癌、宫颈癌和子宫

颈癌、肾透明细胞癌、睾丸生殖细胞肿瘤和侵袭性B细胞淋巴瘤组成的组。

[0163] 受试者可能患有晚期疾病,在这种情况下,治疗目标可以包括缓解或逆转疾病进展,和/或改善副作用。受试者可能有病史,他们已经接受过治疗,在这种情况下,治疗目标通常包括降低或延迟复发风险。

[0164] 用于治疗合适的人类受试者通常包括可以通过临床标准区分的两个治疗组。患有“晚期疾病”或“高肿瘤负荷”的受试者是那些携带临床可测量肿瘤的受试者。临床上可测量的肿瘤可以根据肿瘤质量检测(例如,通过触诊、CAT扫描、超声检查、乳房X光检查或X射线;阳性生化或组织病理学标志物本身不足以识别该群体)的肿瘤。向这些受试者施用药物组合物以引发抗肿瘤反应,目的是减轻他们的病症。理想情况下,结果是肿瘤质量减少,但任何临床改善都构成益处。临床改善包括降低风险或进展速度或减轻肿瘤的病理后果。

[0165] 制成品

[0166] CD8产物可与制成品结合使用。此类制成品可用于预防或治疗增殖性病症(例如,癌症)。制成品的实例包括但不限于容器(例如,输液袋、瓶子、储存容器、烧瓶、小瓶、注射器、管和IV溶液袋)和容器上或与容器相关的标签或包装插页。容器可以由任何可接受用于在CD8产物中储存和保存CD8细胞的材料制成。在某些实施方案中,容器可以是具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。例如,容器可以是CryoMACS冷冻袋。标签或包装插页表明CD8产物用于治疗所选病症和原始患者。由于CD8产物由自体细胞制成,并被改造为患者特异性和个性化治疗,因此在CD8产物的容器上对患者进行了鉴别。

[0167] 制成品可包括:1) 第一容器,其含有CD8产物。

[0168] 制成品可包括:1) 第一容器,其含有CD8产物;2) 第二容器,其具有的CD8产物与第一容器含有的相同。任选地,可以准备和制造具有与第一和第二容器相同的CD8产物的额外的容器。任选地,包含包括不同细胞毒性剂或其他治疗剂的组合物的额外容器也可以与上述容器组合。

[0169] 制成品可包括:1) 第一容器,其含有CD8产物;和2) 第二容器,其含有组合物,其中所述组合物包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂。

[0170] 制成品可包括:1) 第一容器,其含有两种CD8产物;和2) 第二容器,其含有组合物,其中所述组合物包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂。

[0171] 制成品可包括:1) 第一容器,其含有CD8产物;2) 第二容器,其含有第二CD8产物;和3) 任选地第三容器,其含有组合物,其中所述组合物包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂。在某些实施方案中,第一和第二CD8产物是不同的CD8产物。在某些实施方案中,第一和第二CD8产物是相同的CD8产物。

[0172] 制成品可包括:1) 第一容器,其含有三种CD8产物;和2) 任选地,第二容器,其含有组合物,其中所述组合物包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂。

[0173] 制成品可包括:1) 第一容器,其含有CD8产物;2) 第二容器,其含有第二CD8产物;3) 第三容器,其含有第三CD8产物;和4) 任选地第四容器,其含有组合物,其中所述组合物包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂。在某些实施方案中,第一、第二和第三CD8产物是不同的CD8产物。在某些实施方案中,第一、第二和第三CD8产物是相同的CD8产物。在某些实施方案中,第一、第二和第三CD8产物中的两个是相同的CD8产物。

[0174] 制成品可包括:1) 第一容器,其含有四种CD8产物;和2) 任选地,第二容器,其含有

组合物,其中所述组合物包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂。

[0175] 制成品可包括:1) 第一容器,其含有CD8产物;2) 第二容器,其含有第二CD8产物;3) 第三容器,其含有第三CD8产物;4) 第四容器,其含有第四CD8产物;和5) 任选地第五容器,其含有组合物,其中所述组合物包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂。在某些实施方案中,第一、第二、第三和第四CD8产物是不同的CD8产物。在某些实施方案中,第一、第二、第三和第四CD8产物是相同的NeoTCR产物。在某些实施方案中,第一、第二、第三和第四CD8产物中的两个是相同的NeoTCR产物。在某些实施方案中,第一、第二、第三和第四CD8产物中的三个是相同的CD8产物。

[0176] 制成品可包括:1) 第一容器,其含有五种或更多种CD8产物;和2) 任选地,第二容器,其含有组合物,其中所述组合物包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂。

[0177] 制成品可包括:1) 第一容器,其含有CD8产物;2) 第二容器,其含有第二CD8产物;3) 第三容器,其含有第三CD8产物;4) 第四容器,其含有第四CD8产物;5) 第五容器,其含有第五CD8产物;6) 任选地,第六或更多的额外容器,其含有第六或更多种CD8产物;和7) 任选地额外的容器,其含有组合物,其中所述组合物包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂。在某些实施方案中,所有CD8产物的容器都是不同的CD8产物。在某些实施方案中,所有CD8产物的容器都是相同的CD8产物。在某些实施方案中,基于患者肿瘤样品中可检测CD8的可用性、需要和/或希望具有用于患者的多种CD8产物,以及可能需要或受益于一个或多个容器的任何一种CD8产物的可用性,可以有五个或更多个容器中相同或不同的CD8产物的任意组合。

[0178] 制成品可包括:1) 第一容器,其含有CD8产物;2) 第二容器,其含有第二CD8产物;和3) 第三容器,其含有第三CD8产物。

[0179] 制成品可包括:1) 第一容器,其含有CD8产物;2) 第二容器,其含有第二CD8产物;3) 第三容器,其含有第三CD8产物;和4) 任选地,第四容器,其含有第四CD8产物。

[0180] 制成品可包括:1) 第一容器,其含有CD8产物;2) 第二容器,其含有第二CD8产物;3) 第三容器,其含有第三CD8产物;4) 第四容器,其含有第四CD8产物;和5) 任选地第五容器,其含有第四CD8产物。

[0181] 制成品可包括容器,其中含有一种CD8产物。制成品可包括容器,其中含有两种CD8产物。制成品可包括容器,其中含有三种CD8产物。制成品可包括容器,其中含有四种CD8产物。制成品可包括容器,其中含有五种CD8产物。

[0182] 制成品可包括1) 第一容器,其中含有一种CD8产物,和2) 第二容器,其中含有两种CD8产物。制成品可包括1) 第一容器,其中含有两种CD8产物,和2) 第二容器,其中含有一种CD8产物。在以上实例中,包含一种或多种额外CD8产物的第三和/或第四容器可包括在制成品中。另外,包含一种或多种额外的CD8产物的第五容器可包括在制成品中。

[0183] 此外,本文所述的任何CD8产物容器可以分成两个、三个或四个单独的容器用于多个给药时间点和/或基于患者的适当剂量。

[0184] 在某些实施方案中,CD8产物以试剂盒提供。通过非限制性实例,该试剂盒可以包含包装插页、标签、使用CD8产物的说明、注射器、处置说明、给药说明、管、针头以及临床医生需要的任何其他物品以便正确施用CD8产物。

[0185] 治疗组合物和制造方法

[0186] 如本文所述,开发了用于CD8产物的好生产规范(GMP)的质粒DNA介导的精确基

基因组改造方法。通过电穿孔CRISPR内切核酸酶核糖核蛋白 (RNP) 以及由质粒DNA编码的个性化neoTCR基因盒, 实现患者特异性neoTCR的靶向整合。除了neoTCR之外, CD8构建体通过将它们整合到neoTCR载体中然后如上所述用CRISPR内切核酸酶核糖核蛋白 (RNP) 电穿孔来插入。

[0187] CD8产物可以使用临床制造方法配制成药物产品。在此过程中, CD8产物被冷冻保存在CryoMACS冷冻袋中。根据患者的需要, 可为每位患者运送一个或多个袋子到地点。该产物由单采衍生的患者自体CD8和CD4 T细胞组成, 这些细胞经过精确基因组改造以表达一种或多种自体neoTCR, 其靶向与一种内源性HLA受体复合的新表位, 该受体仅存在于患者肿瘤细胞的表面。

[0188] 最终产品将包含5%二甲基亚砜 (DMSO)、人血清白蛋白和Plasma-Lyte。最终的细胞产品将包含表2中提供的组分的列表。

[0189] 表2 CD8产物的组成

	组分	规格/等级
[0190]	总的有核的 NeoTCR 细胞	cGMP生产的
	Plasma-Lyte A	USP
	0.02 - 0.08 M 辛酸钠和色氨酸钠中的人血	USP
[0191]	清白蛋白	
	CryoStor CS10	使用 USP 级材料生产的 cGMP

[0192] 组合物和载体

[0193] 当前公开的主题提供包含本文公开的细胞 (例如, 免疫反应性细胞) 的组合物。

[0194] 在某些实施方案中, 当前公开的主题提供包含编码本文公开的NeoTCR的多核苷酸的核酸组合物。在某些实施方案中, 本文公开的核酸组合物包含编码本文公开的CD8构建体的多核苷酸。还提供了包含此类核酸组合物的细胞。

[0195] 在某些实施方案中, 核酸组合物进一步包含可操作地连接至本文公开的NeoTCR的启动子。在某些实施方案中, 核酸组合物进一步包含与本文公开的CD8构建体可操作地连接的启动子。

[0196] 在某些实施方案中, 启动子是内源性的或外源性的。在某些实施方案中, 外源性启动子选自自由延长因子 (EF) -1启动子、CMV启动子、SV40启动子、PGK启动子、长末端重复 (LTR) 启动子和金属硫蛋白启动子组成的组。在某些实施方案中, 启动子是诱导型启动子。在某些实施方案中, 诱导型启动子选自自由NFAT转录反应元件 (TRE) 启动子、CD69启动子、CD25启动子、IL-2启动子、IL-12启动子、p40启动子和Bcl-xL启动子组成的组。

[0197] 组合物和核酸组合物可以通过本领域已知的方法或如本文所述的方法施用于受试者或和/或递送到细胞中。细胞 (例如, T细胞) 的遗传修饰可以通过用重组DNA构建体转导基本均一的细胞组合物来实现。在某些实施方案中, 采用逆转录病毒载体 (γ 逆转录病毒载体或慢病毒载体) 将DNA构建体引入细胞。也可以使用非病毒载体。

[0198] 可能的转导方法还包括细胞与生产细胞的直接共培养, 例如通过Bregni, et al. (1992) Blood 80:1418-1422的方法, 或用单独的病毒上清液或含有或不含有适当生长因子和聚阳离子的浓缩载体原液进行培养, 例如通过Xu, et al. (1994) Exp.Hemat.22:223-230; 和Hughes, et al. (1992) J.Clin.Invest.89:1817的方法。

[0199] 其他转导病毒载体可用于修饰细胞。在某些实施方案中,所选载体表现出高感染效率和稳定的整合和表达(参见,例如Cayouette et al.,*Human Gene Therapy* 8:423-430,1997;Kido et al.,*Current Eye Research* 15:833-844,1996;Bloomer et al.,*Journal of Virology* 71:6641-6649,1997;Naldini et al.,*Science* 272:263-267,1996;和Miyoshi et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*94:10319,1997)。可以使用的其他病毒载体包括,例如,腺病毒、慢病毒和腺伴随病毒载体、牛痘病毒、牛乳头瘤病毒或疱疹病毒,例如EB病毒(也参见,例如Miller,*Human Gene Therapy* 15-14,1990;Friedman,*Science*244:1275-1281,1989;Eglitis et al.,*BioTechniques* 6:608-614,1988;Tolstoshev et al.,*Current Opinion in Biotechnology* 1:55-61,1990;Sharp,*The Lancet* 337:1277-1278,1991;Cornetta et al.,*Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 36:311-322,1987;Anderson,*Science* 226:401-409,1984;Moen,*Blood Cells* 17:407-416,1991;Miller et al.,*Biotechnology* 7:980-990,1989;LeGal La Salle et al.,*Science* 259:988-990,1993;和Johnson,*Chest*107:77S-83S,1995)。逆转录病毒载体开发得特别好,并已用于临床环境(Rosenberg et al.,*N.Engl.J.Med* 323:370,1990;Anderson et al.,*U.S.Pat.No.5,399,346*)。

[0200] 非病毒方法也可用于细胞的遗传修饰。例如,可以通过在脂质转染的存在下给予核酸(Feigner et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:7413,1987;Ono et al.,*Neuroscience Letters* 17:259,1990;Brigham et al.,*Am.J.Med.Sci.*298:278,1989;Staubinger et al.,*Methods in Enzymology* 101:512,1983),无唾液酸血清类粘蛋白-聚赖氨酸缀合(Wu et al.,*Journal of Biological Chemistry* 263:14621,1988;Wu et al.,*Journal of Biological Chemistry*264:16985,1989),或通过手术条件下的显微注射(Wolff et al.,*Science*247:1465,1990)来将核酸分子引入细胞中。用于基因转移的其他非病毒方法包括使用磷酸钙、DEAE葡聚糖、电穿孔和原生质体融合进行体外转染。脂质体也可能有利于将DNA递送到细胞中。将正常基因移植到受试者的受影响组织中也可以通过将正常核酸转移到离体可培养的细胞类型(例如,自体或异源原代细胞或其后代)中来实现,然后将该细胞(或其后代)注射到靶组织或全身注射。

[0201] 多核苷酸治疗方法可以直接从任何合适的启动子(例如,人巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)或金属硫蛋白启动子)开始,并由任何合适的哺乳动物调控元件或内含子(例如延长因子1a增强子/启动子/内含子结构)调控。例如,如果需要,可以使用已知优选指导特定细胞类型中的基因表达的增强子来指导核酸的表达。所使用的增强子包括但不限于那些以组织或细胞特异性增强子为特征的增强子。或者,如果基因组克隆用作治疗构建体,则可以通过同族调控序列或,如果需要,通过源自异源来源的调控序列介导调控,包括上述任何启动子或调控元件。

[0202] 所得细胞可以在与未修饰细胞相似条件下生长,从而可以扩增修饰的细胞并用于各种目的。

[0203] 试剂盒

[0204] 当前公开的主题提供了用于在受试者中诱导和/或增强免疫应答和/或治疗和/或预防癌症或病原体感染的试剂盒。在某些实施方案中,试剂盒包含有效量的当前公开的细胞或包含其的药物组合物。在某些实施方案中,试剂盒包括无菌容器;这种容器可以是盒

子、安瓿、瓶子、小瓶、管、袋、小袋、泡罩包装或本领域已知的其他合适的容器形式。这种容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或其他适合盛放药物的材料制成。在某些非限制性实施方案中,试剂盒包括编码当前公开的HR模板的分离的核酸分子。

[0205] 如果需要,将细胞和/或核酸分子与用于将细胞或核酸分子施用于患有或有患癌症或病原体或免疫病症的风险的受试者的说明书一起提供。说明书通常包括关于使用组合物治疗和/或预防癌症或病原体感染的信息。在某些实施方案中,说明书包括以下内容中的至少一项:治疗剂的描述;用于治疗或预防瘤形成、病原体感染或免疫紊乱或其症状的剂量方案和给药;预防措施;警告;适应症;禁忌症;过量信息;不良反应;动物药理学;临床研究;和/或参考。说明可以直接印在容器上(如果有),或者作为应用于容器上的标签,或者作为单独的纸张、小册子、卡片或文件夹提供在容器中或随容器一起提供。所得细胞可以在与未修饰细胞相似的生长条件下生长,从而可以扩增修饰的细胞并用于各种目的。

[0206] 示例性实施方案

[0207] A. 在某些非限制性实施方案中,当前公开的主题提供了细胞,其包含外源性T细胞受体(TCR)和外源性CD8。

[0208] A1. 前述A,其中所述外源性CD8包含至少一个单体。

[0209] A2. 前述A1的细胞,其中所述外源性CD8的至少一个单体包含细胞外结构域、跨膜结构域、细胞内结构域、其片段或其组合。

[0210] A3. 前述A2的细胞,其中所述细胞外结构域包含CD8 α 细胞外结构域或CD8 β 细胞外结构域。

[0211] A4. 前述A2或A3的细胞,其中所述跨膜结构域是CD8 α 跨膜结构域或CD8 β 跨膜结构域。

[0212] A5. 前述A2-A4的细胞,其中所述细胞内结构域包含CD8 α 细胞内结构域或CD8 β 细胞内结构域。

[0213] A6. 前述A2-A4的细胞,其中所述细胞内结构域包含CD4细胞内结构域。

[0214] A7. 前述A1-A5的细胞,其中所述至少一个单体包含CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域。

[0215] A8. 前述A1-A5的细胞,其中所述至少一个单体包含CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域。

[0216] A9. 前述A1-A5的细胞,其中所述至少一个单体包含CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域。

[0217] A10. 前述A1-A6的细胞,其中所述至少一个单体包含CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。

[0218] A11. 前述A1-A10的细胞,其中所述至少一个单体包含信号肽。

[0219] A12. 前述A11的细胞,其中所述信号肽是CD8信号肽。

[0220] A13. 前述A2-A12的细胞,其中所述细胞外结构域包含在SEQ ID NO:140或SEQ ID NO:145中列出的氨基酸序列。

[0221] A14. 前述A2-A13的细胞,其中所述跨膜结构域包含在SEQ ID NO:141或SEQ ID NO:146中列出的氨基酸序列。

[0222] A15. 前述A2-A14的细胞,其中所述细胞内结构域包含在SEQ ID NO:142、SEQ ID

NO:147或SEQ ID NO:148中列出的氨基酸序列。

[0223] A16. 前述A11-A15的细胞,其中所述信号肽包含在SEQ ID NO:139或SEQ ID NO:144中列出的氨基酸序列。

[0224] A17. 前述A-A16的细胞,其中所述外源性CD8包含2A序列。

[0225] A18. 前述A-A17的细胞,其中所述外源性CD8包含接头。

[0226] A19. 前述A18的细胞,其中所述接头包含在SEQ ID NO:137中列出的氨基酸序列。

[0227] A20. 前述A-A19的细胞,其中所述外源性CD8包含蛋白酶切割位点。

[0228] A21. 前述A-A20的细胞,其中所述蛋白酶切割位点是弗林蛋白酶切割位点。

[0229] A22. 前述A-A21的细胞,其中所述外源性TCR是患者来源的TCR。

[0230] A23. 前述A-A22的细胞,其中所述外源性TCR包含信号序列、第一和第二2A序列以及TCR多肽序列。

[0231] A24. 前述A-A23的细胞,其中所述外源性TCR识别癌抗原。

[0232] A25. 前述A24的细胞,其中所述癌抗原是新抗原。

[0233] A26. 前述A24的细胞,其中所述癌抗原是患者特异性抗原。

[0234] A27. 前述A-A26的细胞,其中所述细胞为原代细胞。

[0235] A28. 前述A-A26的细胞,其中所述细胞是患者来源的细胞。

[0236] A29. 前述A-A26的细胞,其中所述细胞是淋巴细胞。

[0237] A30. 前述A-A26的细胞,其中所述细胞为T细胞。

[0238] A31. 前述A-A26的细胞,其中所述细胞是年轻的T细胞。

[0239] A32. 前述A31的细胞,其中所述细胞是CD45RA⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁻、CCR7⁺和CD27⁺。

[0240] A33. 前述A31的细胞,其中所述细胞是CD45RA⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁺、CD27⁺、CCR7⁺。

[0241] A34. 前述A31的细胞,其中所述细胞是CD45RO⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺。

[0242] A35. 前述A-A34的细胞,进一步包含基因修饰以增强细胞持久性和/或增强记忆细胞分化。

[0243] A36. 前述A-A35的细胞,其中与不具有外源性CD8的细胞的杀伤活性相比,细胞的杀伤活性增加了约10%至约500%。

[0244] A37. 前述A-A36的细胞,其中与不具有外源性CD8的细胞的增殖相比,在TCR与抗原结合后细胞的增殖增加了约10%至约500%。

[0245] A38. 前述A-A37的细胞,其中与不具有外源性CD8的细胞的分泌相比,当TCR与抗原结合时,细胞的促炎性细胞因子的分泌增加约10%至约500%。

[0246] A39. 前述A-A38的细胞,其中与不具有外源性CD8的细胞的LCK亲和力相比,细胞的LCK亲和力增加了约10%至约500%。

[0247] A40. 前述A-A39的细胞,其中与不具有外源性CD8的细胞的持久性相比,细胞的持久性增加了约10%至约500%。

[0248] A41. 前述A-A40的细胞,其中与不具有外源性CD8的细胞的肿瘤浸润能力相比,细胞的肿瘤浸润能力增加了约10%至约500%。

- [0249] A42. 前述A-A41的细胞,其中所述外源性TCR是CD8依赖性TCR。
- [0250] A43. 前述A-A41的细胞,其中所述外源性TCR是不依赖CD8的TCR。
- [0251] A44. 前述A-A43的细胞,其中所述外源性CD8由CD8构建体1、CD8构建体2、CD8构建体3或CD8构建体4编码。
- [0252] A45. 前述A-A43的细胞,其中所述外源性CD8包括:CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;或CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。
- [0253] A46. 前述A-A43的细胞,其中所述外源性CD8包括:CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)、CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142)、CD8 β 信号肽(SEQ ID NO:144)、CD8 β 细胞外结构域(SEQ ID NO:145)、CD8 β 跨膜结构域(SEQ ID NO:146)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);或CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD4细胞内结构域(SEQ ID NO:148)。
- [0254] B. 在某些非限制性实施方案中,当前公开的主题提供了修饰细胞的方法,所述方法包括将同源重组(HR)模板核酸序列引入细胞中,其中所述HR模板包含与第一和第二靶核酸序列同源的第一和第二同源臂、位于第一和第二同源臂之间的TCR基因序列、位于第一和第二同源臂之间的CD8基因序列,以及将所述HR模板核酸重组到细胞的内源基因座中。
- [0255] B1. 前述B的方法,其中所述HR模板包含位于CD8基因序列上游的第一2A编码序列、位于CD8基因序列下游和TCR基因序列上游的第二2A编码序列和位于TCR基因序列下游的第三2A编码序列;其中第一、第二和第三2A编码序列编码相同的氨基酸序列并且相对于彼此密码子趋异。
- [0256] B2. 前述B或B1的方法,其中所述HR模板包含编码紧邻第一、第二和/或第三2A编码序列上游的氨基酸序列Gly Ser Gly的序列。
- [0257] B3. 前述B1或B2的方法,其中所述HR模板还包含编码位于第一、第二和/或第三2A编码序列上游的弗林蛋白酶切割位点的序列。
- [0258] B4. 前述B-B3的方法,其中所述HR模板进一步包含编码位于紧邻TCR基因序列和/或CD8基因序列上游的信号序列的序列。
- [0259] B5. 前述B-B4的方法,其中所述HR模板包含位于第三2A编码序列和第二同源臂之间的第二TCR序列。
- [0260] B6. 前述B5的方法,其中所述HR模板包含编码位于紧邻第一TCR基因序列上游的第一信号序列的序列;和编码位于紧邻第二TCR基因序列上游的第二信号序列的序列。
- [0261] B7. 前述B-B6的方法,其中所述HR模板包含位于第一CD8基因序列和第二2A编码序列之间的第二CD8基因序列。
- [0262] B8. 前述B7的方法,其中2A编码序列位于第一和第二CD8基因序列之间。
- [0263] B9. 前述B7或B8的方法,其中编码氨基酸序列Gly Ser Gly的序列位于第一和第二

CD8基因序列之间。

[0264] B10. 前述B7-B9的方法,其中编码弗林蛋白酶切割位点的序列位于第一和第二CD8基因序列之间。

[0265] B11. 前述B-B10的方法,其中所述CD8基因序列包含编码细胞外结构域的序列、编码细胞内结构域的序列、编码细胞内结构域的序列、其片段或其组合。

[0266] B12. 前述B11的方法,其中编码细胞外结构域的序列包含编码CD8 α 细胞外结构域或CD8 β 细胞外结构域的序列。

[0267] B13. 前述B11或B12的方法,其中编码跨膜结构域的序列包括编码CD8 α 跨膜结构域或CD8 β 跨膜结构域的序列。

[0268] B14. 前述B11-B13的方法,其中编码细胞内结构域的序列包含编码CD8 α 细胞内结构域或CD8 β 细胞内结构域的序列。

[0269] B15. 前述B11-B14的方法,其中编码细胞内结构域的序列包含编码CD4细胞内结构域的序列。

[0270] B16. 前述B11-B15的方法,其中CD8基因序列包含编码CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域的序列。

[0271] B17. 前述B11-B15的方法,其中CD8基因序列包含编码CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域的序列。

[0272] B18. 前述B11-B15的方法,其中CD8基因序列包含编码CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域的序列。

[0273] B19. 前述B11-B15的方法,其中CD8基因序列包含编码CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域的序列。

[0274] B20. 前述B7-B19的方法,其中HR模板包含编码位于紧邻第一CD8基因序列上游的第一信号序列的序列和编码位于紧邻第二CD8基因序列上游的第二信号序列的序列。

[0275] B21. 前述B4-B20的方法,其中所述信号序列是CD8信号序列、人生长激素信号序列、其片段或其组合。

[0276] B22. 前述B-B21的方法,其中所述HR模板的第一和第二同源臂各自的长度为约300个碱基至约2,000个碱基。

[0277] B23. 前述B-B22的方法,其中所述HR模板的第一和第二同源臂各自的长度为约600个碱基至约2,000个碱基。

[0278] B24. 前述B-B23的方法,其中所述外源性TCR是患者来源的TCR。

[0279] B25. 前述B-B24的方法,其中所述外源性TCR包含信号序列、第一和第二2A序列以及TCR多肽序列。

[0280] B26. 前述B-B25的方法,其中所述外源性TCR识别癌抗原。

[0281] B27. 前述B26的方法,其中所述癌抗原是新抗原。

[0282] B28. 前述B26的方法,其中所述癌抗原是患者特异性抗原。

[0283] B29. 前述B-B28的方法,其中HR模板是非病毒性的。

[0284] B30. 前述B-B29的方法,其中所述HR模板为环状DNA。

[0285] B31. 前述B-B29的方法,其中所述HR模板为线性DNA。

[0286] B32. 前述B-B31的方法,其中引入通过电穿孔进行。

- [0287] B33. 前述B-B32的方法,其中重组包括通过核酸酶切割内源基因座;以及通过同源定向修复将HR模板核酸序列重组到内源基因座中。
- [0288] B34. 前述B33的方法,其中核酸酶是成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)家族核酸酶或其衍生物。
- [0289] B35. 前述B34的方法,还包括gRNA。
- [0290] B36. 前述B-B35的方法,其中所述方法还包括培养细胞。
- [0291] B37. 前述B36的方法,其中培养在至少一种细胞因子存在下进行。
- [0292] B38. 前述B36或B37的方法,其中培养在IL2、IL7、IL15或其任何组合的存在下进行。
- [0293] B39. 前述B36或B37的方法,其中培养在IL2和IL15的存在下进行。
- [0294] B40. 前述B-B39的方法,进一步包含基因修饰以增强细胞持久性和/或增强记忆细胞分化。
- [0295] B41. 前述B-B40的方法,其中所述细胞为原代细胞。
- [0296] B42. 前述B-B40的方法,其中所述细胞是患者来源的细胞。
- [0297] B43. 前述B-B40的方法,其中所述细胞是淋巴细胞。
- [0298] B44. 前述B-B40的方法,其中所述细胞为T细胞。
- [0299] B45. 前述B-B40的方法,其中所述细胞为年轻T细胞。
- [0300] B46. 前述B45的方法,其中所述细胞是CD45RA⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁻、CCR7⁺和CD27⁺。
- [0301] B47. 前述B45的方法,其中所述细胞是CD45RA⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁺、CD27⁺、CCR7⁺。
- [0302] B48. 前述B45的方法,其中所述细胞是CD45RO⁺、CD62L⁺、CD28⁺、CD95⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺。
- [0303] B49. 前述B-B48的方法,其中与不具有CD8基因序列的细胞的杀伤活性相比,细胞的杀伤活性增加了约10%至约500%。
- [0304] B50. 前述B-B49的方法,其中与不具有CD8基因序列的细胞的增殖相比,在TCR与抗原结合后细胞的增殖增加了约10%至约500%。
- [0305] B51. 前述B-B50的方法,其中与不具有CD8基因序列的细胞的分泌相比,当TCR与抗原结合时,细胞的促炎性细胞因子的分泌增加约10%至约500%。
- [0306] B52. 前述B-B51的方法,其中与不具有CD8基因序列的细胞的LCK亲和力相比,细胞的LCK亲和力增加了约10%至约500%。
- [0307] B53. 前述B-B52的方法,其中与不具有CD8基因序列的细胞的持久性相比,细胞的持久性增加了约10%至约500%。
- [0308] B54. 前述B-B53的方法,其中与不具有CD8基因序列的细胞的肿瘤浸润能力相比,细胞的肿瘤浸润能力增加了约10%至约500%。
- [0309] B55. 前述B-B54的方法,其中所述TCR基因编码CD8依赖性TCR。
- [0310] B56. 前述B-B54的方法,其中所述TCR基因编码不依赖CD8的TCR。
- [0311] B57. 前述B-B56的方法,其中所述CD8基因序列由CD8构建体1、CD8构建体2、CD8构建体3或CD8构建体4编码。

[0312] B58. 前述B-B56的方法,其中所述CD8基因序列包含:CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;或CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD4细胞内结构域。

[0313] B59. 前述B-B56的方法,其中所述CD8基因序列包括:CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)、CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142)、CD8 β 信号肽(SEQ ID NO:144)、CD8 β 细胞外结构域(SEQ ID NO:145)、CD8 β 跨膜结构域(SEQ ID NO:146)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);或CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD4细胞内结构域(SEQ ID NO:148)。

[0314] C. 在某些非限制性实施方案中,当前公开的主题提供了通过B-B57的方法修饰的细胞。

[0315] D. 在某些非限制性实施方案中,当前公开的主题提供包含有效量的A-A46的细胞或C的细胞的组合物。

[0316] D1. 前述D的组合物,其中所述组合物是进一步包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0317] D2. 前述D或D1的组合物,其中将所述组合物施用于有需要的患者以治疗癌症。

[0318] D3. 前述D-D2的组合物,其中所述组合物包含冷冻保存剂。

[0319] D4. 前述D-D3的组合物,其中所述组合物包含血清白蛋白。

[0320] D5. 前述D-D4的组合物,其中所述组合物包含Plasma-Lyte A、HSA和CryoStor CS10。

[0321] E. 在某些非限制性实施方案中,当前公开的主题提供了在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的A-A46的细胞、权利要求C的细胞,或D-D5的组合物。

[0322] E1. 前述E的方法,其中在施用治疗有效量的细胞之前,向受试者施用非清髓性淋巴去除方案。

[0323] E2. 前述E或E1的方法,其中所述癌症是实体瘤。

[0324] E3. 前述E或E1的方法,其中所述癌症为液体瘤。

[0325] E4. 前述E2的方法,其中所述实体瘤选自黑色素瘤、肺癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、头颈癌、前列腺癌、妇科癌、中枢神经系统癌、皮肤癌、HPV+癌、食道癌、甲状腺癌、胃癌、肝细胞癌、胆管癌、肾细胞癌、睾丸癌、肉瘤和结直肠癌组成的组。

[0326] E5. 前述E3的方法,其中所述液体瘤选自滤泡性淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤组成的组。

[0327] F. 在某些非限制性实施方案中,当前公开的主题提供包含A-A46的细胞、用于执行B-B57的方法的试剂、C的细胞或D-D5的组合物的试剂盒。

[0328] F1. 前述F的试剂盒,其中所述试剂盒还包括用于治疗癌症的书面说明。

[0329] G. 在某些非限制性实施方案中,当前公开的主题提供了细胞,其包含:外源性T细胞受体(TCR);和外源性CD8,所述外源性CD8包括:CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;或CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。

[0330] H. 在某些非限制性实施方案中,当前公开的主题提供了细胞,其包含:外源T细胞受体(TCR);和外源性CD8,所述外源性CD8包括:CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)、CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142)、CD8 β 信号肽(SEQ ID NO:144)、CD8 β 细胞外结构域(SEQ ID NO:145)、CD8 β 跨膜结构域(SEQ ID NO:146)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);或CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD4细胞内结构域(SEQ ID NO:148)。

[0331] I. 在某些非限制性实施方案中,当前公开的主题提供了修饰细胞的方法,所述方法包括:将同源重组(HR)模板核酸序列引入细胞中,其中HR模板包含:与第一和第二靶核酸序列同源的第一和第二同源臂;位于第一和第二同源臂之间的TCR基因序列;位于第一和第二同源臂之间的CD8基因序列;将HR模板核酸重组到细胞的内源基因座中,其中CD8基因序列包括:CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 β 细胞内结构域;或CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。

[0332] J. 在某些非限制性实施方案中,当前公开的主题提供了修饰细胞的方法,所述方法包括:将同源重组(HR)模板核酸序列引入细胞中,其中HR模板包含:与第一和第二靶核酸序列同源的第一和第二同源臂;位于第一和第二同源臂之间的TCR基因序列;位于第一和第二同源臂之间的CD8基因序列;将HR模板核酸重组到细胞的内源基因座中,其中CD8基因序列包括:CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)、CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142)、CD8 β 信号肽(SEQ ID NO:144)、CD8 β 细胞外结构域(SEQ ID NO:145)、CD8 β 跨膜结构域(SEQ ID NO:146)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);或CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD4细胞内结构域(SEQ ID NO:148)。

[0333] K. 在某些非限制性实施方案中,当公开的主题提供包含细胞的组合物,其中所述细胞包含外源T细胞受体(TCR)和外源性CD8,其中外源性CD8包含:CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨

膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;或CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。

[0334] L.在某些非限制性实施方案中,当前公开的主题提供包含细胞的组合物,其中所述细胞包含外源T细胞受体(TCR)和外源性CD8,其中外源性CD8包含:CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)、CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142)、CD8 β 信号肽(SEQ ID NO:144)、CD8 β 细胞外结构域(SEQ ID NO:145)、CD8 β 跨膜结构域(SEQ ID NO:146)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);或CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD4细胞内结构域(SEQ ID NO:148)。

[0335] M.在某些非限制性实施方案中,当前公开的主题提供了在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的细胞,其中所述细胞包含外源性T细胞受体(TCR)和外源性CD8,其中所述外源性CD8包含:CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD8 α 细胞内结构域、CD8 β 细胞外结构域、CD8 β 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD8 β 细胞内结构域;或CD8 α 细胞外结构域、CD8 α 跨膜结构域和CD4细胞内结构域。

[0336] N.在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的细胞,其中所述细胞包含外源T细胞受体(TCR)和外源性CD8,其中外源性CD8包含:CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)、CD8 α 细胞内结构域(SEQ ID NO:142)、CD8 β 信号肽(SEQ ID NO:144)、CD8 β 细胞外结构域(SEQ ID NO:145)、CD8 β 跨膜结构域(SEQ ID NO:146)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD8 β 细胞内结构域(SEQ ID NO:147);或CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:139)、CD8 α 细胞外结构域(SEQ ID NO:140)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:141)和CD4细胞内结构域(SEQ ID NO:148)。

实施例

[0337] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。应当理解,鉴于上面提供的一般描述,可以实施各种其他实施方案。

[0338] 实施例1产生NeoTCR产物

[0339] 通过PCT/US2020/17887(其全文通过引用纳入本文)中描述的imPACT分离技术鉴定的新表位特异性TCR用于产生同源重组(HR)DNA模板。这些HR模板与位点特异性核酸酶串联一起转染到原代人类T细胞中(见图1A-1C)。单步非病毒性精确基因组改造导致内源性TCR无缝替换为患者的新表位特异性TCR,由内源性启动子表达。表面表达的TCR在序列上完全是天然的。

[0340] neoTCR-T细胞基因组改造的精确度通过靶向基因座扩增(TLA)获得脱靶整合热点

或易位,并通过基于下一代测序的脱靶切割测定进行评估,并发现缺乏意外结果的证据。

[0341] 如图1A-1C所示,包含目标基因的构建体被插入到内源基因座中。这是通过使用同源修复模板来完成的,该模板包含侧翼为左右HR臂的目标基因的编码序列。除了HR臂之外,目标基因还夹在2A肽、蛋白酶切割位点,其在2A肽上游以从上游翻译的目标基因中去除2A肽,和信号序列之间(图1B)。一旦整合到基因组中,目标表达基因盒的基因就被转录为单信使RNA。在该目标基因在信使RNA中的翻译过程中,侧翼区域通过自切割2A肽与目标基因断开连接,蛋白酶切割位点被切割以去除目标翻译基因上游的2A肽(图1C)。除了2A肽和蛋白酶切割位点之外,还在每个2A肽之前插入了甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸(GSG)接头,以进一步增强目标基因与表达盒中其他元件的分离。

[0342] 已确定P2A肽在细胞产品方面优于其他2A肽,因为它具有高效的切割能力。因此,使用两(2)个P2A肽和密码子散度(codon divergence)来表达目标基因,而不从P2A肽的目标基因的任一端的剩余氨基酸引入任何外源表位。基因编辑的细胞没有外源性表位(即在目标基因的两侧没有侧翼的P2A肽氨基酸)的好处是免疫原性显著降低,患者输注含有该基因编辑细胞的细胞产品对该基因编辑细胞产生免疫反应的可能性较小。

[0343] 如PCT/US/2018/058230所述,NeoTCR被整合到T细胞的TCR α 基因座中。具体而言,使用了同源修复模板,该模板包含侧翼为左右HR臂的NeoTCR编码序列。此外,内源性TCR β 基因座被破坏,导致仅由NeoTCR构建体编码的TCR序列的表达。使用环状HR模板以及线性模板应用一般策略。

[0344] 靶TCR α 基因座(α)与质粒HR模板以及由此产生的编辑序列和下游mRNA/蛋白质产物一起显示在图1B和1C中。示出了靶TCR α 基因座(内源性TRAC)及其CRISPR Cas9靶位点(水平条纹,箭头指出的切割位点)(图1A-1C)。具有编码NeoTCR的多核苷酸的环状质粒HR模板位于左右同源臂之间(分别为“LHA”和“RHA”)。示出了密码子优化的HR模板引入的TRAC区域(垂直条纹)。TCR β 恒定结构域源自TRBC2,其表明在功能上与TRBC1等同。NeoTCR盒中的其他元件包括:2A=2A核糖体跳跃元件(作为非限制性实施例,盒中使用的2A肽都是P2A序列,它们与密码子散度结合使用以消除翻译产物中任何否则会出现的非内源性表位);P=2A上游的蛋白酶切割位点,其从上游TCR β 蛋白去除2A标签(作为非限制性实施例,蛋白酶切割位点可以是弗林蛋白酶切割位点);SS=信号序列(作为非限制性实施例,蛋白酶切割位点可以是人生长激素信号序列)。NeoTCR表达基因盒的HR模板包括两个侧翼同源臂,用于直接插入CRISPR Cas9核酸酶RNP与TCR α 指导RNA靶向的TCR α 基因组基因座。这些同源臂(LHA和RHA)位于NeoTCR表达基因盒的neoE特异性TCR序列的侧翼。虽然本实施例中使用的蛋白酶切割位点是弗林蛋白酶切割位点,但可以使用本领域技术人员已知的任何合适的蛋白酶切割位点。类似地,虽然HGH是为该实施例选择的信号序列,但可以基于所需的运输选择和使用本领域技术人员已知的任何信号序列。

[0345] 一旦整合到基因组中(图1C),NeoTCR表达基因盒就被转录从来自内源性TCR α 启动子开始的单个信使RNA,其仍包括来自该个体T细胞的内源性TCR α 多肽的一部分(图1C)。在此单个NeoTCR信使RNA的核糖体多肽翻译过程中,NeoTCR序列通过P2A肽处的自切割与内源性、CRISPR破坏的TCR α 多肽断开连接(图1C)。编码的NeoTCR α 和NeoTCR β 多肽也通过内源性细胞人弗林蛋白酶和NeoTCR表达基因盒中包含的第二自切割P2A序列基序的切割而彼此断开连接(图1C)。NeoTCR α 和NeoTCR β 多肽分别被信号前导序列(源自人类生长激素,HGH)靶向

内质网,用于多聚体组装并将NeoTCR蛋白复合体运输到T细胞表面。包含弗林蛋白酶裂解位点有助于从上游TCR β 链中去除2A序列,以减少对TCR β 功能的潜在干扰。在每个2A(未示出)之前包含gly-ser-gly接头进一步增强了三种多肽的分离。

[0346] 此外,三个重复的蛋白质序列在HR模板内进行密码子趋异以促进基因组稳定性。TCR基因盒内的两个P2A相对于彼此密码子趋异以及两个HGH信号序列相对于彼此密码子趋异,以促进引入的NeoTCR盒序列在离体工程化T细胞基因组内的稳定性。类似地,重新引入的TRAC外显子1(垂直条纹)的5'末端通过去除两个直接重复的间插序列,降低了整个盒随时间丢失的可能性。

[0347] 除NeoTCR产物外,此方法可用于任何CD8产物。

[0348] In-Out PCR用于确认NeoE TCR盒的精确靶整合。琼脂糖凝胶显示使用特异于整合盒的引物和仅使用核酸酶和DNA模板(KOKI和KOKIKO)处理的细胞的预期大小的位点产生产物进行PCR的结果,证明位点特异性和精确整合。

[0349] 此外,靶向基因座扩增(TLA)用于确认靶向整合的特异性。交联、连接和使用NeoTCR插入序列特异的引物来获得整合位点周围的序列。映射到基因组的读数以10kb的间隔进行分箱(binned)。仅在预期位点(即14号染色体上的整合位点)周围获得了显著的读取深度,没有常见的脱靶插入位点的证据。

[0350] 内源性TCR的抗体染色和neoTCR的肽-HLA染色表明,该改造导致NeoTCR的高频敲入,剩余一些TCR-细胞和少量WT T细胞。在没有外源启动子的情况下,neoTCR表达证明了敲入。使用相同的neoTCR多次进行改造,结果相似。因此,在工程化T细胞中实现了NeoTCR的高效和一致的表达以及内源性TCR的敲除。

[0351] 实施例2产生CD8产物1

[0352] T细胞分离和编辑。根据制造商的说明书,使用Miltenyi Prodigy或Miltenyi MACS分离柱从健康供体PBMC中分离CD4和CD8 T细胞。使用新鲜的或在1%人血清白蛋白(Gemini)、49%plasmalyte(Baxter)和50%CS10(Sigma)中冷冻保存的阳性选择的CD4和CD8 T细胞(使用Miltenyi抗体和分离柱)。将冷冻保存的细胞解冻,在TexMACS(Miltenyi)+10%人AB血清(Valley Biomedical)中洗涤,并以每毫升 2×10^6 个细胞的密度接种在TexMACS+3%人AB血清(培养基)中。解冻一天后,或立即新鲜使用,洗涤细胞并以每毫升 1.46×10^6 个细胞的密度重新接种在培养基+12.5ng/mL IL7+12.5ng/mL IL15+1:17.5按体积计的TransACT T细胞活化试剂(所有试剂均来自Miltenyi)中。活化两天后,用i)用于生产NeoTCR产物的质粒(参见,例如,图1B)或ii)CD8构建体1(例如,由侧翼为neoTCR β 和 α 序列的上游的P2A位点和靶向TCR α 和 β 位点的gRNA-Cas9 RNP的CD8 α 编码序列组成;参见,例如,图2A)对T细胞进行电穿孔。CD8构建体1的示例性表达构建体示于图11A中。使用100 μ L比色皿中的Lonza X-unit和程序E0-115对T细胞进行电穿孔。T细胞在补充有12.5ng/mL IL7+12.5ng/mL IL15的培养基中扩增。补充的培养基每2-3天更换一次,直到激活后13天研究结束。

[0353] comPACT和comPACT-Dextramer制备。根据PCT/US2019/025415(通过引用全部纳入本文中)描述的方法制备新抗原特异性肽-HLA复合物多肽(各自为“comPACT”)。制备了用于标记表达neoTCR的T细胞的comPACT-dextramer复合物。生物素化的comPACT蛋白与链霉亲和素偶联的荧光团在室温(RT)下温育10分钟。将生物素-40-葡聚糖(NANOCs)添加到混合物

中并在室温下再温育10分钟。comPACT-Dextramer储存在4℃。

[0354] 确认comPACT与neoTCR编辑的T细胞结合。T细胞被染色用于流式细胞术。细胞首先在4℃下用存活力染料染色20分钟,然后在4℃下用comPACT-dextramer洗涤和染色10分钟。将表面抗体(抗CD8 α 、抗CD8 β 、抗CD4)添加到细胞和comPACT-dextramer的悬液中,并将细胞在4℃下再温育20分钟。然后将细胞洗涤并固定在细胞内固定缓冲液(BD Biosciences)中。所有细胞均在Attune NxT流式细胞仪(ThermoFisher Scientific)上采集,并使用FCS Express或FlowJo分析数据。

[0355] 细胞计数珠阵列(CBA)。链霉亲和素包被的板(Eagle Biosciences)用洗涤缓冲液(补充有1% BSA和0.05% tween20的PBS)洗涤3次,然后以100-0.01ng/孔的不同浓度用comPACT包被。没有comPACT的孔和包被有错配的comPACT的孔用作对照。将板在室温下温育2小时,用洗涤缓冲液洗涤3次,然后用补充有3%人AB血清的TexMACS洗涤3次以去除tween20。T细胞用补充有3%人AB血清的TexMACS洗涤两次,并以100万个细胞/mL重悬在补充有3%人AB血清和1 \times 青霉素-链霉素溶液的TexMACS中。T细胞以100 μ L/孔接种到comPACT包被的板上,并在37℃、5%CO₂下温育。24小时后收集上清液,并按照制造商的方案使用BD细胞计数珠阵列(CBA)人Th1/Th2细胞因子试剂盒II(目录号551809)分析细胞因子浓度。捕获珠与培养物上清液混合,与检测试剂在室温下避光温育3小时,洗涤,并重新悬浮在洗涤缓冲液中。在Attune NxT流式细胞仪上分析样品,并使用FlowJo分析数据。EC50代表引起最大响应的50%的同族comPACT的浓度,并利用在comPACT浓度范围内的IFN γ 分泌的最小二乘拟合来计算。

[0356] 细胞内染色。在指定的日期对T细胞进行染色用于流式细胞术。T细胞首先在4℃下用存活力染料染色20分钟,然后洗涤并与表面抗体(抗CD8 α 、抗CD8 β 、抗CD4)一起在4℃下再温育20分钟。然后洗涤T细胞并透化用于细胞内染色。T细胞在透化缓冲液中用抗2A肽或抗IFN γ 、抗TNF或抗IL2在4℃下染色20分钟。T细胞在细胞内固定缓冲液(BD Biosciences)中固定。在Attune NxT流式细胞仪(ThermoFisher Scientific)上分析样品,并使用FCS Express或FlowJo分析数据。

[0357] T细胞增殖测定。根据制造商的说明书,用e450增殖染料(eBioscience)标记编辑的CD4和CD8 T细胞。标记的细胞在comPACT包被的平板上以如上所述的浓度范围进行刺激。在48-96小时内收获T细胞,并通过稀释e450染料来分析增殖。

[0358] T细胞杀伤测定。HLA匹配的细胞系用同族新抗原肽或错配肽在37℃、5%CO₂下脉冲1小时。将细胞用培养基洗涤3次以去除任何未结合的肽,然后与用上述e450增殖染料标记的编辑的CD4和CD8 T细胞共培养。共培养物在收获前在37℃、5%CO₂下温育48小时。洗涤细胞并用可固定的存活力染料染色以确定杀伤效率。e450增殖染料用于区分编辑的T细胞和靶细胞。

[0359] CD8产物1的产生和验证。合成由CD8 α 的编码序列(CDS)组成的表达构建体,CD8 α 的侧翼是neoTCR β 和 α 序列上游的P2A位点。简而言之,合成人CD8 α 的CDS,其具有GSG接头和上游P2A位点侧翼是限制性位点。目标neoTCR表达载体和合成的CD8 α 构建体与限制性内切酶一起温育并连接在一起以产生最终的HDR构建体。CD8构建体1与靶向TCR α 和 β 基因座的gRNA-Cas9 RNP一起进行电穿孔。已知在CD8 T细胞而不是在CD4 T细胞(例如TCR097)中结合dextramer的模型neoTCR被用来证明CD8 α 转基因的表达使这些TCR能够在CD4 T细胞中结

合dextramer。

[0360] 为了测试CD4 T细胞表面CD8 α 基因转移和表达的效率,将工程化的CD4 T细胞用抗CD8 α 抗体染色,并通过如上所述的流式细胞术确认转基因的表面表达。已知仅在CD8 T细胞中结合dextramer的NeoTCR(例如,TCR 097)用于证明CD8转基因的表达使这些TCR能够在CD4 T细胞中结合dextramer。参见图13A、13B、14、15A和15B。此外,评估了野生型和基因工程CD8 α T细胞上的CD8 α 表达,以确定CD8 α 转基因的添加是否增加了CD8 T细胞上CD8 α 的表面水平。经改造以表达CD8 α 转基因的CD4 T细胞对CD4和CD8 α 呈双阳性。

[0361] CD8 T细胞也被改造为表达CD8 α 转基因,并如上所述进行表征。图15A和15B。还通过RT-qPCR量化了相对CD8 α 基因表达,并与对照非工程化的CD8 T细胞进行比较。表达CD8 α 转基因的CD8 T细胞的CD8 α 表达水平高于内源性水平。

[0362] 遇到同族抗原后CD8表达对T细胞增殖的影响。如上所述,编辑的T细胞用增殖染料染色。染色后,用一系列浓度的同族comPACT蛋白刺激T细胞。48-72小时后,收获T细胞并用如上所述的抗CD4、抗CD8和抗2A肽染色。通过2A表达鉴定编辑的T细胞。CD4和CD8 T细胞的增殖通过量化增殖染料的稀释来确定。缺乏CD8 α 转基因的表达NeoTCR的T细胞用作阴性对照。与缺乏CD8 α 表达的CD4 T细胞相比,表达CD8 α 转基因的NeoTCR CD4 T细胞响应于较低浓度的同族comPACT进行增殖。

[0363] 遇到同族抗原时CD8 α 表达对细胞因子产生的影响。除了增殖外,还通过细胞内细胞因子染色测量了效应细胞因子的产生。在该测定中,NeoTCR产物和CD8产物1在存在brefeldin A的情况下用不同浓度的同族comPACT刺激5小时。刺激后,T细胞用抗CD4和抗CD8 α 染色。将细胞透化并用抗P2A肽、抗IFN γ 、抗TNF和抗IL2染色。与缺乏CD8 α 表达的NeoTCR CD4 T细胞相比,表达CD8 α 转基因的NeoTCR CD4 T细胞响应于较低浓度的同族comPACT产生效应细胞因子。

[0364] 遇到同族抗原时CD8 α 表达对杀伤活性的影响。为了评估效应子功能,将编辑的CD4和CD8 T细胞与用上述同族肽脉冲的HLA匹配的靶细胞一起培养。对CD4和CD8 T细胞分别编辑以评估表达CD8 α 的CD4 T细胞杀死靶细胞的能力。与缺乏CD8 α 表达的neoTCR CD4 T细胞相比,表达CD8 α 转基因的NeoTCR CD4 T细胞杀死了更多的呈递同族肽的靶细胞。

[0365] 实施例3产生CD8产物2

[0366] 被改造为表达CD8 α 的CD4 T细胞缺乏CD8 β 表达。然而,CD8 β 对LCK具有更高的亲和力(Irie et al.,1998,J.Immunol,161(1),183-191)。因此,T细胞被编辑为共表达CD8 β 和CD8 α (即CD8产物2)。生成包含侧翼为P2A位点的CD8 β 、侧翼为P2A位点的CD8 α 以及前文所述的TRB和TRA等位基因的额外构建体。使用上述相同的测定法评估表达CD8 α 和CD8 β 的CD4和CD8 T细胞。图11B显示了具有CD8 α 和CD8 β 的序列的示例性表达构建体。

[0367] 在编辑的CD4 T细胞中也评估了CD8 β 表达。与仅表达CD8 α 转基因的CD4 T细胞相比,表达CD8 α 和CD8 β 转基因的NeoTCR CD4 T细胞响应于较低浓度的同族comPACT进行增殖。与仅表达CD8 α 转基因的NeoTCR CD4 T细胞相比,表达CD8 α 和CD8 β 转基因的NeoTCR CD4 T细胞响应于较低浓度的同族comPACT也产生效应细胞因子。与仅表达CD8 α 转基因的neoTCR CD4 T细胞相比,表达CD8 α 和CD8 β 转基因的neoTCR CD4 T细胞杀死了更多呈递同族肽的靶细胞。

[0368] 实施例4产生嵌合CD8 α 和CD8 β 构建体和CD8产物3和4

[0369] 为了确保T细胞的有效编辑和neoTCR的表达,产生了由与CD8 β 细胞内结构域连接的CD8 α 的细胞外和跨膜结构域的编码序列组成的嵌合蛋白。具有连接到CD8 β 序列的细胞内结构域的CD8 α 的细胞外和跨膜结构域的示例性表达构建体(即CD8产物3)在图11C中示出。

[0370] 此外,CD4的细胞内结构域对LCK的亲合力甚至高于CD8(Irie et al.,1998)。因此,产生了第二个嵌合蛋白,其包含与CD4细胞内结构域相连的CD8 α 细胞外和跨膜结构域的编码序列。图11D示出了示例性表达构建体,其中CD8 α 的细胞外和跨膜结构域与CD4序列的细胞内结构域相连(即CD8产物4)。

[0371] 使用上述相同的测定法评估表达CD8产物3和4的CD4和CD8 T细胞。

[0372] 与仅表达CD8 α 转基因的CD4 T细胞相比,表达CD8 α -CD8 β -ID转基因的NeoTCR CD4 T细胞响应于较低浓度的同族comPACT进行增殖。与仅表达CD8 α 转基因的NeoTCR CD4 T细胞相比,表达CD8 α -CD8 β -ID转基因的NeoTCR CD4 T细胞响应于较低浓度的同族comPACT产生效应细胞因子。与表达CD8 α -CD8 β -ID转基因的neoTCR CD4 T细胞相比,表达CD8 α -CD8 β -ID转基因的NeoTCR CD4 T细胞杀死了更多的呈递同族肽的靶细胞。

[0373] 与表达CD8 α -CD8 β -ID转基因的neoTCR CD4 T细胞相比,表达CD8 α -CD4-ID转基因的NeoTCR CD4 T细胞响应于较低浓度的同族comPACT进行增殖。与表达CD8 α -CD8 β -ID转基因的NeoTCR CD4 T细胞相比,表达CD8 α -CD4转基因的neoTCR CD4 T细胞响应于较低浓度的同族comPACT产生效应细胞因子。

[0374] 与表达CD8 α -CD8 β -ID转基因的neoTCR CD4 T细胞相比,表达CD8 α -CD4-ID转基因的NeoTCR CD4 T细胞杀死了更多的呈递同族肽的靶细胞。与缺乏转基因的neoTCR CD8 T细胞相比,表达CD8 α -CD4-ID转基因的NeoTCR CD8 T细胞响应于较低浓度的同族comPACT进行增殖。与缺乏转基因的neoTCR CD8 T细胞相比,表达CD8 α -CD4转基因的NeoTCR CD8 T细胞响应于较低浓度的同族comPACT产生效应细胞因子。与缺乏转基因的neoTCR CD8 T细胞相比,表达CD8 α -CD4-ID转基因的NeoTCR CD8 T细胞杀死了更多的呈递同族肽的靶细胞。

[0375] 实施例5 CD8产物提高了对neoE-HLA目标识别的敏感性并触发促炎性和细胞毒性功能

[0376] MHC-I neoTCR是从结肠直肠癌患者血液中捕获的neoE特异性T细胞克隆而来的。健康供体CD8和CD4 T细胞经过精确基因组改造,以单独表达克隆的MHC-I neoTCR,或在基因编辑的T细胞中包括异位CD8辅助受体的改造。流式细胞术分析分别用于评估neoTCR和异位CD8辅助受体(即CD8构建体1-4的CD8和CD4组分)的表面表达。拯救CD4T细胞中NeoTCR结合的低亲和力,观察到CD8依赖性NeoTCR。重要的是,响应于同族抗原的刺激,CD107a和细胞内IFN γ 染色显示CD4 T细胞对MHC-1neoTCR诱导的效应子功能的敏感性增加了10-100倍,而对特异性没有影响。通过表达额外的CD8辅助受体,在CD8 T细胞上未观察到功能或灵敏度的变化。

[0377] 这些结果表明,将CD8辅助受体与CD8依赖性MHC-1neoTCR同时精确基因组改造导入CD4 T细胞(即CD8产物1-4)显著增加了它们对neoE-HLA目标识别以及触发促炎和细胞毒性功能的敏感性,但不损害抗原特异性。

[0378] 实施例6具有不同LCK亲和力的CD8产物的产生和设计

[0379] 如本文所述,产生了四类CD8产物:

[0380] 1. CD8 α 同源二聚体(CD8构建体1)

[0381] 2. CD8 α -P2A-CD8 β (CD8构建体2)

[0382] 3. CD8 α 与CD8 β 细胞内结构域 (CD8构建体3)

[0383] 4. CD8 α 同源二聚体与CD4细胞内结构域 (CD8构建体4)

[0384] 如图10所示,这些CD8构建体和产生的CD8产物被设计为允许不同程度的LCK亲和力。正如预测的那样,CD8产物1显示具有最低的LCK亲和力,其次是CD8产物2、CD8产物3和CD8产物4(按此顺序,CD8产物4具有最高的LCK亲和力)。

[0385] 基于CD8产物4的高亲和力,该产物被用于细胞杀伤试验,以示例CD8产物1-4与NeoTCR产物相比具有更高的细胞杀伤能力。

[0386] CD4+T细胞按照本文所述进行改造以表达图2D和3D中描述的CD8产物4(其中TCR097作为产物中的NeoTCR)。SW620细胞系被改造成异源表达R20Q突变(TCR097的同族抗原)。表达NeoTCR097的CD8产物4与SW620异源细胞组合。如图13A和13B所示,与也表达TCR097的NeoTCR产物相比,CD8产物4对表达同族抗原的SW620细胞提供了实质上更好的杀伤。图13A中所示的实验是在E:T比为1:1的情况下进行的,如图所示,表达TCR097的NeoTCR产物在杀死表达同族抗原的SW620细胞方面没有表现出任何功效。图13B中所示的实验是在E:T比为2:1的情况下进行的,虽然表达TCR097的NeoTCR产物显示出一些杀死表达同族抗原的SW620细胞的能力,但从实验中可以清楚地看出,表达TCR097的CD8产物4具有优越的功效。

[0387] 使用与图13A和13B中提供的数据的上述实验中相同的工程化CD4+细胞,也在被工程化以纯合表达R20Q突变的SW620细胞系上进行了测试。在该实验中,同族抗原的高表达能够补偿低亲和力的NeoTCR097,并且表达TCR097的NeoTCR产物和表达TCR097的CD8产物4均显示出杀死SW620细胞的功效。然而,同族抗原在纯合SW620细胞中的高表达在生理学上无关,该实验旨在通过进一步改造它们来也包含CD8 α 同源二聚体和CD4细胞内结构域(即CD8产物4),来突出拯救具有低亲和力TCR的NeoTCR产物的能力,所述NeoTCR产物无法有效地与肿瘤细胞衔接并杀死它们。

[0388] 作为CD8产物功效的最终对照和证明,还转染了CD8 T细胞以表达NeoTCR097和CD8 α 同源二聚体及CD4细胞内结构域(即使用CD8 T细胞代替CD4 T细胞的CD8产物4)。如图15A和15B的上图表所示,当产物由CD4 T细胞制成时,CD8产物4比NeoTCR产物提供了明显更好的SW620细胞杀伤。然而,当CD8产物4和NeoTCR产物由CD8 T细胞制成时(图15A和15B中的下图),由于CD8 T细胞中内源性CD8的表达,NeoTCR产物的能力得以挽救。虽然没有显示重叠图,但还应注意,图15A和15B中上图显示的CD4 T细胞中的CD8产物4似乎比下面两个图中CD8 T细胞中的CD8产物4具有更好的功效;这表明本文所述的CD8产物具有与肿瘤细胞的同族抗原衔接的卓越能力,从而导致肿瘤死亡并有效治疗需要治疗的癌症患者。

[0389] 实施例6 CD8产物在保持NeoTCR敏感性的同时提高了CD4 T细胞的敏感性

[0390] 为了确认CD8构建体正确表达,测试了CD8产物1、2、3和4以确定CD8 α 的表面表达。结果表明,CD8产物1、2、3和4均表现出正常的CD8 α 表面表达。CD8产物4的代表性数据如图16所示。

[0391] 确定CD8构建体如何影响CD4 T细胞对CD8产物中表达的NeoTCR同族抗原的敏感性和特异性也很重要。进行了敏感性实验,结果表明CD8产物1-4表现出增加的CD4 T细胞敏感性(图17A)。还对CD8产物1-4进行了特异性实验。CD8产物1、2、3和4由NeoTCR097制成。进行

实验以测试CD8产物1、2、3和4(表达NeoTCR097)以评估这些产物对NeoTCR097同族抗原的特异性。如图17B所示,CD8产物1、2、3和4(表达NeoTCR097)对NeoTCR097的同族抗原具有特异性,并且当暴露于错配抗原时不显示活性。特异性由INF γ 和CD107的产生决定,它们是T细胞活化的证据。因此,与表达相同NeoTCR的NeoTCR产物相比,本文所述的CD8产物对CD4 T细胞的敏感性增加,并保持其对表达的NeoTCR的同族抗原的特异性。

[0392] 最后,进行了实验以研究CD8构建体对CD8依赖性和CD8非依赖性NeoTCR的影响。预计CD8依赖性NeoTCR将显示对同族抗原的敏感性增加,因为CD8细胞将被改造为表达CD8 α ,而CD8非依赖性NeoTCR不会显示敏感性增加,这是因为NeoTCR的独立性质。然而,结果表明NeoTCR产物1、2、3和4令人惊奇地增加了CD8依赖性(例如NeoTCR097)和CD8非依赖性(例如NeoTCR089)NeoTCR的敏感性。因此,结果表明,CD8构建体1、2、3和4可以改善NeoTCR的衔接和对于所有NeoTCR,改善具有同族NeoTCR抗原的肿瘤细胞的T细胞杀伤,无论它们是CD8依赖性还是CD8非依赖性的。

[0393] 虽然本发明已经针对几个所描述的实施方案以某种长度和一些具体性进行了描述,但并不意在将其限制于任何这样的细节或实施方案或任何特定实施方案,而是应通过参考所附权利要求来解释,以便根据现有技术提供对这些权利要求的最广泛可能的解释,并因此有效地涵盖本发明的预期范围。

[0394] 在此提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均通过引用全部纳入。如有冲突,以本说明书(包括定义)为准。此外,章节标题、材料、方法和实施例仅是说明性的而不是限制性的。

序列表

<110>	派克特制药公司	
<120>	使用CD8改造的T细胞疗法治疗癌症的组合物和方法	
<130>	087520.0145	
<140>		
<141>		
<150>	62/841,748	
<151>	2019-05-01	
<150>	62/841,753	
<151>	2019-05-01	
<160>	148	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	926	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述:合成的 左同源臂_NeoTCR产物	
<400>	1	
	acattaaaa cacaaaatcc tacgaaata ctgaagaatg agtctcagca ctaaggaaaa	60
	gcctccagca gctcctgctt tctgagggtg aaggatagac gctgtggctc tgcatgactc	120
	actagcactc tateacggcc atattctggc agggtcagtg gctccaacta acatttgttt	180
	ggtactttac agttttattaa atagatgitt atatggagaa gctctcattt ctttctcaga	240
	agagcctggc taggaagggtg gatgaggcac catattcatt ttgcagggtga aattcctgag	300
	atgtaaggag ctgctgtgac ttgctcaagg ccttatatcg agtaaaccgt agtgcctggg	360
[0001]	cttagacgea ggtgttctga tttatagtcc aaaacctcta tcaatgagag agcaatctcc	420
	tggtaatgtg atagatttcc caacttaatg ccaacatacc ataaacctcc cattctgcta	480
	atgccccacc taagttgggg agaccactcc agattccaag atgtacagtt tgctttgctg	540
	ggccttttcc caatgcctgc cttactctg ccagagttat attgctgggg ttttgaagaa	600
	gatcctatta aataaaaagaa taagcagtat tattaagtag ccttgcattt caggttccct	660
	tgagtggcag gccaggcctg gccgtgaacg ttactgaaa tcatggcctc ttggccaaga	720
	ttgatagctt gtgcctgtcc ctgagtccca gtccateacg agcagctggt ttctaagatg	780
	ctatttccc tataaagcat gagaccgtga cttgccagcc ccacagagcc ccgcccctgt	840
	ccatcactgg catctggact ccagcctggg ttggggcaaa gagggaaatg agatcatgtc	900
	ctaacctga tcctcttgtc ccacag	926
<210>	2	
<211>	74	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述:合成的 TRAC CDS I_NeoTCR产物	
<400>	2	
	atatccagaa ccctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt	60
	ctgtctgect attc	74
<210>	3	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述:合成的 GSG接头_NeoTCR产物	
<400>	3	
	gaattcgget ccgga	15
<210>	4	

	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的	
	P2A 1_NeoTCR产物	
	<400> 4	
	gccactaact tctccctggt gaaacaggct ggcgatgttg aagaaaaccc cggtcct	57
	<210> 5	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的	
	HGH信号序列和弗林蛋白酶序列_NeoTCR 产物	
	<400> 5	
	atggccaccg gctctagaac aagcctgctg ctgcgttttg gcctgctctg cctcccatgg	60
	ctccaagaag gatctgct	78
	<210> 6	
	<211> 345	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的	
	示例性TRB_VDJ (TCR097)_NeoTCR 产物	
	<400> 6	
	aatgctggtg tcaactcagac cccaaaattc cgcatectga agataggaca gagcatgaca	60
	ctgcagtgtg cccaggatat gaaccataac tacatgtact ggtatcgaca agaccaggc	120
[0002]	atggggctga agctgattta ttattcagtt ggtgctggtg tcaactgataa aggagaagtc	180
	ccgaatggct acaacgtctc cagatcaace acagaggatt tcccgtcag gctggagttg	240
	gctgctcct cccagacatc tgtgtacttc tgtgccagct ccctacaggt tcctacaat	300
	gagcagttct tcgggccagg gacacggctc accgtgctag aggac	345
	<210> 7	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的	
	TRBC恒定区_NeoTCR 产物	
	<400> 7	
	ctgaaaaacg tgttccctcc aaaagtggcc gtgttcgagc cttctgagge cgagatcagc	60
	cacacacaga aagccacact cgtgtgtctg gctaccggct tctaccccga tcactggaa	120
	ctgtcttggg gggccaacgg caaagagggt cacagcggcg tcagcacaga tcccagcct	180
	ctgaaagaac agcccgtctt gaacgacagc cgtactgcc tgtctagcag actgagagtg	240
	tccgccact tctggcagaa ccccagaaac cacttcagat gccaggcca gttctacggc	300
	ctgagcgaga acgatgagtg gaccaggac agagccaagc ctgtgacaca gatcgtgtct	360
	gccgaagcct ggggcagagc cgattgtggc ttaccagcg agtcatacca gcaggcgtg	420
	ctgtctgcca ccactctgta tgagatcctg ctggcaagg ccacactgta cgctgtgctg	480
	gtgtctgctc tgggtctgat ggctatggc tcccgggagc gcatccccga ggcc	534
	<210> 8	
	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的	
	弗林蛋白酶切割位点_NeoTCR 产物	
	<400> 8	

	cgggcccaagc gg	12
	<210> 9	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的 GSG接头_NeoTCR 产物	
	<400> 9	
	ggcagcggc	9
	<210> 10	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的 P2A_NeoTCR 产物	
	<400> 10	
	gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc ggcgacgtgg aggagaaccc cggcct	57
	<210> 11	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的 HGH SS_NeoTCR 产物	
	<400> 11	
[0003]	atggccacag gcagcagaac atctctgctg ctggccttcg gactgctgtg tctgccttgg	60
	ctgcaagagg gttccgcc	78
	<210> 12	
	<211> 337	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的 示例性TRA-VDJ (TCR097)_NeoTCR 产物	
	<400> 12	
	gctcagacag tcaactcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gaccgtgacc	60
	ctgagctgca catatgacac cagtgagagt gattattatt tattctggta caagcagcct	120
	cccagcagge agatgattct cgttattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaaca	180
	gagaatcgtt tctctgtgaa ctccagaaa gcagccaat ccttcagtct caagatctca	240
	gactcacagc tgggggatgc cgcgatgat ttctgtgctt ttgggaactt caacaaattt	300
	tactttggat ctgggaccaa actcaatgta aaaccaa	337
	<210> 13	
	<211> 74	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的 TCR- α /恒定_NeoTCR 产物	
	<400> 13	
	atattcagaa ccccgatcct gctgtgtatc agctgcgcga cagcaagagc agcgacaaga	60
	gcgtgtgttt gttc	74
	<210> 14	
	<211> 200	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	

<220>								
<223>	人工序列的描述：合成的							
	TRAC CDS/右HR臂_NeoTCR 产物							
<400>	14							
accgattttg	attctcaaac	aatgtgtca	caaagtaagg	attctgatgt	gtatatcaca			60
gacaaaactg	tgctagacat	gaggctatg	gacttcaaga	gcaacagtgc	tgtggcctgg			120
agcaacaaat	ctgactttgc	atgtgcaaac	gccttcaaca	acagcattat	tccagaagac			180
accttcttcc	ccagcccagg							200
<210>	15							
<211>	800							
<212>	DNA							
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)							
<220>								
<223>	人工序列的描述：合成的							
	右HR臂_NeoTCR 产物							
<400>	15							
taagggcagc	tttggtgctc	tcgcaggctg	tttccttgc	tcaggaatgg	ccaggttctg			60
cccagagctc	tggtcaatga	tgtctaaaac	tcctctgatt	ggtggtctcg	gccttatcca			120
ttgccaccaa	aacctctttt	ttactaagaa	acagtgagec	ttgttctggc	agtccagaga			180
atgacacggg	aaaaaagcag	atgaagagaa	ggtggcagga	gagggcacgt	ggcccagcct			240
cagtctctcc	aactgagttc	ctgctgcct	gcctttgctc	agactgtttg	ccccttactg			300
ctcttctagc	cctcattcta	agccccttct	ccaagttgcc	tctccttatt	tctccctgtc			360
tgccaaaaaa	tctttcccag	ctcactaagt	cagtctcacg	cagtcactca	ttaaccacc			420
aatcactgat	tgtgccggca	catgaatgca	ccaggtgttg	aagtggagga	attaaaaagt			480
cagatgaggg	gtgtgcccag	aggaagcacc	attctagttg	ggggagccca	tctgtcagct			540
gggaaaagtc	caaataactt	cagattggaa	tgtgttttaa	ctcagggttg	agaaaacagc			600
taccttcagg	acaaaagtca	gggaagggtc	ctctgaagaa	atgctacttg	aagataccag			660
ccctaccaag	ggcagggaga	ggaccctata	gaggcctggg	acaggagctc	aatgagaaaag			720
[0004] gagaagagca	gcaggcatga	gttgaatgaa	ggaggcaggg	ccgggtcaca	ggccttcta			780
ggccatgaga	gggtagacag							800
<210>	16							
<211>	6							
<212>	DNA							
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)							
<220>								
<223>	人工序列的描述：合成的							
	人工序列_NeoTCR 产物							
<400>	16							
gctagc								6
<210>	17							
<211>	620							
<212>	DNA							
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)							
<220>								
<223>	人工序列的描述：合成的							
	pBR322_起始_NeoTCR 产物							
<400>	17							
cgcgttgetg	gcgtttttcc	ataggetccg	ccccctgac	gagcatcaca	aaaatcgacg			60
ctcaagtcag	aggtggcgaa	accgcacagg	actataaaga	taccagcgt	ttccccctgg			120
aagctccctc	gtgcgctctc	ctgttccgac	cctgcccgtt	accggatacc	tgctccgctt			180
tctcccttcg	ggaagcgtgg	cgttttctca	tagctcacgc	tgtaggtatc	tcagttcgg			240
gtaggtcgtt	cgtccaagc	tgggctgtgt	gcacgaacc	cccgttcagc	ccgaccctg			300
cgcttatcc	ggtaactatc	gtcttgagtc	caaccggta	agacacgact	tatgccact			360
ggcagcagcc	actggtaaca	ggattagcag	agcagaggtat	gtaggcggtg	ctacagagtt			420
cttgaagtgg	tgccctaact	acggetacac	tagaagaaca	gtatttggta	tctgctctct			480
gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	tggtagctct	tgatccggca	aacaaaccac			540
cgctggtagc	ggtggttttt	ttgtttgcaa	gcagcagatt	acgcgcagaa	aaaaggatc			600

tcaagaagat cctttgatct	620
<210> 18	
<211> 810	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的 卡那霉素抗性基因(KanR2) _NeoTCR 产物	
<400> 18	
ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat	60
accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca	120
taggatggca agatcctggt atcggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc	180
tattaatttc ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagttag aaatcaccat gagtgcagac	240
tgaatccggt gagaatggca aaagttaggt catttctttc cagacttggt caacaggcca	300
gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacaaa cgtttattca ttcgtgattg	360
cgctgagcc agacgaaata cgcgatcgt gttaaaagga caattacaaa caggaatcga	420
atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata	480
ttcttctaac acctggaatg ctgtttttcc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc	540
atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cgggaagagc ataaattccg tcagccagtt	600
tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa	660
caactctggc gcategggct tcccatacaa gcgatagatt gtcgcacctg attgcccgc	720
attatcgcca gccattttat accatataa atcagcatcc atgttggaa ttaatcgcg	780
cctcgacgtt tcccgttgaa tatggctcat	810
<210> 19	
<211> 99	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
[0005] <223> 人工序列的描述: 合成的 卡那霉素启动子_NeoTCR 产物	
<400> 19	
aacaccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcatg atgatatt	60
tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt ttgagacac	99
<210> 20	
<211> 5137	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的 完整的NeoTCR 产物构建体, 具有TCR97插入_NeoTCR产物	
<400> 20	
ggtaccacat taaaaacaca aaatcctacg gaaatactga agaatgagtc tcagcactaa	60
ggaaaagcct ccagcagctc ctgctttctg aggggtgaagg atagacgctg tggctctgca	120
tgactcacta gcactctate acggccatat tctggcaggg tcagtggctc caactaacat	180
ttgtttggta ctttacagtt tattaatat atgtttatat ggagaagctc tcatttcttt	240
ctcagaagag cctggctagg aaggtggatg aggcaccata ttcattttgc aggtgaaatt	300
cctgagatgt aaggagctgc tgtgacttgc tcaaggcctt atatcgagta aacggtagtg	360
ctggggctta gacgcaggtg ttctgattta tagttcaaaa cctctatcaa tgagagagca	420
atctcctggt aatgtgatag atttcccaac ttaatgcaa catacataa acctccatt	480
ctgctaatgc ccagcctaag ttggggagac cactccagat tccaagatgt acagtttct	540
ttgctgggcc tttttcccat gctgctttt actctgccag agttatattg ctggggtttt	600
gaagaagatc ctattaaata aaagaataag cagtattatt aagtagccct gcatttcagg	660
tttccttgag tggcaggcca ggctggccg tgaacgttca ctgaaatcat ggctcttgg	720
ccaagattga tagcttctgc ctgtccttga gtcccagtec atcacgagca gctggtttct	780
aagatgctat ttcccgtata aagcatgaga cctgacttgc ccagccccac agagccccgc	840
cctgttccat cactggcctc tggactccag cctgggttgg ggcaaagagg gaaatgagat	900
catgtcctaa cctgatcct cttgtcccaac agatatccag aaccctgacc ctgccgtgta	960

	ccagctgaga	gactctaaat	ccagtgacaa	gtctgtctgc	ctattcgaat	tcggctccgg	1020
	agccactaac	ttctccctgt	tgaacacagc	tggcgatggt	gaagaaaacc	ccggtcctat	1080
	ggccaccggc	tctagaacaa	gcctgctgct	cgcttttggc	ctgctctgcc	tcccatggct	1140
	ccaagaagga	tctgctaattg	ctggtgtcac	tcagacccca	aaattccgca	tctgaagat	1200
	aggacagagc	atgacactgc	agtgtaccca	ggatatgaac	cataactaca	tgtactggta	1260
	tcgacaagac	ccaggcatgg	ggctgaagct	gattttattat	tcagttgggtg	ctgggtatcac	1320
	tgataaagga	gaagtcccga	atggctacaa	cgtctccaga	tcaaccacag	aggatttccc	1380
	gctcaggctg	gagttggctg	ctccctccca	gacatctgtg	tacttctgtg	ccagctccct	1440
	acaggttccc	tacaatgagc	agttcttcgg	gccagggaca	cggtcaccg	tgctagagga	1500
	cctgaaaaac	gtgttcctc	caaaagtggc	cgtgttcgag	ccttctgagg	ccgagatcag	1560
	ccacacacag	aaagccacac	tcgtgtgtct	ggctaccggc	ttctaccccg	atcacgtgga	1620
	actgtcttgg	tgggtcaacg	gcaaaagagt	gcacageggc	gtcagcacag	atccccagcc	1680
	tctgaaagaa	cagcccgtc	tgaacgacag	ccgctactgc	ctgtctagca	gactgagagt	1740
	gtccgccacc	ttctggcaga	accccagaaa	ccacttcaga	tgccaggctc	agttctacgg	1800
	cctggaagag	aacgatgagt	ggaccagga	cagagccaa	cctgtgacac	agatcgtgtc	1860
	tgccgaagcc	tggggcagag	ccgattgtgg	ctttaccagg	gagtcatacc	agcagggcgt	1920
	gctgtctgcc	accatcctgt	atgagatcct	gctcggcaag	gccacactgt	acgctgtgct	1980
	ggtgtctgct	ctgggtgctga	tggctatggg	ctcccgggag	cgcatccccg	aggcccgggc	2040
	caagcggggc	agcggcgcca	ccaacttcag	cctgctgaag	caggccggcg	acgtggagga	2100
	gaacccccgc	cctatggcca	caggcagcag	aacatctctg	ctgctggcct	tcggactgct	2160
	gtgtctgctc	tggctgaag	agggttccgc	cgctcagaca	gtcactcagt	ctcaaccaga	2220
	gatgtctgtg	caggaggcag	agaccgtgac	cctgagctgc	acatatgaca	ccagtgagag	2280
	tgattattat	ttattctggg	acaagcagcc	tcccagcagg	cagatgattc	tcgttatctg	2340
	ccaagaagct	tataagcaac	agaatgcaac	agagaatcgt	ttctctgtga	acttcagaa	2400
	agcagccaaa	tccttcagtc	tcaagatctc	agactcacag	ctgggggatg	ccgcatgta	2460
	tttctgtgct	tttgggaact	tcaacaaatt	ttactttgga	tctgggacca	aactcaatgt	2520
	aaaaccaaat	attcagaacc	ccgacccctg	tgtgtatcag	ctgcgcgaca	gcaagagcag	2580
	cgacaagagc	gtgtgtttgt	tcaccgattt	tgattctcaa	acaaatgtgt	cacaaagtaa	2640
[0006]	ggattctgat	gtgtatatca	cagacaaaac	tgtgtctagc	atgaggtcta	tggactcaa	2700
	gagcaacagt	gctgtggcct	ggagcaacaa	atctgacttt	gcattgtgcaa	acgcttcaa	2760
	caacagcatt	attccagaag	acaccttctt	ccccagccca	ggtaagggca	gctttgtgc	2820
	cttcgcaggc	tgtttccttg	cttcaggaat	ggccagggtc	tgcccagagc	tctggtcaat	2880
	gatgtctaaa	actcctctga	ttggtggtct	cgcccttctc	cattgccacc	aaaaccctct	2940
	ttttactaag	aaacagtgag	ccttgttctg	gcagtcacga	gaatgacacg	ggaaaaaagc	3000
	agatgaagag	aaggtggcag	gagagggcac	gtggcccagc	ctcagtctct	ccaactgagt	3060
	tctgcctgc	ctgcctttgc	tcagactgtt	tgccccttac	tgtcttctta	ggcctcatc	3120
	taagccccct	ctccaagtgg	cctctcctta	tttctccctg	tctgccccaa	aatcttccc	3180
	agctcactaa	gtcagtctca	cgcagtcaact	cattaacceca	ccaatcactg	attgtgccgg	3240
	cacatgaatg	caccagggtgt	tgaagtggag	gaattaaaaa	gtcagatgag	gggtgtgccc	3300
	agaggaagca	ccattctagt	tgggggagcc	catctgtcag	ctgggaaaag	tccaaataac	3360
	ttcagattgg	aatgtgtttt	aactcagggt	tgagaaaaca	gctaccttca	ggacaaaagt	3420
	cagggaaggg	ctctctgaag	aatgctact	tgaagatacc	agccctacca	agggcaggga	3480
	gaggacccta	tagaggcctg	ggacaggagc	tcaatgagaa	aggagaagag	cagcaggcat	3540
	gagttgaatg	aaggaggcag	ggccgggtca	cagggccttc	taggcatgca	gaggttagac	3600
	aggttagccg	cgttgctggc	gttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcatacaaaa	3660
	aatcgacgct	caagttagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcgttt	3720
	ccccctggaa	gctccctctg	gcgctctcct	gttccgacc	tgccgcttac	cggataacctg	3780
	tccgcttttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	3840
	agttcgggtg	aggtegttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	3900
	gaccgctgcg	ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	accggtaag	acacgactta	3960
	tcgccactgg	cagcagccac	tggtaacagg	atttagcagag	cgaggtatgt	agggcgtgct	4020
	acagagttct	tgaagtgggtg	gcctaactac	ggctacacta	gaagaacagt	atgttgatc	4080
	tgcgctctgc	tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	4140
	caaaccaccg	ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	4200
	aaaggatctc	aagaagatcc	tttgatcttt	agaaaaactc	atcgagcacc	aatgaaact	4260
	gcaatttatt	catatcagga	ttatcaatac	catatttttg	aaaaagccgt	ttctgtaaatg	4320
	aaggagaaaa	ctcaccgagg	cagttccata	ggatggcaag	atcctggtat	cggctctgca	4380

ttccgactcg	tccaacatca	atacaacct	ttaatttccc	ctcgtcaaaa	ataaggttat	4440
caagtgagaa	atcacatga	gtgacgactg	aatccggtga	gaatggcaaa	agtttatgca	4500
tttctttcca	gacttgttca	acaggccagc	cattacgctc	gtcatcaaaa	tactcgcgat	4560
caaccaaac	gttattcatt	cgtgattgcg	cctgagccag	acgaaatacg	cgatcgcgtg	4620
taaaaggaca	attacaaaca	ggaatcgaat	gcaaccggcg	caggaacact	gccagcgcgat	4680
caacaatatt	ttcacctgaa	tcaggatatt	cttctaatac	ctggaatgct	gtttttccgg	4740
ggatcgcagt	ggtgagtaac	catgcatcat	caggagtacg	gataaaatgc	ttgatggctg	4800
gaagaggcat	aaattccgtc	agccagttta	gtctgacat	ctcatctgta	acatcatggt	4860
caacgctacc	tttgccatgt	ttcagaaaca	actctggcgc	atcgggcttc	ccatacaagc	4920
gatagattgt	cgcacctgat	tgcccacat	tatcgcgagc	ccatttatac	ccatataaat	4980
cagcatccat	gttggaaatt	aatcgcggcc	tcgacgtttc	ccgttgaata	tggetcataa	5040
caccccttgt	attactgttt	atgtaagcag	acagttttat	tgttcatgat	gatataat	5100
tatcttgtgc	aatgtaacat	cagagatttt	gagacac			5137
<210>	21					
<211>	5140					
<212>	DNA					
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)					
<220>						
<223>	人工序列的描述: 合成的完整的NeoTCR 产物构建体, 具有TCR89插入_NeoTCR产物					
<400>	21					
ggtaccacat	taaaaacaca	aaatcctacg	gaaatactga	agaatgagtc	tcagcactaa	60
ggaaaagcct	ccagcagctc	ctgctttctg	agggtgaagg	atagacgctg	tggtctgca	120
tgactcacta	gcaactctatc	acggccatat	tctggcaggg	tcagtggctc	caactaacat	180
ttgtttggta	ctttacagtt	tattaaatag	atgtttatat	ggagaagctc	tcatttcttt	240
ctcagaagag	cctggctagg	aaggtggatg	aggcaccata	ttcattttgc	aggtgaaatt	300
cctgagatgt	aaggagctgc	tgtgacttgc	tcaaggcctt	atatacgagta	aacggtagtg	360
ctggggctta	gacgcaggtg	tctgattta	tagttcaaaa	cctctatcaa	tgagagagca	420
atctcctggg	aatgtgatag	atttccaac	ttaatgcaa	cataccataa	acctccatt	480
ctgctaagtc	ccagcctaag	tggggagac	cactccagat	tccaagatgt	acagtgtct	540
ttgctgggcc	tttttcccat	gectgccttt	actctgccag	agtatatattg	ctggggtttt	600
gaagaagatc	ctattaaata	aaagaataag	cagtattatt	aagtagccct	gcatttcagg	660
tttctttgag	tggcaggcca	ggcctggccg	tgaacgttca	ctgaaatcat	ggcctcttgg	720
ccaagattga	tagcttgtgc	ctgtccctga	gtcccagtec	atcacgagca	gctggtttct	780
aagatgctat	ttcccgtata	aagcatgaga	ccgtgacttg	ccagccccac	agagccccgc	840
ccttgtccat	cactggcatc	tggactccag	cctgggttgg	ggcaaagagg	gaaatgagat	900
catgtcctaa	ccctgatcct	cttgtcccac	agatatccag	aacctgacc	ctgccgtgta	960
ccagctgaga	gactctaaat	ccagtacaa	gtctgtctgc	ctattegaat	tcggctccgg	1020
agccactaac	ttctccctgt	tgaaacaggc	tggcgatggt	gaagaaaacc	ccggtcctat	1080
ggccaccggc	tctagaacaa	gectgetgct	cgcttttggc	ctgctctgcc	tcccatggct	1140
ccaagaagga	tctgctgatg	ctggaatcac	ccagagccca	agatacaaga	tcacagagac	1200
aggaaggcag	gtgaccttga	tgtgtcacca	gacttggagc	cacagctata	tgttctggta	1260
tcgacaagac	ctgggacatg	ggctgaggct	gatctattac	tcagcagctg	ctgatattac	1320
agataaagga	gaagtctccg	atggctatgt	tgtctccaga	tccaagacag	agaatttccc	1380
cctcactctg	gagtcagcta	cccgtccca	gacatctgtg	tatttctgcg	ccagcagtga	1440
ggacagttac	gagcagtaact	tcgggcccggg	caccaggctc	acggtcacag	aggacctgaa	1500
aaacgtgttc	cctccaaaag	tggccgtgtt	cgagccttct	gaggccgaga	tcagccacac	1560
acagaaagcc	acactcgtgt	gtctggctac	cggttcttac	cccgatcag	tggaactgtc	1620
ttggtgggtc	aacggcaaag	aggtgcacag	cggcgtcagc	acagatcccc	agcctctgaa	1680
agaacagccc	gctctgaacg	acagccgcta	ctgcctgtct	agcagactga	gagtgtccgc	1740
caccttctgg	cagaacccca	gaaaccactt	cagatgccag	gtccagtctt	acggcctgag	1800
cgagaacgat	gagtggacce	aggacagagc	caagcctgtg	acacagatcg	tgtctgccga	1860
agcctggggc	agagccgatt	gtggctttac	cagcgagtca	taccagcagg	gcgtgctgtc	1920
tgccaccatc	ctgtatgaga	tctgtctcgg	caaggccaca	ctgtacgctg	tgtctgggtc	1980
tgtcttgggt	ctgatggcta	tggctctccc	ggagcgcate	cccgaggccc	gggccaagcg	2040
gggcagcggc	gccaccaact	tcagcctgct	gaagcaggcc	ggcgacgtgg	aggagaacct	2100
cggccctatg	gccacaggca	gcagaacatc	tctgtctgct	gccttcggac	tgtctgtct	2160

	gccttgctg	caagagggtt	cgccgcca	gtcagtacc	cagcctgaca	tccacatcac	2220
	tgtctctgaa	ggagcctcac	tggagttgag	atgtaactat	tcctatgggg	caacacctta	2280
	tctctctg	tatgtccagt	ccccggcca	aggcctccag	ctgctcctga	agtacttttc	2340
	aggagacact	ctggttcaag	gcattaaagg	ctttgaggct	gaatttaaga	ggagtcaatc	2400
	ttccttcaat	ctgaggaaac	cctctgtgca	ttggagtgat	gctgctgagt	acttctgtgc	2460
	tgtgggtgaa	ttggacacag	gctttcagaa	acttgtat	ggaactggca	cccgacttct	2520
	ggtcagcca	aatattcaga	acccgatcc	tgctgtgtat	cagctgcg	acagcaagag	2580
	cagcgacaag	agcgtgtgtt	tgttcaccga	ttttgattct	caaacaatg	tgtcacaaag	2640
	taaggattct	gatgtgtata	tcacagacaa	aactgtgcta	gacatgaggt	ctatggactt	2700
	caagagcaac	agtgtgtgg	cctggagcaa	caaactgac	tttgcattgt	caaacgcctt	2760
	caacaacagc	attattccag	aagacacctt	cttccccagc	ccaggttaag	gcagctttgg	2820
	tgcttctgca	ggctgtttcc	ttgcttcagg	aatggccagg	ttctgcccag	agctctggtc	2880
	aatgatgtct	aaaactcctc	tgattggtgg	tctcgccctt	atccattgcc	acaaaaacc	2940
	tctttttact	aagaaacagt	gagccttgtt	ctggcagtc	agagaatgac	acgggaaaaa	3000
	agcagatgaa	gagaaggtgg	caggagaggg	cagctggccc	agcctcagtc	tctccaactg	3060
	agttcctgcc	tgccctgcctt	tgctcagact	gtttgcccct	tactgctctt	ctaggcctca	3120
	ttctaagccc	cttctccaag	ttgctctccc	ttattttctcc	ctgtctgcca	aaaaatcttt	3180
	cccagctcac	taagtcagtc	tcacgcagtc	actcattaac	ccaccaatca	ctgattgtgc	3240
	cggcacatga	atgcaccagg	tgttgaagtg	gaggaattaa	aaagtcagat	gaggggtgtg	3300
	cccagaggaa	gcaccattct	agttggggga	gcccattctgt	cagctgggaa	aagtccaaat	3360
	aacttcagat	tggaatgtgt	tttaactcag	ggttgagaaa	acagctacct	tcaggacaaa	3420
	agtcagggaa	gggctctctg	aagaaatgct	acttgaagat	accagcccta	ccaagggcag	3480
	ggagaggacc	ctatagaggc	ctgggacagg	agctcaatga	gaaaggagaa	gagcagcagg	3540
	catgagttga	atgaaggagg	cagggccggg	tcacagggcc	ttctaggcca	tgagagggta	3600
	gacaggctag	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	3660
	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aaccgcagc	gactataaag	ataccaggcg	3720
	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	3780
	ctgtccgctc	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgctttctc	atagctcacg	ctgtaggtat	3840
[0008]	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tegtccaag	ctgggctgtg	tgacgaacc	ccccgtcag	3900
	cccgaccctg	gcgccttate	cgtaactat	cgtcttgagt	ccaaccgggt	aagacacgac	3960
	ttatcgccac	ttggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcagaggta	tgtaggcgtt	4020
	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaagaac	agtatttggg	4080
	atctgcgctc	tgttgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	4140
	aaacaaacca	ccgctggtag	cggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	4200
	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	tttagaaaaa	ctcatcgagc	atcaaatgaa	4260
	actgcaat	attcatatca	ggattatcaa	taccatattt	ttgaaaaagc	cgtttctgta	4320
	atgaaggaga	aaactcaccg	aggcagttcc	ataggatggc	aagatcctgg	tatcggtctg	4380
	cgattccgac	tcgtccaaca	tcaatacaac	ctattaat	cccctcgtea	aaaataaggt	4440
	tatcaagtga	gaaatcacca	tgagtacga	ctgaatccgg	tgagaatggc	aaaagtttat	4500
	gcatttcttt	ccgactttgt	tcaacaggcc	agccattacg	ctcgtcatca	aatcaactcg	4560
	catcaacca	accgttattc	attcgtgatt	gcgctgagc	cagacgaaat	acgcgatcgc	4620
	tgtaaaaagg	acaattacaa	acaggaatcg	aatgcaaccg	gcgcaggaac	actgccagcg	4680
	catcaacaat	attttcacct	gaatcaggat	attcttctaa	tacctggaat	gctgtttttc	4740
	cggggatcgc	agtgggtgagt	aacctgcat	catcaggagt	acggataaaa	tgcttgatgg	4800
	tcggaagagg	cataaattcc	gtcagccagt	ttagtctgac	catctcatct	gtaacatcat	4860
	tggaacgct	acctttgcca	tgtttcagaa	acaactctgg	cgcatcgggc	ttcccataca	4920
	agegatagat	tgctgcacct	gattgcccg	cattatecgc	agccattta	taccatata	4980
	aatcagcctc	catgttgga	tttaatcgcg	gctcagcgt	ttcccgttga	atatggtc	5040
	taacaccctt	tgtattactg	tttatgtaag	cagacagttt	tattgttcat	gatgatatat	5100
	ttttatcttg	tgcaatgtaa	catcagagat	tttgagacac			5140
	<210>	22					
	<211>	926					
	<212>	DNA					
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)					
	<220>						
	<223>	人工序列的描述: 合成的左HR臂_CD8 产物 1					
	<400>	22					

	acattaaaa cacaaaatcc tacggaaata ctgaagaatg agtctcagca ctaaggaaaa	60
	gcctccagca gctcctgctt tctgagggtg aaggatagac gctgtggctc tgcattgactc	120
	actagcactc tatcacggcc atattctggc agggtcagtg gctccaacta acatttgitt	180
	ggtactttac agtttattaa atagatgitt atatggagaa gctctcattt ctttctcaga	240
	agagcctggc taggaagggtg gatgaggcac catattcatt ttgcagggtga aattcctgag	300
	atgtaaggag ctgctgtgac ttgctcaagg ccttatatcg agtaaaccgg agtgctgggg	360
	cttagacgca ggtgttctga tttatagttc aaaacctcta tcaatgagag agcaatctcc	420
	tggtaatgtg atagatttcc caacttaatg ccaacatacc ataaacctcc cattctgcta	480
	atgcccagcc taagttagggg agaccactcc agattccaag atgtacagtt tgctttgctg	540
	ggccttttcc ccatgcctgc ctttactctg ccagagttat attgctgggg ttttgaagaa	600
	gatcctatta aataaaagaa taagcagtat tattaagtag ccctgcattt caggtttctt	660
	tgagtggcag gccaggcctg gccgtgaacg ttcactgaaa tcatggcctc ttggccaaga	720
	ttgatagctt gtgectgtcc ctgagtccca gtccatcacg agcagctggt ttctaagatg	780
	ctatttcccg tataaagcat gagaccgtga cttgccagcc ccacagagcc ccgccttgt	840
	ccatcactgg catctggact ccagcctggg ttggggcaaa gagggaaatg agatcatgtc	900
	ctaaccctga tctctttgtc ccacag	926
	<210> 23	
	<211> 74	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的TRAC CDS_CD8 产物 1	
	<400> 23	
	atatccagaa ccctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt	60
	ctgtctgect attc	74
	<210> 24	
	<211> 15	
	<212> DNA	
[0009]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的GSG接头_CD8 产物 1	
	<400> 24	
	gaattcgget ccgga	15
	<210> 25	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的P2A_CD8 产物 1	
	<400> 25	
	gccactaact tcagcctggt gaagcaggcc ggcgacgttg aggaaaaccc cggtcct	57
	<210> 26	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8A信号肽_CD8 产物 1	
	<400> 26	
	atggcettac cagtgaccgc cttgtctctg ccgctggcct tgctgtctcca cgccgccagg	60
	ccg	63
	<210> 27	
	<211> 483	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8A细胞外结构域_CD8 产物 1	
	<400> 27	

	agccagttcc ggggtgtcgcc gctggatcgg acctggaacc tgggcgagac agtggagctg	60
	aagtgccagg tgctgctgtc caaccgacg tcgggctgct cgtggctctt ccagccgcgc	120
	ggcgcgcg ccagtcacc cttctccta tacctctccc aaaacaagcc caaggcggcc	180
	gaggggctgg acaccagcg gttctcgggc aagagggttg gggacacctt cgtcctcacc	240
	ctgagcgaact tccgcccaga gaacgagggc tactatttct gctcggccct gagcaactcc	300
	atcatgtact tcagccactt cgtgccggtc ttctgccag cgaagcccac cacgacgcca	360
	gcgcccgcac caccaacacc ggcgcccacc atcgcgtcgc agcccctgtc cctgcgcca	420
	gaggcgtgcc ggccagcggc gggggcgca gtgcacacga ggggctgga cttegcctgt	480
	gat	483
	<210> 28	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8A跨膜结构域_CD8 产物 1	
	<400> 28	
	atctacatct gggcgcctt ggccgggact tgtggggtcc ttctcctgtc actggttatc	60
	acc	63
	<210> 29	
	<211> 96	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8A细胞内结构域_CD8 产物 1	
	<400> 29	
	ctttactgca accacaggaa ccgaagacgt gtttgcaaat gtccccggcc tgtggtcaaaa	60
	tcgggagaca agcccagcct ttcggcgaga tacgtc	96
	<210> 30	
[0010]	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的弗林蛋白酶切割位点_CD8 产物 1	
	<400> 30	
	agggctaaac gg	12
	<210> 31	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的GSG接头_CD8 产物 1	
	<400> 31	
	gaattcggct ccgga	15
	<210> 32	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的P2A_CD8 产物 1	
	<400> 32	
	gccactaact tctccctgtt gaaacaggct ggcgatgttg aagaaaaccc cgtcct	57
	<210> 33	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的HGH/SS/2_CD8 产物 1	

	<400> 33	
	atggccaccg gctctagaac aagcctgctg ctcgcttttg gcctgctctg cctcccatgg	60
	ctccaagaag gatctgct	78
	<210> 34	
	<211> 345	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的示例性TRB_VDJ (TCR097)_CD8 产物 1	
	<400> 34	
	aatgctgggt tcaactcagac cccaaaattc cgcatacctga agataggaca gagcatgaca	60
	ctgcagtgta cccaggatat gaaccataac tacatgtact ggtatcgaca agaccaggc	120
	atggggctga agctgattta ttattcagtt ggtgctggta tcaactgataa aggagaagtc	180
	ccgaatggct acaacgtctc cagatcaacc acagaggatt tcccgctcag gctggagttg	240
	gctgctcctc cccagacatc tgtgtacttc tgtgccagct cctacaggt tccctacaat	300
	gagcagttct tcgggccagg gacacggctc accgtgctag aggac	345
	<210> 35	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的TCR-β /恒定_CD8 产物 1	
	<400> 35	
	ctgaaaaacg tgttccctcc aaaagtggcc gtgttcgagc cttctgaggc cgagatcagc	60
	cacacacaga aagccacact cgtgtgtctg gctaccggct tctaccccga tcacgtggaa	120
	ctgtcttggg gggteaacgg caaagagggt cacagcggcg tcagcacaga tccccagcct	180
	ctgaaagaac agcccgtctt gaacgacagc cgctactgcc tgtctagcag actgagagtg	240
	tccgccacct tctggcagaa ccccagaaac cacttcagat gccaggcca gttctacggc	300
[0011]	ctgagcgaga acgatgagtg gaccaggac agagccaagc ctgtgacaca gatcgtgtct	360
	gccgaagcct ggggcagagc cgattgtggc ttaccaggc agtcatacca gcagggcgtg	420
	ctgtctgcca ccatcctgta tgagatcctg ctcggcaagg ccacactgta cgctgtgctg	480
	gtgtctgctc tgggtgctgat ggctatggtc tcccgggagc gcatccccga ggcc	534
	<210> 36	
	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的弗林蛋白酶切割位点_CD8 产物 1	
	<400> 36	
	cgggccaagc gg	12
	<210> 37	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的GSG接头_CD8 产物 1	
	<400> 37	
	ggcagcggc	9
	<210> 38	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的P2A_CD8产物 1	
	<400> 38	
	gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc ggcgacgtgg aggagaacct cgccct	57

<210>	39	
<211>	78	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的HGH/SS_CD8产物 1	
<400>	39	
	atggccacag gcagcagaac atctctgctg ctggccttcg gactgctgtg tctgccttgg	60
	ctgcaagagg gttccgcc	78
<210>	40	
<211>	337	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的示例性TRA-VDJ (TCR097)_CD8 产物 1	
<400>	40	
	gctcagacag tcaactcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gaccgtgacc	60
	ctgagctgca catatgacac cagtgagagt gattattatt tattctggta caagcagcct	120
	cccagcaggc agatgattct cgttattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaaca	180
	gagaatcgtt tctctgtgaa ctccagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca	240
	gactcacagc tgggggatgc cgcgatgtat ttctgtgctt ttgggaactt caacaaattt	300
	tactttggat ctgggaccaa actcaatgta aaaccaa	337
<210>	41	
<211>	74	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的TCR- α /恒定_CD8 产物 1	
[0012] <400>	41	
	atattcagaa ccccgatcct gctgtgtatc agctgcgcga cagcaagagc agcgacaaga	60
	gcgtgtgttt gttc	74
<210>	42	
<211>	200	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的TRAC CDS/右HR臂_CD8 产物 1	
<400>	42	
	accgattttg attctcaaac aatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca	60
	gacaaaactg tgctagacat gaggtctatg gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg	120
	agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac	180
	acctttcttc ccagcccagg	200
<210>	43	
<211>	800	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的右HR臂_CD8产物1	
<400>	43	
	taagggcagc tttggtgcct tgcagcgtg tttccttgc tccaggaatgg ccaggttctg	60
	cccagagctc tgggtcaatga tgtctaaaac tcctctgatt ggtggtctcg gccttatcca	120
	ttgccaccaa aacctcttt ttactaagaa acagtgagcc ttgttctggc agtccagaga	180
	atgacacggg aaaaaagcag atgaagagaa ggtggcagga gagggcacgt ggcccagcct	240
	cagtctctcc aactgagttc ctgcctgcct gcctttgctc agactgtttg ccccttactg	300
	ctcttctagg cctcatteta agccccttct ccaagttgcc tctccttatt tctcctgtc	360
	tgccaaaaaa tctttcccag ctactaagt cagtctcacg cagtcactca ttaaccacc	420
	aatcactgat tgtgccggca catgaatgca ccaggtgttg aagtggagga attaaaaagt	480

	cagatgaggg gtgtgcccag aggaagcacc attctagttg ggggagccca tctgtcagct	540
	gggaaaagtc caaataaactt cagattggaa tgtgtttttaa ctcagggttg agaaaacagc	600
	taccttcagg acaaaaagtc ggggaaggct cctctgaagaa atgctacttg aagataccag	660
	ccctaccaag ggcagggaga ggacctata gaggcctggg acaggagctc aatgagaaag	720
	gagaagagca gcagggcatga gttgaatgaa ggaggcaggg ccgggtcaca gggccttcta	780
	ggccatgaga gggtagacag	800
	<210> 44	
	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的人工序列_CD8 产物 1	
	<400> 44	
	gctagc	6
	<210> 45	
	<211> 620	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的pBR322_起始_CD8产物1	
	<400> 45	
	cgcgttgctg cggtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg	60
	ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg	120
	aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgctccgctt	180
	tctccctteg ggaagecgtg cgctttctca tagctcacgc tgtaggatc tcagttcggg	240
	gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgctg	300
	cgcttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact	360
[0013]	ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcagaggtat gtaggcggtg ctacagagtt	420
	cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct	480
	gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca acaaaaccac	540
	cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc	600
	tcaagaagat cctttgatct	620
	<210> 46	
	<211> 810	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的卡那霉素抗性 (KanR2)_CD8产物1	
	<400> 46	
	ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat	60
	accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca	120
	taggatggca agatcctggt atcggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc	180
	tattaatttc ccctcgtcaa aaataagggt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac	240
	tgaatccggt gagaatggca aaagtattatg catttctttc cagacttggt caacaggcca	300
	gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaa ccgttattca ttcgtgattg	360
	cgctgagcc agacgaaata cgcgacgct gttaaaagga caattacaaa caggaatcga	420
	atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata	480
	ttcttctaat acctggaatg ctgttttcc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc	540
	atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt	600
	tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa	660
	caactctggc gcategggct tcccatacaa gcgatagatt gtcgcacctg attgcccagc	720
	attatcgcca gcccatattat acccatataa atcagcatcc atgtttggaat ttaatcgcgg	780
	cctcgacggt tcccgttgaa tatggetcat	810
	<210> 47	
	<211> 99	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的卡那霉素启动子_CD8产物1	
	<400> 47	
	aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcatg atgatatatt	60
	tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt ttgagacac	99
	<210> 48	
	<211> 5926	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的完整的CD8产物1构建体, 具有TCR97插入_CD8产物 1	
	<400> 48	
	ggtaccacat taaaaacaca aaatcctacg gaaatactga agaatgagtc tcagcactaa	60
	ggaaaagcct ccagcagctc ctgctttctg aggggtgaagg atagacgctg tggctctgca	120
	tgactcacta gcaactctatc acggccatat tctggcaggg tcagtggtc caactaacat	180
	ttgtttggta ctttacagtt tattaatatag atgtttatat ggagaagctc tcatttcttt	240
	ctcagaagag cctggctagg aagggtgatg aggcaccata ttcatTTTgc aggtgaaatt	300
	cctgagatgt aaggagctgc tgtgacttgc tcaaggcctt atatcgagta aacggtagtg	360
	ctggggctta gacgcaggtg ttctgattta tagttcaaaa cctctatcaa tgagagagca	420
	atctctgtgt aatgtgatag atttcccaac ttaatgcaa cataccataa acctccatt	480
	ctgctaattgc ccagcctaag ttggggagac cactccagat tccaagatgt acagtttgc	540
	ttgctgggcc tttttcccat gctgctttt actctgccag agttatattg ctggggtttt	600
	gaagaagatc ctattaaata aaagaataag cagtattatt aagtagcctt gcatttcagg	660
	tttctttgag tggcaggcca ggcttgccg tgaacgttca ctgaaatcat ggctcttgg	720
	ccaagattga tagcttgtgc ctgtccctga gtcccagtc atcacgagca gctggtttct	780
[0014]	aagatgctat ttcccgtata aagcatgaga cctgacttgc ccagcccccac agagcccccgc	840
	ccttgctccat cactggcctc tggactccag cctgggttgg ggcaaagagg gaaatgagat	900
	catgtcctaa ccctgatcct cttgtcccac agatatccag aaccctgacc ctgcccgtga	960
	ccagctgaga gactcctaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcgaat tcggctccgg	1020
	agccactaac ttcagcctgt tgaagcagge cggcgactgt gaggaaaacc cgggtcctat	1080
	ggccttacca gtgaccgctt tgcctctgcc gctggccttg ctgctccacg ccgccaggcc	1140
	gagccagttc cgggtgtcgc cgctggatcg gacctggaac ctgggagaga cagtggagct	1200
	gaagtgccag gtgctgctgt ccaaccgcac gtcgggctgc tcgtggctct tccagccgcg	1260
	cggcgccgcc gccagtccca cttctctct atacctctc caaaacaagc ccaagcgggc	1320
	cgaggggctg gacaccagc ggttctcgg caagaggttg ggggacacct tegtctcac	1380
	cctgagcgac ttccgcccag agaacgaggg ctactatttc tgctcggccc tgagcaacte	1440
	catcatgtac ttcagccact tcgtgccgtt cttcctgcca gcgaagccca ccacgacgcc	1500
	agcgcgcgca ccaccaacac cggcgcccac catcgcgtcg cagcccctgt ccctgcgcc	1560
	agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg agggggctgg acttcgctg	1620
	tgatatctac atctgggcgc ccttggccgg gacttgtggg gtccttctcc tgtcactggt	1680
	tatcacctt tactgcaacc acaggaaccg aagacgtgtt tgcaaatgtc cccggcctgt	1740
	ggtcaaatcg ggagacaagc ccagccttc ggcgagatac gtcagggcta aacgggaatt	1800
	cggctccgga gccactaact tetccctgtt gaaacaggct ggcgatgttg aagaaaacc	1860
	cggtcctatg gccaccggtt ctagaacaag cctgctgctc gcttttggcc tgctctgctt	1920
	cccattggctc caagaaggat ctgctaattg ttggtgtcact cagaccccaa aattccgcat	1980
	cctgaagata ggacagagca tgacaactgca gtgtaccag gatatgaacc ataactacat	2040
	gtactggtat cgacaagacc caggeatggg gctgaagctg atttattatt cagttggtgc	2100
	tggtatcact gataaaggag aagtcccga tggctacaac gtctccagat caaccacaga	2160
	ggatttccc ctcaggctgg agttggctgc tccctcccag acatctgtgt acttctgtgc	2220
	cagctcccta caggttccct acaatgagca gttcttcggg ccaggacac ggctcaccgt	2280
	gctagaggac ctgaaaaacg tgttccctcc aaaagtggcc gtgttcgagc cttctgagc	2340
	cgagatcagc cacacacaga aagccacact cgtgtgtctg gctaccgct tctaccccga	2400
	tcacgtggaa ctgtcttggg gggtcaacgg caaagaggtg cacagcggcg tcagcacaga	2460
	tccccagcct ctgaaagaac agcccctct gaacgacagc cgctactgccc tgtctagcag	2520

	actgagagt	tccgccacct	tctggcagaa	ccccagaaac	cacttcagat	gccaggtcca	2580
	gttctacggc	ctgagcgaga	acgatgagt	gaccaggac	agagccaagc	ctgtgacaca	2640
	gatcgtgtct	gccgaagcct	ggggcagagc	cgattgtggc	tttaccagcg	agtcatacca	2700
	gcagggegtg	ctgtctgcca	ccatcctgta	tgagatcctg	ctcggcaagg	ccacactgta	2760
	cgctgtgctg	gtgtctgctc	tggtctgat	ggctatggtc	tcccgggagc	gcateccccga	2820
	ggccccggcc	aagcggggca	gcggcgccac	caacttcagc	ctgctgaagc	aggccggcga	2880
	cgtggaggag	aacccccggc	ctatggccac	aggcagcaga	acatctctgc	tgettgccctt	2940
	cggactgctg	tgtctgcctt	ggctgcaaga	gggttccgcc	gctcagacag	tactcagtc	3000
	tcaaccagag	atgtctgtgc	aggaggcaga	gaccgtgacc	ctgagctgca	catatgacac	3060
	cagtgagagt	gattattatt	tattctggta	caagcagcct	cccagcaggc	agatgattct	3120
	cgttattcgc	caagaagcct	ataagcaaca	gaatgcaaca	gagaatcgtt	tctctgtgaa	3180
	cttccagaaa	gcagccaaat	ccttcagtct	caagatctca	gactcacagc	tgggggatgc	3240
	cgcgatgtat	ttctgtgctt	ttgggaactt	caacaaat	tactttggat	ctgggaccaa	3300
	actcaatgta	aaaccaaata	ttcagaaccc	cgatcctgct	gtgtatcagc	tgcgcgacag	3360
	caagagcagc	gacaagagcg	tgtgtttgtt	caccgatttt	gattctcaaa	caaatgtgtc	3420
	acaaagtaag	gattctgatg	tgtatctcac	agacaaaact	gtgctagaca	tgaggtctat	3480
	ggacttcaag	agcaacagt	ctgtggcctg	gagcaacaaa	tctgactttg	catgtgcaaa	3540
	cgccttcaac	aacagcatta	ttccagaaga	caccttcttc	cccagcccag	gtaagggcag	3600
	ctttgggtgcc	ttcgcaggct	gtttccttgc	ttcaggaatg	gccaggttct	gcccagagct	3660
	ctggctcaatg	atgtctaaaa	ctcctctgat	tggtggctctc	ggccttatec	attgccacca	3720
	aaacctctt	ttactaaga	aacagtgagc	cttgttctgg	cagtccagag	aatgacacgg	3780
	gaaaaaagca	gatgaagaga	aggtggcagg	agagggcacg	tggcccagcc	tcagtctctc	3840
	caactgagtt	cctgcctgcc	tgccttgcct	cagactgttt	gccccttact	gctcttctag	3900
	gcctcattct	aagccccctt	tccaagtgc	ctctccttat	ttctccctgt	ctgccaaaaa	3960
	atctttccca	gctcactaag	tcagtctcac	gcagtcactc	attaaccac	caatcactga	4020
	ttgtgccggc	acatgaatgc	accaggtgtt	gaagtggagg	aattaanaag	tcagatgagg	4080
	ggtgtgceca	gaggaagcac	cattctagtt	gggggagccc	atctgtcagc	tgggaaaagt	4140
	ccaataaact	tcagattgga	atgtgtttta	actcagggtt	gagaaaacag	ctacctcag	4200
[0015]	gacaaaagtc	agggaaagggc	tctctgaaga	aatgctactt	gaagatacca	gccttaccac	4260
	gggcaggggg	aggaccctat	agaggcctgg	gacaggagct	caatgagaaa	ggagaagagc	4320
	agcaggcatg	agttgaatga	agaggcagc	gccgggtcac	aggcccttct	aggccatgag	4380
	agggtagaca	ggctagccgc	gttctggcgc	ttttccata	ggctccgcc	ccctgacgag	4440
	catcacaana	atcgacgctc	aagtcagagg	tggcgaaacc	cgacaggact	ataaagatac	4500
	caggcgtttc	cccctggaag	ctccctctg	cgctctctct	ttccgacct	gcccttacc	4560
	ggatacctgt	ccgctttct	cccttcggga	agcgtggcgc	tttctcatag	ctcacgctgt	4620
	aggtatctca	gttcgggtgta	ggtcgttcgc	tccaagctgg	gctgtgtgca	cgaaccccc	4680
	gttcagcccc	accgctgcgc	cttatccggt	aactatctgc	ttgagtcaca	cccggtaaga	4740
	cacgacttat	cgccactggc	agcagccact	ggtaacagga	ttagcagagc	gaggtatgta	4800
	ggcgggtgcta	cagagttctt	gaagtgggtg	cctaactacg	gctacactag	agaacagta	4860
	tttgggtatct	gcgctctgct	gaagccagtt	accttcggaa	aaagagttgg	tagctcttga	4920
	tccggcaaac	aaaccaccgc	tggtagcggg	ggtttttttg	tttgcaagca	gcagattacg	4980
	cgcagaaaaa	aaggatctca	agaagatcct	ttgatcttta	gaaaaactca	tcgagcatca	5040
	aatgaaactg	caatttatct	atatcaggat	tatcaatacc	atatttttga	aaaagccgtt	5100
	tctgtaaatga	aggagaaaac	tcaccgagc	agttccatag	gatggcaaga	tcttggtatc	5160
	ggtctgcgat	tccgactcgt	ccaacatcaa	tacaacctat	taatttcccc	tcgtcaaaaa	5220
	taaggttatc	aagtgagaaa	tcacatgag	tgacgactga	atccggtgag	aatggcaaaa	5280
	gtttatgcat	ttctttccag	acttgttcaa	caggccagcc	attacgctcg	tcatcaaaa	5340
	cactcgcate	aaccaaaccg	ttattcatct	gtgattgcgc	ctgagccaga	cgaatacgc	5400
	gatecgtgtt	aaaaggacaa	ttacaaacag	gaatcgaatg	caaccggcgc	aggaacactg	5460
	ccagcgcate	aacaatattt	tcacctgaat	caggatattc	ttctaatacc	tggaatgctg	5520
	ttttccggg	gatecagctg	gtgagtaacc	atgcatcctc	aggagtacgg	ataaaaatgct	5580
	tgatggctcg	aagaggcata	aattccgta	gccagtttag	tctgaccatc	tcatctgtaa	5640
	catcattggc	aacgctacct	ttgccatgtt	tcagaaacaa	ctctggcgca	tccggcttcc	5700
	catacaagcg	atagattgtc	gcacctgatt	gcccagactt	atcgcgagcc	catttatacc	5760
	catataaatc	agcatccatg	ttggaattta	atcgcggcct	cgacgtttcc	cgttgaatat	5820
	ggctcataac	acccttggta	ttactgttta	tgtaagcaga	cagttttatt	gttcatgatg	5880
	atatatTTTT	atcttgtgca	atgtaacatc	agagattttg	agacac		5926

<210>	49		
<211>	926		
<212>	DNA		
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工序列的描述: 合成的左HR臂_CD8产物2		
<400>	49		
acattaaaa	cacaaaatcc	tacggaaata	ctgaagaatg agtctcagca ctaaggaaaa 60
gcctccagca	gctcctgctt	tctgagggtg	aaggatagac gctgtggctc tgcatgactc 120
actagcactc	tatcacggcc	atattctggc	agggtcagtg gctccaacta acatttgttt 180
ggtactttac	agttttattaa	atagatgttt	atatggagaa gctctcattt ctttctcaga 240
agagcctggc	taggaaggtg	gatgaggcac	catattcatt ttgcaggtga aattcctgag 300
atgtaaggag	ctgctgtgac	ttgctcaagg	ccttatatcg agtaaaccgt agtgctgggg 360
cttagacgca	ggtgttctga	tttatagttc	aaaacctcta tcaatgagag agcaatctcc 420
ttgtaatgtg	atagatttcc	caacttaatg	ccaacatacc ataaacctc cattctgcta 480
atgcccagcc	taagttgggg	agaccactcc	agattccaag atgtacagtt tgctttgctg 540
ggccttttcc	ccatgcctgc	ctttactctg	ccagagttat attgctgggg ttttgagaa 600
gatcctatta	aataaaagaa	taagcagtat	tattaagtag ccctgcattt caggtttctt 660
tgagtggcag	gccaggcctg	gccgtgaacg	ttcactgaaa tcatggcctc ttggccaaga 720
ttgatagctt	gtgcctgtcc	ctgagtccca	gtccatcacg agcagctggt ttctaagatg 780
ctatttccc	tataaagcat	gagaccgtga	cttgccagcc ccacagagcc ccgccttgt 840
ccatcactgg	catctggact	ccagcctggg	ttggggcaaa gagggaaatg agatcatgtc 900
ctaaccctga	tectcttgtc	ccacag	926
<210>	50		
<211>	74		
<212>	DNA		
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
<220>			
[0016] <223>	人工序列的描述: 合成的TRAC CDS_CD8产物2		
<400>	50		
atatccagaa	ccctgaccct	gccgtgtacc	agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt 60
ctgtctgctt	attc		74
<210>	51		
<211>	15		
<212>	DNA		
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工序列的描述: 合成的GSG接头_CD8产物2		
<400>	51		
gaattcgget	ccgga		15
<210>	52		
<211>	57		
<212>	DNA		
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工序列的描述: 合成的P2A_CD8产物2		
<400>	52		
gccactaact	tcagcctggt	gaagcaggcc	ggcgacgttg aggaaaacct cggtcct 57
<210>	53		
<211>	63		
<212>	DNA		
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工序列的描述: 合成的CD8A信号肽_CD8产物2		
<400>	53		
atggccttac	cagtgaccgc	cttgetcctg	ccgctggcct tgctgetcca cgccgccagg 60
ccg			63

<210>	54	
<211>	483	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的CD8A细胞外结构域_CD8产物2	
<400>	54	
agccagttcc	gggtgtcgcc	gctggatcgg acctggaacc tggcgagac agtggagctg 60
aagtgccagg	tgtgtctgtc	caaccgacg tgggctgct cgtggctctt ccagccgcgc 120
ggcgccgccc	ccagtccac	cttctccta tacctctccc aaaacaagcc caaggcggcc 180
gaggggctgg	acaccagcg	gttctcgggc aagaggttgg gggacacctt cgtcctcacc 240
ctgagcgaact	tccgccgaga	gaacgagggc tactatttct gctcggccct gagcaactcc 300
atcatgtact	tcagccactt	cgtgccggtc ttctgccag cgaagccac cagcagcca 360
gcgccgcgac	caccaacacc	ggcgcccacc atcgcgtgc agcccctgtc cctgcgcca 420
gaggcgtgcc	ggccagcggc	ggggggcgca gtgcacaga gggggctgga cttgcctgt 480
gat		483
<210>	55	
<211>	63	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的CD8A跨膜结构域_CD8产物2	
<400>	55	
atctacatct	ggcgccctt	ggccgggact tgtgggtcc ttctctgtc actggttacc 60
acc		63
<210>	56	
<211>	96	
<212>	DNA	
[0017] <213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的CD8A细胞内结构域_CD8产物2	
<400>	56	
ctttactgca	accacaggaa	ccgaagacgt gtttgcaaat gtccccggcc tgttgtcaaa 60
tcgggagaca	agcccagcct	ttcggcgaga tacgtc 96
<210>	57	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的弗林蛋白酶切割位点_CD8产物2	
<400>	57	
agagcaaagc	gg	12
<210>	58	
<211>	9	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的GSG接头_CD8产物2	
<400>	58	
ggctccgga		9
<210>	59	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的P2A_CD8产物2	
<400>	59	

	gctaccaatt ttagectcct gaagcaggct ggcgatgttg aggaaaaccc tgggcc	57
	<210> 60	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8B信号肽_CD8产物2	
	<400> 60	
	atgcggccgc ggctgtggct cctcttgcc gcgcagctga cagttctcca tggcaactca	60
	gtc	63
	<210> 61	
	<211> 447	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8B细胞外结构域_CD8产物2	
	<400> 61	
	ctccagcaga cccctgcata cataaaggctg caaaccaaca agatggatgat gctgtcctgc	60
	gaggctaaaa tctccctcag taacatgcgc atctactggc tgagacagcg ccaggcaccg	120
	agcagtgaca gtcaccacga gttcctggcc ctctgggatt ccgcaaaagg gactatccac	180
	ggtgaagagg tggacagga gaagatagct gtgtttcggg atgcaagccg gttcattctc	240
	aatctcacia gcgtgaagcc ggaagacagt ggcattact tctgcatgat cgtcgggagc	300
	cccagctga ccttcgggaa gggaaactcag ctgagtgtgg ttgatttct tcccaccact	360
	gccagccca ccaagaagtc caccctcaag aagagagtgt gccggttacc caggccagag	420
	accagaagg gcccactttg tagcccc	447
	<210> 62	
	<211> 63	
	<212> DNA	
[0018]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8B跨膜结构域_CD8产物2	
	<400> 62	
	atcacccttg gectgctggt ggctggcgtc ctggttctgc tggtttcct gggagtggcc	60
	atc	63
	<210> 63	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8B 细胞内结构域_CD8产物2	
	<400> 63	
	cacctgtgct gccggcggag gagagcccgg cttcgtttca tgaacaatt ttacaaa	57
	<210> 64	
	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的弗林蛋白酶切割位点_CD8产物2	
	<400> 64	
	agggctaaac gg	12
	<210> 65	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的GSG 接头_CD8产物2	
	<400> 65	

	gaattcggct ccgga	15
	<210> 66	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的P2A_CD8产物2	
	<400> 66	
	gccactaact tctccctggt gaaacaggct ggcgatgttg aagaaaaccc cggctct	57
	<210> 67	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的HGH/SS/2_CD8产物2	
	<400> 67	
	atggccaccg gctctagaac aagcctgctg ctcgcttttg gcctgctctg cctcccatgg	60
	ctccaagaag gatctgct	78
	<210> 68	
	<211> 345	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的示例性 TRB_VDJ (TCR097)_CD8 产物 2	
	<400> 68	
	aatgctggtg tcaactcagac cccaaaattc cgcatectga agataggaca gagcatgaca	60
	ctgcagtgtg cccaggatat gaaccataac tacatgtact ggtatcgaca agaccaggc	120
	atggggctga agctgattta ttattcagtt ggtgctggtg tcaactgataa aggagaagtc	180
[0019]	ccgaatgctt acaacgtctc cagatcaacc acagaggatt tcccgtcag gctggagttg	240
	gctgctccct cccagacatc tgtgtacttc tgtgccagct ccctacaggt tccctacaat	300
	gagcattct tccggccagg gacacggctc accgtgctag aggac	345
	<210> 69	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的TCR-β /恒定_CD8 产物 2	
	<400> 69	
	ctgaaaaacg tgttccctcc aaaagtggcc gtgttcgagc cttctgaggc cgagatcagc	60
	cacacacaga aagccacact cgtgtgtctg gctaccggt tctaccccga tcacgtggaa	120
	ctgtcttggg gggtaacagg caaagagggt cacagcggcg tcagcacaga tccccagcct	180
	ctgaaagaac agcccgtctt gaacgacagc cgctactgcc tgtctagcag actgagagtg	240
	tccgccacct tctggcagaa ccccagaaac cacttcagat gccaggcca gttctacggc	300
	ctgagcgaga acgatgagtg gaccaggac agagccaagc ctgtgacaca gatcgtgtct	360
	gccgaagcct ggggcagagc cgattgtggc tttaccagcg agtcatacca gcagggcgtg	420
	ctgtctgcca ccatcctgta tgagatcctg ctcggcaagg ccacactgta cgctgtgctg	480
	gtgtctgctc tgggtctgat ggctatggc tcccgggagc gcatccccga ggcc	534
	<210> 70	
	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的弗林蛋白酶切割位点_CD8产物2	
	<400> 70	
	cgggccaagc gg	12
	<210> 71	
	<211> 9	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的GSG 接头_CD8产物2	
	<400> 71	
	ggcagcggc	9
	<210> 72	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的P2A_CD8产物2	
	<400> 72	
	gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc ggcgacgtgg aggagaaccc cggcct	57
	<210> 73	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的HGH/SS_CD8产物2	
	<400> 73	
	atggccacag gcagcagaac atctctgctg ctggccttcg gactgctgtg tctgccttgg	60
	ctgcaagagg gttccgcc	78
	<210> 74	
	<211> 337	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
[0020]	<223> 人工序列的描述: 合成的示例性 TRA-VDJ (TCR097)_CD8产物2	
	<400> 74	
	gctcagacg tcaactcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gaccgtgacc	60
	ctgagctgca catatgacac cagtgagagt gattattatt tattctggta caagcagcct	120
	cccagcagge agatgattct cgttattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaaca	180
	gagaatcgtt tctctgtgaa ctccagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca	240
	gactcacagc tgggggatgc cgcgatgtat ttctgtgctt ttgggaactt caacaaattt	300
	tactttggat ctgggaccaa actcaatgta aaaccaa	337
	<210> 75	
	<211> 74	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的TCR- α /恒定_CD8产物2	
	<400> 75	
	atattcagaa ccccgatcct gctgtgtatc agctgcgcga cagcaagagc agcgacaaga	60
	gcgtgtgttt gtte	74
	<210> 76	
	<211> 200	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的TRAC CDS/右HR臂_CD8产物2	
	<400> 76	
	accgattttg attctcaaac aatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca	60
	gacaaaactg tgctagacat gaggctctatg gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg	120
	agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac	180
	acctttcttc ccagcccagg	200
	<210> 77	

<211>	800								
<212>	DNA								
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)								
<220>									
<223>	人工序列的描述: 合成的右HR臂_CD8产物2								
<400>	77								
	taagggcagc	tttggcct	tcgcaggctg	tttccttgc	tcaggaatgg	ccaggttctg		60	
	cccagagctc	tggcaatga	tgtctaaac	tcctctgatt	ggtggctctc	gccttatcca		120	
	ttgccaccaa	aacctcttt	ttactaagaa	acagtgagcc	ttgttctggc	agtccagaga		180	
	atgacacggg	aaaaaagcag	atgaagagaa	ggtggcagga	gagggcacgt	ggcccagcct		240	
	cagtctctcc	aactgagttc	ctgctgcct	gcctttgctc	agactgtttg	ccccttactg		300	
	ctcttctagg	cctcattcta	agccccttct	ccaagttgcc	tctccttatt	tctccctgtc		360	
	tgccaaaaaa	tctttcccag	ctactaagt	cagtctcacg	cagtcactca	ttaaccacc		420	
	aatcactgat	tgtgccggca	catgaatgca	ccaggtgttg	aagtggagga	attaaaaagt		480	
	catagtaggg	gtgtgcccag	aggaagcacc	attctagtgtg	ggggagccca	tctgtcagct		540	
	gggaaaagtc	caaataactt	cagattggaa	tgtgttttaa	ctcagggttg	agaaaacagc		600	
	taccttcagg	acaaaagtca	gggaaggcct	ctctgaagaa	atgctacttg	aagataccag		660	
	ccctaccaag	ggcagggaga	ggacctata	gaggcctggg	acaggagctc	aatgagaaag		720	
	gagaagagca	gcaggcatga	gttgaatgaa	ggaggcaggg	ccgggtcaca	gggccttcta		780	
	ggccatgaga	gggtagacag						800	
<210>	78								
<211>	6								
<212>	DNA								
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)								
<220>									
<223>	人工序列的描述: 合成的人工序列_CD8 产物 2								
<400>	78								
	gctagc							6	
[0021]	<210>	79							
	<211>	620							
	<212>	DNA							
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)							
	<220>								
	<223>	人工序列的描述: 合成的pBR322_起点_CD8产物2							
	<400>	79							
	cgcgttgctg	gcgtttttcc	ataggctccg	ccccctgac	gagcatcaca	aaaatcgacg		60	
	ctcaagtcag	aggtggcgaa	accgacagg	actataaaga	taccagcgt	ttccccctgg		120	
	aagctccctc	gtgcgctctc	ctgttccgac	cctgccgctt	accggatacc	tgctccgctt		180	
	tctcccttcg	ggaagcgtgg	cgtttctca	tagctcacgc	tgtaggtatc	tcagttcgg		240	
	gtaggtcgtt	cgctccaagc	tgggctgtgt	gcacgaacc	cccgttcagc	ccgaccctg		300	
	cgcttatec	ggtaactatc	gtcttgagtc	caaccggta	agacacgact	tatgccact		360	
	ggcagcagcc	actggtaaca	ggattagcag	agcgaggtat	gtaggcggtg	ctacagagtt		420	
	cttgaagtgg	tggcctaact	acggctacac	tagaagaaca	gtatttggtg	tctgcgctct		480	
	gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	tggtagctct	tgatccggca	aacaaaccac		540	
	cgctggtagc	ggtggttttt	ttgttgcaa	gcagcagatt	acgcgcagaa	aaaaaggatc		600	
	tcaagaagat	cctttgatct						620	
<210>	80								
<211>	810								
<212>	DNA								
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)								
<220>									
<223>	人工序列的描述: 合成的卡那霉素抗性(KanR2) _CD8 产物 2								
<400>	80								
	ttagaaaaac	tcatcgagca	tcaaatgaaa	ctgcaattta	ttcatatcag	gattatcaat		60	
	accatatttt	tgaaaaagcc	gtttctgtaa	tgaaggagaa	aactcaccga	ggcagttcca		120	
	taggatggca	agatcctggt	atcggtctgc	gattccgact	cgccaacat	caatacaacc		180	
	tattaatttc	ccctcgtcaa	aaataaggtt	atcaagttag	aatcaccat	gagtgcagac		240	

tgaatccggt	gagaatggca	aaagtttatg	catttctttc	cagacttggt	caacaggcca	300	
gccattacgc	tcgtcatcaa	aatcactcgc	atcaaccaaa	ccgttattca	ttcgtgattg	360	
cgcctgagcc	agacgaaata	cgcgatcgc	gttaaaagga	caattacaaa	caggaatcga	420	
atgcaaccgg	cgcaggaaca	ctgccagcgc	atcaacaata	ttttcacctg	aatcaggata	480	
ttctttcta	acctggaatg	ctgtttttcc	ggggatcgca	gtggtgagta	accatgcatc	540	
atcaggagta	cggataaaat	gcttgatggt	cggaagaggc	ataaattccg	tcagccagtt	600	
tagtctgacc	atctcatctg	taacatcatt	ggcaacgcta	cctttgccat	gtttcagaaa	660	
caactctggc	gcategggct	tcccatacaa	gcgatagatt	gtcgcacctg	attgcccgc	720	
attatcgcca	gccattttat	acccatataa	atcagcatcc	atggttgaat	ttaatcgcgg	780	
cctcgacggt	tcccgttgaa	tatggctcat				810	
<210>	81						
<211>	99						
<212>	DNA						
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)						
<220>							
<223>	人工序列的描述: 合成的卡那霉素启动子_CD8产物2						
<400>	81						
aacacccctt	gtattactgt	ttatgtaagc	agacagtttt	attgttcatg	atgatataatt	60	
tttatcttgt	gcaatgtaac	atcagagatt	ttgagacac			99	
<210>	82						
<211>	6634						
<212>	DNA						
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)						
<220>							
<223>	人工序列的描述: 合成的完整的CD8产物2构建体, 具有TCR97插入_CD8产物2						
<400>	82						
[0022]	ggtaccacat	taaaaacaca	aaatcctacg	gaaatactga	agaatgagtc	tcagcactaa	60
	ggaaaagcct	ccagcagctc	ctgctttctg	agggtgaagg	atagacgctg	tggtctgca	120
	tgactcacta	gcactctatc	acggccatat	tctggcaggg	tcagtggctc	caactaacat	180
	ttgtttggta	ctttacagtt	tattaaatag	atgtttatat	ggagaagctc	tcatttcttt	240
	ctcagaagag	cctggctagg	aaggtggatg	aggcaccata	ttcattttgc	aggtgaaatt	300
	cctgagatgt	aaggagctgc	tgtgacttgc	tcaaggcctt	atatacgagta	aacggtagtg	360
	ctggggctta	gacgcaggtg	ttctgattta	tagttcaaaa	cctctatcaa	tgagagagca	420
	atctcctggt	aatgtgatag	atttcccaac	ttaatgcaa	cataccataa	acctcccatt	480
	ctgctaatagc	ccagcctaag	ttggggagac	cactccagat	tccaagatgt	acagtttgc	540
	ttgctgggccc	tttttcccat	gcctgctttt	actctgccag	agttatattg	ctggggtttt	600
	gaagaagatc	ctattaaata	aaagaataag	cagtattatt	aagtagccct	gcatttcagg	660
	tttccttgag	tggcaggcca	ggcctggccg	tgaacgttca	ctgaaatcat	ggcctcttgg	720
	ccaagattga	tagcttgtgc	ctgtccctga	gtcccagtec	atcacgagca	gctggtttct	780
	aagatgctat	ttcccgtata	aagcatgaga	ccgtgacttg	ccagcccccac	agagcccccgc	840
	ccttgctccat	cactggcctc	tggactccag	cctgggttgg	ggcaaagagg	gaaatgagat	900
	catgtcctaa	ccctgatcct	cttgtcccac	agatatccag	aaccctgacc	ctgccgtgta	960
	ccagctgaga	gactctaaat	ccagtgacaa	gtctgtctgc	ctattcgaat	tcggctccgg	1020
	agccaactaac	ttcagcctgt	tgaagcagge	cggcgacggt	gaggaaaacc	ccggtcctat	1080
	ggccttacca	gtgaccgcct	tgtcctgccc	gctggccttg	ctgctccacg	ccgccaggcc	1140
	gagccagttc	cgggtgtcgc	cgctggatcg	gacctggaac	ctgggcgaga	cagtggagct	1200
	gaagtgccag	gtgctgctgt	ccaaccgcac	gtcgggctgc	tcgtggctct	tccagccgcg	1260
	cggcgccgcc	gccagtccca	ccttctcctc	atacctctcc	caaaacaagc	ccaaggcggc	1320
	cgaggggctg	gacacccagc	ggttctcggg	caagaggttg	ggggacacct	tcgtctctac	1380
	cctgagcgac	ttccgccgag	agaacgaggg	ctactatttc	tgctcggccc	tgagcaactc	1440
	catcatgtac	ttcagccact	tcgtgccggt	cttctgcca	gcgaagccca	ccacgacgcc	1500
	agcgccgcga	ccaccaacac	cggcgcccac	catcgcgtcg	cagcccctgt	ccctgcgccc	1560
	agaggcgtgc	cggccagcgg	cggggggcgc	agtgcacacg	agggggtg	acttcgctg	1620
	tgatatctac	atctgggcgc	ccttggccgg	gacttgtggg	gtccttctcc	tgctactggt	1680
	tatcacctt	tactgcaacc	acaggaaccg	aagacgtggt	tgcaaatgtc	cccggcctgt	1740
	ggtcaaatcg	ggagacaagc	ccagccttcc	ggcgagatac	gtcagagcaa	agcggggctc	1800

	cggagctacc	aatTTtagcc	tctgaagca	ggctggcgat	gttgaggaaa	accctggtcc	1860
	catgcggccg	cgctgtggc	tctcttggc	cgcgagctg	acagttctcc	atggcaacte	1920
	agtcctccag	cagaccctg	catacataaa	ggtgcaaacc	aacaagatgg	tgatgctgtc	1980
	ctgcgaggct	aaaatctccc	tcagtaacat	gcgcatctac	tggtgagac	agcggccaggc	2040
	accgagcagt	gacagtcacc	acgagttcct	ggcctctg	gattccgcaa	aagggactat	2100
	ccacggtgaa	gaggtggaac	aggagaagat	agctgtgttt	cgggatgcaa	gccggttcat	2160
	tctcaatctc	acaagcgtga	agccggaaga	cagtggcctc	tacttctgca	tgatcgtcgg	2220
	gagcccccag	ctgaccttcg	ggaagggaac	tcagctgagt	gtggttgatt	tccttcccac	2280
	cactgcccag	cccaccaaga	agtccaccct	caagaagaga	gtgtgccggt	taccagggcc	2340
	agagaccag	aagggccac	ttttagccc	catcaccctt	ggcctgctgg	tggtggcgt	2400
	cctggttctg	ctggtttccc	tgggagtggc	catccacctg	tgctgccggc	ggaggagagc	2460
	ccggcttctg	ttcatgaaac	aatTTtaca	aagggctaaa	cgggaattcg	gctccggagc	2520
	caactaactc	tccctgttga	aacagctgg	cgatgttgaa	gaaaaccccg	gtcctatggc	2580
	caccggetct	agaacaagcc	tgtgtctcgc	ttttggcctg	ctctgectcc	catggtcca	2640
	agaaggatct	gctaagtctg	gtgtcactca	gaccccaaaa	ttccgcatcc	tgaagatagg	2700
	acagagcatg	acactgcagt	gtaccagga	tatgaacct	aactacatgt	actggtatcg	2760
	acaagacca	ggcatggggc	tgaagctgat	ttattattca	gttgggtctg	gtatcactga	2820
	taaaggagaa	gtcccgaatg	gctacaacgt	ctccagatca	accacagagg	atttcccgct	2880
	caggctggag	ttggctgctc	cctcccagac	atctgtgtac	ttctgtgcca	gctccctaca	2940
	ggttccctac	aatgagcagt	tcttcggggc	agggacacgg	ctcaccgtgc	tagaggacct	3000
	gaaaaacgtg	ttccctccaa	aagtggccgt	gttcgagcct	tctgaggccg	agatcagcca	3060
	cacacagaaa	gccacactcg	tgtgtctggc	taccggcttc	taccccgatc	acgtggaact	3120
	gtcttggtgg	gtcaacggca	aagaggtgca	cagcggcgtc	agcacagatc	cccagcctct	3180
	gaaagaacag	cccgtcttga	acgacagccg	ctactgcctg	tctagcagac	tgagagtgtc	3240
	cgccaccttc	tggcagaacc	ccagaaacca	cttcagatgc	caggtccagt	tctacggcct	3300
	gagcgagaac	gatgagtgga	cccaggacag	agccaagcct	gtgacacaga	tcgtgtctgc	3360
	cgaagcctgg	ggcagagccg	attgtggctt	taccagcgag	tcataccagc	agggcgtgct	3420
[0023]	gtctgccacc	atcctgtatg	agatcctgct	cggcaaggcc	acactgtacg	ctgtgctggt	3480
	gtctgctctg	gtgctgatgg	ctatggtctc	ccgggagcgc	atccccgagg	cccgggccaa	3540
	gccccggcag	ggcgccacca	acttcagcct	gctgaagcag	gccggcgacg	tgaggagaaa	3600
	ccccggcctt	atggccacag	gcagcagaac	atctctgctg	ctggccttcg	gactgctgtg	3660
	tctgccttgg	ctgcaagagg	gttccgccgc	tcagacagtc	actcagtctc	aaccagagat	3720
	gtctgtgcag	gaggcagaga	ccgtgaccct	gagctgcaca	tatgacacca	gtgagagtga	3780
	ttattattta	ttctggtaca	agcagcctcc	cagcaggcag	atgattctcg	ttattcgcca	3840
	agaagcttat	aagcaacaga	atgcaacaga	gaatcgtttc	tctgtgaact	tccagaaaagc	3900
	agccaaatcc	ttcagtctca	agatctcaga	ctcacagctg	ggggatgccg	cgatgtattt	3960
	ctgtgctttt	gggaacttca	acaaatttta	ctttggatct	gggaccaaac	tcaatgtaaa	4020
	accaaattat	cagaaccccg	atcctgctgt	gtatcagctg	cgcgacagca	agagcagcga	4080
	caagagcgtg	tgTTTTgttca	ccgattttga	ttctcaaaaa	aatgtgtcac	aaagtaagga	4140
	ttctgatgtg	tatatcacag	acaaaactgt	gctagacatg	aggtctatgg	acttcaagag	4200
	caacagtget	gtggcctgga	gcaacaaatc	tgactttgca	tgtgcaaacg	ccttcaacaa	4260
	cagcattatt	ccagaagaca	ccttcttccc	cagcccaggt	aagggcagct	ttggtgcctt	4320
	cgcaggetgt	ttccttgctt	caggaatggc	caggttctgc	ccagagctct	ggtcaatgat	4380
	gtctaaaact	cctctgattg	gtggtctcgg	ccttatccat	tgccacaaa	acctctttt	4440
	tactaagaaa	cagtgagcct	tgttctggca	gtccagagaa	tgacacggga	aaaaagcaga	4500
	tgaagagaag	gtggcaggag	agggcacgtg	gcccagcctc	agtctctcca	actgagttcc	4560
	tgectgectg	cctttgctca	gactgtttgc	cccttactgc	tcttctaggc	ctcattctaa	4620
	gcccccttctc	caagttgect	ctccttattt	ctcctgtctc	gccccaaaaat	ccttcccagc	4680
	tcactaagtc	agtctcacgc	agtcactcat	taaccaccca	atcactgatt	gtgccggcac	4740
	atgaatgcac	caggtgttga	agtggaggaa	ttaaaaagtc	agatgagggg	tgtgcccaga	4800
	ggaagcacca	ttctagttgg	gggagcccat	ctgtcagctg	ggaaaagtcc	aaataacttc	4860
	agattggaat	gtgttttaac	tcagggttga	gaaaacagct	accttcagga	caaaagtccg	4920
	ggaagggctc	tctgaagaaa	tgtacttga	agataccagc	cctaccaagg	gcagggagag	4980
	gaccctatag	aggcctggga	caggagctca	atgagaaagg	agaagagcag	caggcatgag	5040
	ttgaatgaag	gaggcagggc	cggttcacag	ggccttctag	gccatgagag	ggtagacagg	5100
	ctagccgcgt	tgttgcgctt	tttccatagg	ctccgcccc	ctgacgagca	tcacaaaaat	5160
	cgacgctcaa	gtcagaggtg	gcgaaacccg	acaggactat	aaagatacca	ggcgttccc	5220

	cctggaagct	ccctcgtgcg	ctctcctggt	cgaccctgc	cgcttaccgg	atacctgtcc	5280
	gcctttctcc	cttcgggaag	cgtagcgctt	tctcatagct	cacgctgtag	gtatctcagt	5340
	tcgggtgtagg	tcgttcgctc	caagctgggc	tgtgtgcacg	aacccccctg	tcageccgac	5400
	cgctgcgect	tatccggtaa	ctatcgtctt	gagtccaacc	cggtaagaca	cgacttatcg	5460
	ccactggcag	cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	ggtagtagg	cggtgtctaca	5520
	gagttcttga	agtggtagcc	taactacggc	tacactagaa	gaacagtatt	tggtagctgc	5580
	gctctgctga	agccagttac	cttcggaaaa	agagttggta	gctcttgatc	cggcaaaaaa	5640
	accaccgctg	gtagcggtag	ttttttggtt	tgcaagcagc	agattacgcg	cagaaaaaaa	5700
	ggatctcaag	aagatccttt	gatctttaga	aaaactcatc	gagcatcaaa	tgaactgca	5760
	atattattcat	atcaggatta	tcaataccat	atTTTTGAAA	aagccgtttc	tgtaatgaag	5820
	gagaaaaactc	accgaggcag	ttccatagga	tggcaagatc	ctggtatcgg	tctgcgattc	5880
	cgactcgtcc	aacatcaata	caacctatta	atttccctc	gtcaaaaaata	aggttatcaa	5940
	gtgagaaatc	accatgagtg	acgactgaat	ccggtgagaa	tggcaaaagt	ttatgcattt	6000
	ctttccagac	ttgttcaaca	ggccagccat	tacgctcgtc	atcaaaatca	ctcgcataca	6060
	ccaaaccggt	atcattcgtt	gattgcgctt	gagccagacg	aaatacgcga	tcgctgttaa	6120
	aaggacaatt	acaaacagga	atcgaatgca	accggcgcag	gaacactgcc	agcgcataca	6180
	caatattttc	acctgaatca	ggatattctt	ctaatacctg	gaatgctgtt	tttccgggga	6240
	tcgcagtgggt	gagtaacat	gcatactcag	gagtagcggat	aaaatgcttg	atggctggaa	6300
	gaggcataaaa	ttccgtcagc	cagtttagtc	tgaccatctc	atctgtaaca	tcattggcaa	6360
	cgctaccctt	gccatgtttc	agaaacaact	ctggcgcctc	gggcttccca	tacaagcgat	6420
	agattgtcgc	acctgattgc	ccgacattat	cgcgagccca	tttataccca	tataaatcag	6480
	catccatggt	ggaatttaat	cgcggcctcg	acgtttcccg	ttgaatatgg	ctcataaacac	6540
	cccttgatt	actgtttatg	taagcagaca	gTTTTATTGT	tcatgatgat	atatttttat	6600
	cttgtgcaat	gtaacatcag	agattttgag	acac			6634
	<210>	83					
	<211>	926					
	<212>	DNA					
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)					
[0024]	<220>						
	<223>	人工序列的描述: 合成的左HR臂_CD8产物3					
	<400>	83					
	acattaaaaa	cacaaaatcc	tacggaaata	ctgaagaatg	agtctcagca	ctaaggaaaa	60
	gcctccagca	gctcctgctt	tctgagggtg	aaggatagac	gctgtggctc	tgcatactc	120
	actagcactc	tatcacggcc	atattctggc	agggtcagtg	gctccaacta	acatttgitt	180
	ggtactttac	agttttattaa	atagatgitt	atatggagaa	gctctcattt	ctttctcaga	240
	agagcctggc	taggaaggtg	gatgaggcac	catattcatt	ttgcagggtg	aattcctgag	300
	atgtaaggag	ctgctgtgac	ttgctcaagg	ccttatatcg	agtaaaccgt	agtgcctggg	360
	cttagacgca	ggtgttctga	tttatagttc	aaaacctcta	tcaatgagag	agcaatctcc	420
	tggtaatgtg	atagattttc	caacttaatg	ccaacatacc	ataaacctcc	cattctgcta	480
	atgcccagcc	taagttgggg	agaccactcc	agattccaag	atgtacagtt	tgctttgctg	540
	ggcctttttc	ccatgcctgc	ctttactctg	ccagagttat	attgctgggg	tttgaagaa	600
	gatectatta	aataaaaagaa	taagcagtat	tattaagtag	ccctgcattt	caggtttcct	660
	tgagtggcag	gccaggcctg	gccgtgaacg	ttcactgaaa	tcatggcctc	ttggccaaga	720
	ttgatagett	gtgectgtcc	ctgagtccca	gtccatcacg	agcagctggt	ttctaagatt	780
	ctatttcccg	tataaagcat	gagaccgtga	cttgccagcc	ccacagagcc	ccgcccttgt	840
	ccatcactgg	catctggact	ccagcctggg	ttggggcaaa	gagggaatg	agatcatgtc	900
	ctaaccctga	tcctcttctg	ccacag				926
	<210>	84					
	<211>	74					
	<212>	DNA					
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)					
	<220>						
	<223>	人工序列的描述: 合成的TRAC (部分同源臂)_CD8 产物 3					
	<400>	84					
	atatccagaa	ccctgaccct	gccgtgtacc	agctgagaga	ctctaaatcc	agtgacaagt	60
	ctgtctgect	attc					74
	<210>	85					

	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的GSG 接头_CD8产物3	
	<400> 85	
	gaattcggct ccgga	15
	<210> 86	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的	
	P2A_CD8 产物 3	
	<400> 86	
	gccactaact tcagcctggt gaagcaggcc ggcgacgttg aggaaaaccc cgttcct	57
	<210> 87	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8A信号肽_CD8 产物 3	
	<400> 87	
	atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
	ccg	63
	<210> 88	
	<211> 483	
	<212> DNA	
[0025]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8A 细胞外结构域_CD8产物3	
	<400> 88	
	agccagttcc ggggtgtgcc gctggatcgg acctggaacc tgggcgagac agtggagctg	60
	aagtgccagg tgctgctgtc caaccgacg tgggctgct cgtggctctt ccagccgcgc	120
	ggcgccgcc ccagtcccac ctctctcta tacctctccc aaaacaagcc caaggcggcc	180
	gaggggctgg acaccagcg gttctcggc aagaggttg gggacacctt cgtctcacc	240
	ctgagcgact tccgccgaga gaacagggc tactatttct gctcggcct gagcaactcc	300
	atcatgtact tcagccactt cgtgccggtc ttctgccag cgaagccac cacgaccca	360
	gcgccgcgac caccaacacc ggcgccacc atcgcgtcgc agcccctgtc cctgcgcca	420
	gagcgtgcc ggccagcggc gggggcgca gtgcacacga ggggctgga cttegcctgt	480
	gat	483
	<210> 89	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8A跨膜结构域_CD8产物3	
	<400> 89	
	atctacatct gggcgcctt ggccgggact tgtgggtcc ttctctgtc actggttatc	60
	acc	63
	<210> 90	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8B细胞内结构域_CD8产物 3	
	<400> 90	

	cacctgtgct gccggcggag gagagcccgg cttcgtttca tgaacaatt ttacaaa	57
	<210> 91	
	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的弗林蛋白酶切割位点_CD8产物3	
	<400> 91	
	agggctaaac gg	12
	<210> 92	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的GSG 接头_CD8产物3	
	<400> 92	
	gaattcggct ccgga	15
	<210> 93	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的P2A_CD8产物3	
	<400> 93	
	gccactaact tctccctggt gaaacaggct ggcgatgttg aagaaaaccc cggtcct	57
	<210> 94	
	<211> 78	
	<212> DNA	
[0026]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的HGH/SS/2_CD8产物3	
	<400> 94	
	atggccaccg gctctagaac aagcctgctg ctcgcttttg gcctgctctg cctcccatgg	60
	ctccaagaag gatctgct	78
	<210> 95	
	<211> 345	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的TRB_VDJ (TCR097)_CD8产物3	
	<400> 95	
	aatgctggtg tcaactcagac ccaaaaattc cgcatectga agataggaca gagcatgaca	60
	ctgcagtga cccaggatat gaaccataac tacatgtact ggtatcgaca agaccaggc	120
	atggggctga agctgattta ttattcagtt ggtgctgta tcaactgataa aggagaagtc	180
	ccgaatggct acaacgtctc cagatcaacc acagaggatt tcccgtcag gctggagttg	240
	gctgctcct cccagacatc tgtgtacttc tgtgccagct ccctacaggt tcctacaat	300
	gagcagttct tcgggccagg gacacggctc accgtgctag aggac	345
	<210> 96	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的TCR-β /恒定_CD8产物3	
	<400> 96	
	ctgaaaaacg tgttcctcc aaaagtggcc gtgttcgagc cttctgaggc cgagatcagc	60
	cacacacaga aagccacact cgtgtgtctg gctaccggt tctaccccga tcacgtggaa	120
	ctgtcttggg gggctcaacgg caaagaggtg cacagcggcg tcagcacaga tccccagcct	180

	ctgaaagaac agccccgctct gaacgacagc cgctactgcc tgtctagcag actgagagtg	240
	tccgccacct tctggcagaa ccccagaaac cacttcagat gccaggtcca gttctacggc	300
	ctgagcgaga acgatgagtg gaccagggac agageccaagc ctgtgacaca gatcgtgtct	360
	gccgaagcct ggggcagagc cgattgtggc tttaccagcg agtcatacca gcagggcgtg	420
	ctgtctgcca ccatcctgta tgagatcctg ctcggaagc ccacactgta cgctgtgctg	480
	gtgtctgctc tgggtctgat ggctatggc tcccgggagc gcatccccga ggcc	534
	<210> 97	
	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的弗林蛋白酶切割位点_CD8产物3	
	<400> 97	
	cgggccaagc gg	12
	<210> 98	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的GSG 接头_CD8产物3	
	<400> 98	
	ggcagcggc	9
	<210> 99	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的P2A_CD8产物3	
[0027]	<400> 99	
	gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc ggcgacgtgg aggagaacct cgccct	57
	<210> 100	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的HGH/SS_CD8产物3	
	<400> 100	
	atggccacag gcagcagaac atctctgctg ctggccttcg gactgctgtg tctgccttgg	60
	ctgcaagagg gttccgcc	78
	<210> 101	
	<211> 337	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的示例性 TRA-VDJ (TCR097)_CD8 产物 3	
	<400> 101	
	gctcagacag tcaactcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gaccgtgacc	60
	ctgagctgea catatgacac cagtgagagt gattattatt tattctggta caagcagcct	120
	cccagcaggc agatgattct cgttattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgaaca	180
	gagaatcgtt tctctgtgaa cttccagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca	240
	gactcacagc tgggggatgc cgcgatgtat ttctgtgctt ttgggaactt caacaaattt	300
	tactttggat ctgggaccaa actcaatgta aaaccaa	337
	<210> 102	
	<211> 74	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	

	<223> 人工序列的描述: 合成的TCR- α /恒定_CD8产物3	
	<400> 102	
	atattcagaa ccccgatcct gctgtgtatc agctgcgcga cagcaagagc agcgacaaga	60
	gcgtgtgttt gttc	74
	<210> 103	
	<211> 200	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的TRAC CDS/右HR臂_CD8产物3	
	<400> 103	
	accgattttg atttctcaaac aatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca	60
	gacaaaactg tgctagacat gaggtctatg gacttcaaga gcaacagtgct tgtggcctgg	120
	agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac	180
	acctttcttc ccagcccagg	200
	<210> 104	
	<211> 800	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的右HR臂_CD8产物3	
	<400> 104	
	taagggcagc tttggtgcct tgcagcctg tttccttgct tcaggaatgg ccaggttctg	60
	cccagagctc tggtaaatga tgcataaac tcctctgatt ggtggtctcg gccttatcca	120
	ttgccaccaa aacctcttt ttactaagaa acagtgagcc ttgttctggc agtccagaga	180
	atgacacggg aaaaaagcag atgaagagaa ggtggcagga gagggcacgt ggcccagcct	240
	cagtctctcc aactgagttc ctgctgcct gcctttgctc agactgtttg ccccttactg	300
	ctcttctagg cctcattcta agecccttct ccaagttgct tctccttatt tctcctgtc	360
[0028]	tgccaaaaaa tctttcccag ctactaagt cagtctcac cagtcactca ttaaccacc	420
	aatcactgat tgtgccggca catgaatgca ccaggtgttg aagtggagga attaaaaagt	480
	cagatgaggg gtgtgccag aggaagcacc attctagttg ggggagccca tctgtcagct	540
	gggaaaaagtc caaataactt cagattggaa tgtgttttaa ctccaggttg agaaaacagc	600
	taccttcagg acaaaaagtc gggaaaggct ctctgaagaa atgctacttg aagataccag	660
	ccctaccaag ggcagggaga ggacctata gaggcctggg acaggagctc aatgagaaag	720
	gagaagagca gcaggcatga gttgaatgaa ggaggcaggg ccgggtcaca gggccttcta	780
	ggccatgaga gggtagacag	800
	<210> 105	
	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的人工序列_CD8产物3	
	<400> 105	
	gctagc	6
	<210> 106	
	<211> 620	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的pBR322_起点_CD8产物3	
	<400> 106	
	cgcggttgct gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg	60
	ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg	120
	aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgctccgctt	180
	tctcccttcg ggaagegtgg cgctttctca tagctcacgc ttaggtatc tcagttcgg	240
	gtaggtggtt cgctccaage tgggetgtgt gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgctg	300
	cgcttctacc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatgccact	360

```

ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcagaggtat gtaggcggtg ctacagagtt      420
cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgctct      480
gctgaagcca gttaccttgc gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac      540
cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc      600
tcaagaagat cctttgatct

```

<210> 107

<211> 810

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的卡那霉素抗性(KanR2) _CD8产物3

<400> 107

```

ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat      60
accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca      120
taggatggca agatcctggt atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc      180
tattaatttc ccctcgtcaa aaataagggt atcaagtggag aaatcaccat gagtgacgac      240
tgaatccggt gagaatggca aaagtttatg catttctttc cagacttggt caacaggcca      300
gccattacgc tcgtcatcaa aatcaactgc atcaaccaa cggttattca ttcgtgattg      360
cgctgagcc agacgaaata cgcgatcgtc gttaaaagga caattacaaa caggaatcga      420
atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata      480
ttcttctaac acctggaatg ctgttttcc ggggatcgcga gtggtgagta accatgcatc      540
atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cgggaagaggc ataaattccg tcagccagtt      600
tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgcat gtttcagaaa      660
caactctggc gcatcgggct tcccatacaa gcgatagatt gtcgcacctg attgcccgac      720
attatcgcca gcccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaa ttaatcgcgg      780
cctcgacggt tcccgttgaa tatggetcat

```

<210> 108

<211> 99

[0029]

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的卡那霉素启动子_CD8产物3

<400> 108

```

aacaccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcatg atgatatatt      60
tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt ttgagacac

```

<210> 109

<211> 5887

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的完整的CD8产物3构建体, 具有TCR97插入_CD8产物 3

<400> 109

```

ggtaccacat taaaaacaca aaatcctacg gaaatactga agaatgagtc tcagcactaa      60
ggaaaagcct ccagcagctc ctgcttctcg aggggtgaagg atagacgctg tggctctgca      120
tgactcacta gcaactctatc acggccatat tctggcaggg tcagtggctc caactaacat      180
ttgtttggta ctttacagtt tattaatatg atgtttatat ggagaagctc tcatttcttt      240
ctcagaagag cctggctagg aaggtggatg aggcaccata ttcatTTTgc aggtgaaatt      300
cctgagatgt aaggagctgc tgtgacttgc tcaaggcctt atatcgagta aacggtagtg      360
ctggggctta gacgcaggtg ttctgatTTa tagttcaaaa cctctatcaa tgagagagca      420
atctcctggt aatgtgatag atttccaac ttaatgcaa cataccataa acctccatt      480
ctgctaattc ccagcctaag ttggggagac cactccagat tccaagatgt acagtttgcT      540
ttgctgggcc tttttcccat gctgctctt actctgccag agttatattg ctggggtttt      600
gaagaagatc ctattaaata aaagaataag cagtattatt aagtagccct gcatttcagg      660
tttctttgag tggcaggcca ggccctggccg tgaacgttca ctgaaatcat ggccctcttg      720
ccaagattga tagcttgtgc ctgtccctga gtcccagtc atcacgagca gctggtttct      780
aagatgctat ttcccgtata aagcatgaga ccgtgacttg ccagccccac agagccccgc      840

```

	ccttgccat	cactggcate	tggactccag	cctgggttgg	ggcaaagagg	gaaatgagat	900
	catgtcctaa	ccctgatcct	cttgccccac	agatatccag	aaccctgacc	ctgccgtgta	960
	ccagctgaga	gactctaaat	ccagtgacaa	gtctgtctgc	ctattcgaat	tcggctccgg	1020
	agccactaac	ttcagcctgt	tgaagcagge	cggcgacgtt	gaggaaaacc	ccggctcctat	1080
	ggccttacca	gtgaccgect	tgtccttgc	gctggccttg	ctgctccacg	ccgccaggcc	1140
	gagccagttc	cggtgtctgc	cgctggatcg	gacctggaac	ctgggcgaga	cagtggagct	1200
	gaagtgccag	gtgctgtctg	ccaacccgac	gtcgggctgc	tcgtggctct	tccagccgcg	1260
	cggcgcgcc	gccagtecca	ccttctctct	atacctctcc	caaaacaagc	ccaaggcggc	1320
	cgaggggctg	gacaccagc	ggttctcggg	caagaggttg	ggggacacct	tcgtcctcac	1380
	cctgagcgac	ttccgcccag	agaacgaggg	ctactatttc	tgctcggccc	tgagcaactc	1440
	catcatgtac	ttcagccact	tcgtgccggt	ccttctgcca	gcgaagccca	ccacgacgcc	1500
	agcgcgcga	ccaccaacac	cggcgccac	catcgcgtcg	cagccccgtg	ccctgcgcc	1560
	agagcgctgc	cgccagcggg	cgggggcgc	agtgcacacg	agggggctgg	acttcgectg	1620
	tatatctac	atctgggcgc	ccttggccgg	gacttgtggg	gtccttctcc	tgctactggt	1680
	tgtaaccac	ctgtgtctgc	ggcggaggag	agccccgctt	cgtttcatga	aacaaattta	1740
	caaaaggcct	aaacgggaat	tcggctccgg	agccactaac	ttctccctgt	tgaaccaggc	1800
	tggcgatggt	gaagaaaacc	ccggtcctat	ggccaccggc	tctagaacaa	gctgtctgct	1860
	cgcttttggc	ctgctctgcc	tcccattggc	ccaagaagga	tctgctaata	ctgggtctac	1920
	tcagacccca	aaattccgca	tctgaagat	aggacagagc	atgacactgc	agtgtaacca	1980
	ggatatgaac	cataactaca	tgtactggta	tcgacaagac	ccaggcatgg	ggctgaagct	2040
	gatttattat	tcagttgggtg	ctggatcac	tgataaagga	gaagtcccga	atggctacaa	2100
	cgtctccaga	tcaaccacag	aggatttccc	gctcaggctg	gagttggctg	ctccctcca	2160
	gacatctgtg	tactttctgtg	ccagctccct	acaggttccc	tacaatgagc	agttctcgg	2220
	gccagggaca	cggtcaccg	tgctagagga	cctgaaaaac	gtgttccctc	caaaagtggc	2280
	cgtgttcgag	ccttctgagg	ccgagatcag	ccacacacag	aaagccacac	tcgtgtgtct	2340
	ggctaccggc	ttctaccccg	atcacgtgga	actgtcttgg	tgggtcaacg	gcaaagaggt	2400
	gcacagcggc	gtcagcacag	atccccagcc	tctgaaagaa	cagcccgtct	tgaacgacag	2460
[0030]	ccgctactgc	ctgtctagca	gactgagagt	gtccggcacc	ttctggcaga	accccagaaa	2520
	ccacttcaga	tgccaggtcc	agttctacgg	ctgagcagag	aacgatgagt	ggaccagga	2580
	cagagccaag	cctgtgacac	agatcgtgtc	tgccgaagcc	tggggcagag	ccgatttggg	2640
	ctttaccagc	gagtcatacc	agcagggcgt	gctgtctgcc	accatcctgt	atgagatcct	2700
	gctcggcaag	gccacactgt	acgetgtgct	ggtgtctgct	ctgggtctga	tggtatggt	2760
	ctcccgggag	cgcatccccg	aggcccgggc	caagcggggc	agcggcgcca	ccaacttcag	2820
	cctgctgaag	caggccggcg	acgtggagga	gaaccccggc	cctatggcca	caggcagcag	2880
	aacatctctg	ctgctggcct	teggactgct	gtgtctgct	tggctgcaag	agggttccgc	2940
	cgctcagaca	gtcactcagt	ctcaaccaga	gatgtctgtg	caggaggcag	agacctgac	3000
	cctgagctgc	acatatgaca	ccagtgagag	tgattattat	ttattctggt	acaagcagcc	3060
	tcccagcagg	cagatgattc	tcgttattcg	ccaagaagct	tataagcaac	agaatgcaac	3120
	agagaatcgt	ttctctgtga	acttcagaaa	agcagccaaa	tccttcagtc	teaagatctc	3180
	agactcacag	ctgggggatg	ccgcgatgta	tttctgtgct	tttgggaact	tcaacaaatt	3240
	ttactttgga	tctgggacca	aactcaatgt	aaaaccaaat	attcagaacc	ccgatcctgc	3300
	tgtgtatcag	ctgcgcgaca	gcaagagcag	cgacaagagc	gtgtgtttgt	tcaccgattt	3360
	tgattctcaa	acaaatgtgt	cacaaagtaa	ggattctgat	gtgtatatca	cagacaaaa	3420
	tgtgctagac	atgaggtcta	tggacttcaa	gagcaacagt	gctgtggcct	ggagcaacaa	3480
	atctgacttt	gcatgtgcaa	acgccttcaa	caacagcatt	attccagaag	acaccttctt	3540
	ccccagccca	ggtaagggca	gctttggtgc	cttcgcaggc	tgtttccttg	cttcaggaat	3600
	ggccaggttc	tgccagagc	tctggtcaat	gatgtctaaa	actcctctga	ttgggtgctt	3660
	cgcccttate	cattgccacc	aaaacctctt	ttttactaag	aaacagtgag	ccttgttctg	3720
	gcagtccaga	gaatgacacg	ggaaaaaagc	agatgaagag	aaggtggcag	gagagggcac	3780
	gtggcccagc	ctcagtctct	ccaactgagt	tectgcctgc	ctgcctttgc	tcagactggt	3840
	tgccccttac	tgetcttcta	ggcctcatte	taagccctt	ctccaagttg	cctctcctta	3900
	tttctccctg	tctgccaaaa	aatctttccc	agctcactaa	gtcagtctca	cgcagtact	3960
	cattaacceca	ccaatcactg	attgtgccgg	cacatgaatg	caccaggtgt	tgaagtggag	4020
	gaattaaaaa	gtcagatgag	gggtgtgccc	agaggaagca	ccattctagt	tgggggagcc	4080
	catctgtcag	ctgggaaaag	tccaaataac	ttcagattgg	aatgtgtttt	aactcagggt	4140
	tgagaaaaca	gctaccttca	ggacaaaagt	caggggaagg	ctctctgaag	aaatgctact	4200

tgaagataacc	agccctacca	agggcagggga	gaggacccta	tagaggcctg	ggacaggagc	4260
tcaatgagaa	aggagaagag	cagcaggcat	gagttgaaatg	aaggaggcag	ggccgggtca	4320
cagggccttc	taggcatga	gagggtagac	aggctagccg	cgttgctggc	gtttttccat	4380
aggctccgcc	cccctgacga	gcatacaaaa	aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaac	4440
ccgacaggac	tataaagata	ccaggcgttt	ccccctggaa	gctccctcgt	gcgctctcct	4500
gttccgacct	tgccgcttac	cggataacctg	tccgcttttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	4560
ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	aggctgcttcg	ctccaagctg	4620
ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	ccttatccgg	taactatcgt	4680
cttgagtcca	acccggtaag	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	tggtaacagg	4740
attagcagag	cgaggatgt	aggcgggtgt	acagagttct	tgaagtgggtg	gcctaaactac	4800
ggctacacta	gaagaacagt	atttggtatc	tgcgctctgc	tgaagccagt	taccttcgga	4860
aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	ctggtagcgg	tggttttttt	4920
gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	tttgatcttt	4980
agaaaaactc	atcgagcatc	aatgaaact	gcaattttat	catatcagga	ttatcaatac	5040
catatttttg	aaaaagccgt	ttctgtaatg	aaggagaaaa	ctcaccgagg	cagttccata	5100
ggatggcaag	atcctggtat	cggtctgcga	tccgactcgc	tccaacatca	atacaacctc	5160
ttaatttccc	ctcgtcaaaa	ataaggttat	caagtgagaa	atcacatga	gtgacgactg	5220
aatccgggtg	gaatggcaaa	agttttatgca	tttctttcca	gacttggttc	acaggccagc	5280
cattacgctc	gtcatcaaaa	tactcgcac	caaccaaac	gttattcatt	cggtattgcg	5340
cctgagccag	acgaaatacg	cgatcgctgt	taaaaggaca	attacaaaca	ggaatcgaat	5400
gcaaccggcg	caggaacact	gccagcgcac	caacaatatt	ttcacctgaa	tcaggatatt	5460
cttctaatac	ctggaatgct	gtttttccgg	ggatcgcatg	ggtgagtaac	catgcatcat	5520
caggagtacg	gataaaatgc	ttgatggctg	gaagaggcat	aaattccgtc	agccagttta	5580
gtctgacat	ctcatctgta	acatcattgg	caacgctacc	tttgccatgt	ttcagaaca	5640
actctggcgc	atcgggcttc	ccatacaagc	gatagattgt	cgcacctgat	tgcccacat	5700
tatcgcgagc	ccatttatac	ccatataaat	cagcatccat	gttggaattt	aatcgcgccc	5760
tcgacgtttc	ccgttgaata	tggetcataa	cacccttgt	attactgttt	atgtaagcag	5820
acagttttat	gtttcatgat	gatataat	tatcttgtgc	aatgtaacat	cagagatttt	5880
[0031]	gagacac					5887
	<210>	110				
	<211>	926				
	<212>	DNA				
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)				
	<220>					
	<223>	人工序列的描述: 合成的左HR 臂_CD8产物4				
	<400>	110				
acattaaaaa	cacaaaatcc	tacggaaata	ctgaagaatg	agtctcagca	ctaaggaaaa	60
gcctccagca	gctectgctt	tctgaggggtg	aaggatagac	gctgtggctc	tgcattgactc	120
actagcactc	tatcacggcc	atattctggc	agggctcagtg	gctccaacta	acattgttt	180
ggtaactttac	agtttattaa	atagatgttt	atatggagaa	gctctcattt	ctttctcaga	240
agagcctggc	taggaaggtg	gatgaggcac	catattcatt	ttgcagggtga	aattcctgag	300
atgtaaggag	ctgctgtgac	ttgctcaagg	ccttatatcg	agtaaaccggt	agtgcctggg	360
cttagacgca	ggtgtttctga	tttatagttc	aaaaccteta	tcaatgagag	agcaatctcc	420
tggtaatgtg	atagatttcc	caacttaatg	ccaacatacc	ataaacctcc	cattctgcta	480
atgcccagcc	taagttgggg	agaccactcc	agattccaag	atgtacagtt	tgctttgctg	540
ggcctttttc	ccatgcctgc	ctttactctg	ccagagttat	attgctgggg	tttgaagaa	600
gatectatta	aataaaagaa	taagcagtat	tattaagtag	ccctgcattt	caggtttcct	660
tgagtggcag	gccaggcctg	gccgtgaacg	ttcactgaaa	tcattggctc	ttggccaaga	720
ttgatagctt	gtgctgtcc	ctgagtccca	gtccatcacg	agcagctggt	ttctaagatg	780
ctatttccc	tataaagcat	gagaccgtga	cttgccagcc	ccacagagcc	ccgcccctgt	840
ccatcactgg	catctggact	ccagcctggg	ttggggcaaa	gagggaaatg	agatcatgtc	900
ctaaccctga	tctctttgctc	ccacag				926
	<210>	111				
	<211>	74				
	<212>	DNA				
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)				
	<220>					

	<223> 人工序列的描述: 合成的TRAC CDS_CD8产物4	
	<400> 111	
	atatccagaa ccctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt	60
	ctgtctgceet attc	74
	<210> 112	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的GSG 接头_CD8产物4	
	<400> 112	
	gaattcggct ccgga	15
	<210> 113	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的P2A_CD8产物4	
	<400> 113	
	gccactaact tcagcctggt gaagcaggcc ggcgacgttg aggaaaaccc cggctcct	57
	<210> 114	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8A信号肽_CD8产物4	
	<400> 114	
[0032]	atggcettac cagtgaccgc cttgtctctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60
	ccg	63
	<210> 115	
	<211> 483	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8A 细胞外结构域_CD8产物4	
	<400> 115	
	agccagttcc ggggtgtgcc gctggatcgg acctggaacc tggcgagac agtggagctg	60
	aagtgccagg tgctgctgtc caaccgacg tggggtgct cgtggctctt ccagccgcgc	120
	ggcgccgcc ccagtccac ctctctcta tacctctccc aaaacaagcc caaggcggcc	180
	gaggggctgg acaccagcg gttctcgggc aagaggttg gggacacctt cgtcctcacc	240
	ctgagcgact tccgccgaga gaacgagggc tactatttct gctcggccct gagcaactcc	300
	atcatgtaet tcagccactt cgtgccggtc ttctgccag cgaagccac cacgacgcca	360
	gcgccgcgac caccaacacc ggcgccacc atcgcgtgc agcccctgtc cctgcgcca	420
	gaggcgtgcc ggccagcggc gggggcgca gtgcacacga ggggctgga cttegcctgt	480
	gat	483
	<210> 116	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8A跨膜结构域_CD8产物4	
	<400> 116	
	atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtcc ttctcctgtc actggttacc	60
	acc	63
	<210> 117	
	<211> 120	

<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的CD4 细胞内结构域_CD8产物4	
<400> 117	
tgtgtcaggt gccggcaccg aaggcgccaa gcagagcgga tgtctcagat caagagactc	60
ctcagtgaga agaagacctg ccagtgtcct caccggtttc agaagacatg tagcccccatt	120
<210> 118	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的弗林蛋白酶切割位点_CD8产物4	
<400> 118	
agggctaaac gg	12
<210> 119	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的GSG 接头_CD8产物4	
<400> 119	
gaattcggct ccgga	15
<210> 120	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
[0033] <223> 人工序列的描述: 合成的P2A_CD8产物4	
<400> 120	
gccactaact tctccctggt gaaacaggct ggcgatgttg aagaaaacc cggctcct	57
<210> 121	
<211> 78	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的HGH/SS/2_CD8产物4	
<400> 121	
atggccaccg gctctagaac aagcctgctg ctcgcttttg gcctgctctg cctcccatgg	60
ctccaagaag gatctgct	78
<210> 122	
<211> 345	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的TRB_VDJ (TCR097)_CD8产物4	
<400> 122	
aatgctggtg tctctcagac cccaaaattc cgcatectga agataggaca gagcatgaca	60
ctgcagtgta cccaggatat gaaccataac tacatgtact ggtatcgaca agaccaggc	120
atggggctga agctgattta ttattcagtt ggtgctggtg tctctgataa aggagaagtc	180
ccgaatggct acaacgtctc cagatcaacc acagaggatt tcccgctcag gctggagttg	240
gctgctcct cccagacate tgtgtacttc tgtgccagct ccctacaggt tcctacaat	300
gagcagttct tcgggccagg gacacggctc accgtgctag aggac	345
<210> 123	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	

<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的TCR-β /恒定_CD8产物4	
<400>	123	
ctgaaaaaac	tgttccctcc	aaaagtggcc
cacacacaga	aagccacact	cgtgtgtctg
ctgtcttgg	gggtcaacgg	caaagaggtg
		cacagcggcg
		tcagcacaga
		tccccagcct
		60
ctgaaagaac	agccccgtct	gaacgacagc
tccgccacct	tctggcagaa	ccccagaaac
ctgagcagaga	acgatgagtg	gacccaggac
gccgaagcct	ggggcagagc	cgattgtggc
ctgtctgcca	ccatcctgta	tgagatcctg
gtgtctgctc	tgggtctgat	ggctatggtc
		tccccgggagc
		gcatccccga
		ggcc
		534
<210>	124	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的弗林蛋白酶切割位点_CD8产物4	
<400>	124	
cgggccaagc	gg	
		12
<210>	125	
<211>	9	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的GSG 接头_CD8产物4	
<400>	125	
ggcagcggc		
		9
<210>	126	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的P2A_CD8产物4	
<400>	126	
gccaccaact	tcagcctgct	gaagcaggcc
		ggcgcagtgg
		aggagaacct
		cggcct
		57
<210>	127	
<211>	78	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的HGH/SS_CD8产物4	
<400>	127	
atggccacag	gcagcagaac	atctctgctg
ctgcaagagg	gttccgcc	ctggccttcg
		gactgctgtg
		tctgccttgg
		60
<210>	128	
<211>	337	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的示例性TRA-VDJ (TCR097)_CD8产物4	
<400>	128	
gctcagacag	tcactcagtc	tcaaccagag
ctgagctgca	catatgacac	cagtgagagt
cccagcagc	agatgattct	cgttattcgc
gagaatcgtt	tctctgtgaa	cttcagaaa
		gcagccaat
		ccttcagtct
		caagatctca
		60
		120
		180
		240

[0034]

	gactcacagc tgggggatgc cgcgatgtat ttctgtgctt ttgggaactt caacaaattt	300
	tactttggat ctgggaccaa actcaatgta aaaccaa	337
	<210> 129	
	<211> 74	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的TCR- α /恒定_CD8产物4	
	<400> 129	
	atattcagaa ccccgatcct gctgtgtatc agctgcgcga cagcaagagc agcgacaaga	60
	gcgtgtgttt gttc	74
	<210> 130	
	<211> 200	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的TRAC CDS/右HR臂_CD8产物4	
	<400> 130	
	accgattttg attctcaaac aatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca	60
	gacaaaactg tgctagacat gaggtctatg gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg	120
	agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac	180
	acctttcttc ccagcccagg	200
	<210> 131	
	<211> 800	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的右HR臂_CD8产物4	
[0035]	<400> 131	
	taagggcagc tttggtgcct tgcagcgtg tttccttgcct tcaggaatgg ccaggttctg	60
	cccagagctc tggatcaatga tgtctaaaac tcctctgatt ggtggtctcg gccttatcca	120
	ttgccaccaa aaccctcttt ttactaagaa acagtgagcc ttgttctggc agtccagaga	180
	atgacacggg aaaaaagcag atgaagagaa ggtggcagga gagggcacgt ggcccagcct	240
	cagtctctcc aactgagttc ctgectgcct gcctttgctc agactgtttg ccccttactg	300
	ctctttctagc cctcattcta agccccttct ccaagttgcc tctccttatt tctcctgtc	360
	tgccaaaaaa tctttcccag ctactaagt cagtctcagc cagtcactca ttaaccacc	420
	aatcactgat tgtgccggca catgaatgca ccaggtgttg aagtggagga attaaaaagt	480
	cagatgaggg gtgtgccagc aggaagcacc attctagttg ggggagcca tctgtcagct	540
	gggaaaagtc caaataactt cagattggaa tgtgttttaa ctcagggttg agaaaacagc	600
	taccttcagg acaaaaagtc gggaaggct ctctgaagaa atgctacttg aagataccag	660
	ccctaccaag ggcagggaga ggacctata gaggcctggg acaggagctc aatgagaaag	720
	gagaagagca gcaggcatga gttgaatgaa ggaggcaggg ccgggtcaca ggccttcta	780
	ggccatgaga gggtagacag	800
	<210> 132	
	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的人工序列_CD8产物4	
	<400> 132	
	gctagc	6
	<210> 133	
	<211> 620	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的pBR322_起点_CD8产物4	

	<400> 133							
	cgcgttgctg	gcgtttttcc	ataggctccg	ccccctgac	gagcatcaca	aaaatcgacg		60
	ctcaagtcag	aggtggcgaa	acccgacagg	actataaaga	taccaggcgt	ttccccctgg		120
	aagctccctc	gtgcgctctc	ctgttccgac	cctgcccgtt	accggatacc	tgteccgcctt		180
	tctcccttcg	ggaagcgtgg	cgctttctca	tagctcacgc	tgtaggatc	tcagttcggt		240
	gtaggtcgtt	cgctccaagc	tgggctgtgt	gcacgaacct	cccgttcagc	ccgaccgctg		300
	cgcttatcc	ggtaactatc	gtcttgagtc	caaccggta	agacacgact	tatcgccact		360
	ggcagcagcc	actggtaaca	ggattagcag	agcagaggtat	gtaggcggtg	ctacagagtt		420
	cttgaagtgg	tggcctaact	acggctacac	tagaagaaca	gtatttggtg	tctgcgctct		480
	gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	tggtagctct	tgatccggca	aacaaaccac		540
	cgctggtagc	ggtgggtttt	ttgtttgcaa	gcagcagatt	acgcgcagaa	aaaaaggatc		600
	tcaagaagat	cctttgatct						620
	<210> 134							
	<211> 810							
	<212> DNA							
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)							
	<220>							
	<223> 人工序列的描述: 合成的卡那霉素抗性 (KanR2)_CD8产物4							
	<400> 134							
	ttagaaaaac	tcatcgagca	tcaaatgaaa	ctgcaattta	ttcatatcag	gattatcaat		60
	accatatttt	tgaaaaagcc	gtttctgtaa	tgaaggagaa	aactcaccga	ggcagttcca		120
	taggatggca	agatcctggt	atcggtctgc	gattccgact	cgccaacat	caatacaacc		180
	tattaatttc	cctcgtcaa	aaataagggt	atcaagtgag	aatcaccat	gagtgacgac		240
	tgaatccggt	gagaatggca	aaagtttatg	catttctttc	cagacttggt	caacaggcca		300
	gccattacgc	tcgtcatcaa	aatcactcgc	atcaaccaa	ccgttattca	ttcgtgattg		360
	cgctgagcc	agacgaaata	cgcgatcgct	gttaaaagga	caattacaaa	caggaatcga		420
	atgcaaccgg	cgcaggaaca	ctgccagcgc	atcaacaata	ttttcacctg	aatcaggata		480
	ttcttcta	acctggaatg	ctgttttcc	ggggatcgca	gtggtgagta	accatgcatc		540
[0036]	atcaggagta	cggataaaat	gcttgatggt	cggaagaggc	ataaattccg	tcagccagtt		600
	tagtctgacc	atctcatctg	taacatcatt	ggcaacgcta	cctttgccat	gtttcagaaa		660
	caactctggc	gcatcgggct	tccatacaa	gcgatagatt	gtcgcacctg	attgccgac		720
	attatcgcca	gcccatttat	acccataata	atcagcatcc	atggttgaat	ttaatcgcg		780
	cctcgacggt	tcccgttgaa	tatggetcat					810
	<210> 135							
	<211> 99							
	<212> DNA							
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)							
	<220>							
	<223> 人工序列的描述: 合成的CD8产物4卡那霉素启动子							
	<400> 135							
	aacaccctt	gtattactgt	ttatgtaagc	agacagtttt	attgttcatg	atgatatatt		60
	tttatcttgt	gcaatgtaac	atcagagatt	ttgagacac				99
	<210> 136							
	<211> 5950							
	<212> DNA							
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)							
	<220>							
	<223> 人工序列的描述: 合成的完整的CD8产物4构建体, 具有TCR97插入_CD8产物4							
	<400> 136							
	ggtaccacat	taaaaacaca	aatcctacg	gaaatactga	agaatgagtc	tcagcactaa		60
	ggaaaagcct	ccagcagctc	ctgcttctg	agggtgaagg	atagacgctg	tggtctgca		120
	tgactcacta	gcaactctatc	acggcatat	tctggcaggg	tcagtggctc	caactaacat		180
	ttgtttggtg	ctttacagtt	tattaaatag	atgtttatat	ggagaagctc	tcatttcttt		240
	ctcagaagag	cctggctagg	aaggtggatg	aggcaccata	ttcattttgc	aggtgaaatt		300
	cctgagatgt	aaggagctgc	tgtgacttgc	tcaaggcctt	atatcgagta	aacggtagtg		360
	ctggggctta	gacgcaggtg	ttctgattta	tagttcaaaa	cctctatcaa	tgagagagca		420

	atctcctggt	aatgtgatag	atttcccaac	ttaatgccaa	cataccataa	acctcccatt	480
	ctgctaatagc	ccagcctaag	ttggggagac	cactccagat	tccaagatgt	acagtttgct	540
	ttgctgggccc	tttttcccat	gectgccttt	actctgccag	agttatattg	ctggggtttt	600
	gaagaagatc	ctattaaata	aaagaataag	cagtattatt	aagtagccct	gcatttcagg	660
	tttcccttgag	tggcaggcca	ggcctggccg	tgaacgttca	ctgaaatcat	ggcctcttgg	720
	ccaagattga	tagcttgtgc	ctgtccctga	gtcccagtec	atcacgagca	gctggtttct	780
	aagatgetat	ttcccgtata	aagcatgaga	ccgtgacttg	ccagccccac	agagccccgc	840
	ccttgtccat	cactggcate	tggactccag	cctgggttgg	ggcaaagagg	gaaatgagat	900
	catgtcctaa	ccetgatcct	cttgtcccac	agatatccag	aacctgacc	ctgccgtgta	960
	ccagctgaga	gactctaaat	ccagtgacaa	gtctgtctgc	ctattcgaat	tcggctccgg	1020
	agccactaac	ttcagcctgt	tgaagcaggc	cggcgacggt	gaggaaaacc	ccggtcctat	1080
	ggccttacca	gtgaccgect	tgtccttgc	gctggccttg	ctgctccacg	ccgccaggcc	1140
	gagccagttc	cgggtgtcgc	cgttggatcg	gacctggaac	ctgggcgaga	cagtggagct	1200
	gaagtgccag	gtgctgctgt	ccaaccgcac	gtcgggttgc	tcgtggctct	tccagccgcg	1260
	cgagggcggc	gccagtccca	ccttctctct	atacctctcc	caaaaacaagc	ccaagtcggc	1320
	gacacccagc	ggttctcggg	caagaggttg	caagaggttg	ggggacacct	tcgtcctcac	1380
	cctgagcgac	ttccgcccag	agaacgaggg	ctactatttc	tgctcggccc	tgagcaactc	1440
	catcatgtac	ttcagccact	tcgtgccggt	ccttctgcca	gcgaagccca	ccacgacgcc	1500
	agcgcgcgca	ccaccaaac	cggcgcccac	catcgcgtcg	cagcccctgt	cctgcgccc	1560
	agaggcgtgc	cggccagcgg	cggggggcgc	agtgcacacg	agggggctgg	acttcgectg	1620
	tgatatctac	atctgggcgc	ccttggccgg	gacttgtggg	gtccttctcc	tgctactggt	1680
	tatcacctgt	gtcaggtgcc	ggcaccgaag	gcgccaagca	gagcggatgt	ctcagatcaa	1740
	gagactctc	agtgagaaga	agactgccca	gtgtcctcac	cggtttcaga	agacatgtag	1800
	ccccattagg	gctaaacggg	aattcgctc	cggagccact	aacttctccc	tgttgaaca	1860
	ggctggcgat	gttgaagaaa	accccgtcc	tatggccacc	ggctctagaa	caagcctgct	1920
	gctcgtttt	ggcctgtctt	gectcccatg	gtccaagaa	ggatctgcta	atgctggtgt	1980
	cactcagacc	ccaaaattcc	gcatectgaa	gataggacag	agcatgacac	tgcatgttac	2040
	ccaggatatg	aaccataact	acatgtactg	gtatcgacaa	gaccaggca	tggggctgaa	2100
[0037]	gctgatttat	tattcagttg	gtgctggtat	cactgataaa	ggagaagtcc	cgaatggcta	2160
	caacgtctcc	agatcaacca	caagagattt	cccgtcagg	ctggagtgg	ctgtccctc	2220
	ccagacatct	gtgtacttct	gtgccagctc	cctacaggtt	ccctacaatg	agcagtctt	2280
	cgggccaggg	acacggctca	ccgtgctaga	ggacctgaaa	aacgtgttcc	ctccaaaagt	2340
	ggcctgttct	gagccttctg	aggccagat	cagccacaca	cagaaagcca	cactcgtgtg	2400
	tctggctacc	ggcttctacc	ccgatcacgt	ggaactgtct	tggtgggtca	acggcaaaga	2460
	ggtgcacagc	ggcgtcagca	cagatcccca	gcctctgaaa	gaacagcccg	ctctgaacga	2520
	cagccgctac	tgctgtctta	gcagactgag	agtgtccgcc	accttctggc	agaaccccag	2580
	aaaccacttc	agatgccagg	tccagtctta	cggcctgagc	gagaacgatg	agtggacca	2640
	ggacagagcc	aagcctgtga	cacagatcgt	gtctgccgaa	gcctggggca	gagccgattg	2700
	tggctttacc	agcgagtcac	accagcaggg	cgtgctgtct	gccaccatcc	tgtatgagat	2760
	cctgctcggc	aagccacac	tgtacgtgt	gctggtgtct	gctctggtgc	tgatggetat	2820
	ggtctcccgg	gagcgcatec	ccgagccccg	ggccaagcgg	ggcagcggcg	ccaccaactt	2880
	cagcctgctg	aagcaggccc	gcgacgtgga	ggagaacccc	ggccctatgg	ccacaggcag	2940
	cagaacatct	ctgctgctgg	ccttcggact	gctgtgtctg	ccttggctgc	aagagggttc	3000
	cgccgctcag	acagtcactc	agtcacaacc	agagatgtct	gtgcaggagg	cagagaccgt	3060
	gaccctgagc	tgcacatatg	acaccagtga	gagtgattat	tatttattct	ggtacaagca	3120
	gcctcccagc	aggcagatga	ttctcgttat	tcgccaagaa	gcttataagc	aacagaatgc	3180
	aacagagaat	cgtttctctg	tgaactcca	gaaagcagcc	aaatccttca	gtctcaagat	3240
	ctcagactca	cagctggggg	atgcccgat	gtatttctgt	gcttttggga	acttcaacaa	3300
	attttacttt	ggatctggga	ccaaactcaa	tgtaaaacca	aatattcaga	accccgatcc	3360
	tgctgtgtat	cagctgcgcg	acagcaagag	cagcgacaag	agcgtgtgtt	tgttcaccga	3420
	ttttgattct	caaacaatg	tgtcacaag	taaggattct	gatgtgtata	tcacagacaa	3480
	aactgtgcta	gacatgaggt	ctatggactt	caagagcaac	agtgtgtgtg	cctggagcaa	3540
	caaatctgac	tttgcattgt	caaacgcctt	caacaacagc	attattccag	aagacacctt	3600
	cttcccagc	ccaggtaagg	geagctttgg	tgccttcgca	ggctgtttcc	ttgcttcagg	3660
	aatggccagg	ttctgcccag	agctctggtc	aatgatgtct	aaaactcctc	tgattggtgg	3720
	tctcggcctt	atccattgcc	accaaaaacc	tcttttctac	aagaaacagt	gagccttgtt	3780
	ctggcagctc	agagaatgac	acgggaaaaa	agcagatgaa	gagaaggtgg	caggagaggg	3840

<211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的CD8 α 信号肽_CD8 产物1, 2, 3, 4
 <400> 139
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro
 20
 <210> 140
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的CD8 α 细胞外结构域_CD8 产物1, 2, 3, 4
 <400> 140
 Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly
 20 25 30
 Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Phe
 35 40 45
 Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp
 50 55 60
 Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr
 65 70 75 80
 Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala
 85 90 95
 Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu
 100 105 110
 Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 115 120 125
 Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 130 135 140
 Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
 145 150 155 160
 Asp
 <210> 141
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的CD8 α 跨膜结构域_CD8 产物1, 2, 3, 4
 <400> 141
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Val Ile Thr
 20
 <210> 142
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的CD8 α 细胞内结构域_CD8 产物 1和2
 <400> 142

Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg
 1 5 10 15
 Pro Val Val Lys Ser Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
 20 25 30
 <210> 143
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的弗林蛋白酶切割位点_CD8 产物1, 2, 3, 4
 <400> 143
 Arg Ala Lys Arg
 1
 <210> 144
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的CD8 β 信号肽_CD8产物2
 <400> 144
 Met Arg Pro Arg Leu Trp Leu Leu Leu Ala Ala Gln Leu Thr Val Leu
 1 5 10 15
 His Gly Asn Ser Val
 20
 <210> 145
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0040] <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的CD8 β 细胞外结构域 _CD8产物2
 <400> 145
 Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val
 1 5 10 15
 Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr
 20 25 30
 Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe
 35 40 45
 Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val
 50 55 60
 Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu
 65 70 75 80
 Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Met
 85 90 95
 Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Gln Leu Ser
 100 105 110
 Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro Thr Lys Lys Ser Thr
 115 120 125
 Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly
 130 135 140
 Pro Leu Cys Ser Pro
 145
 <210> 146
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的CD8 β 跨膜结构域_CD8产物2

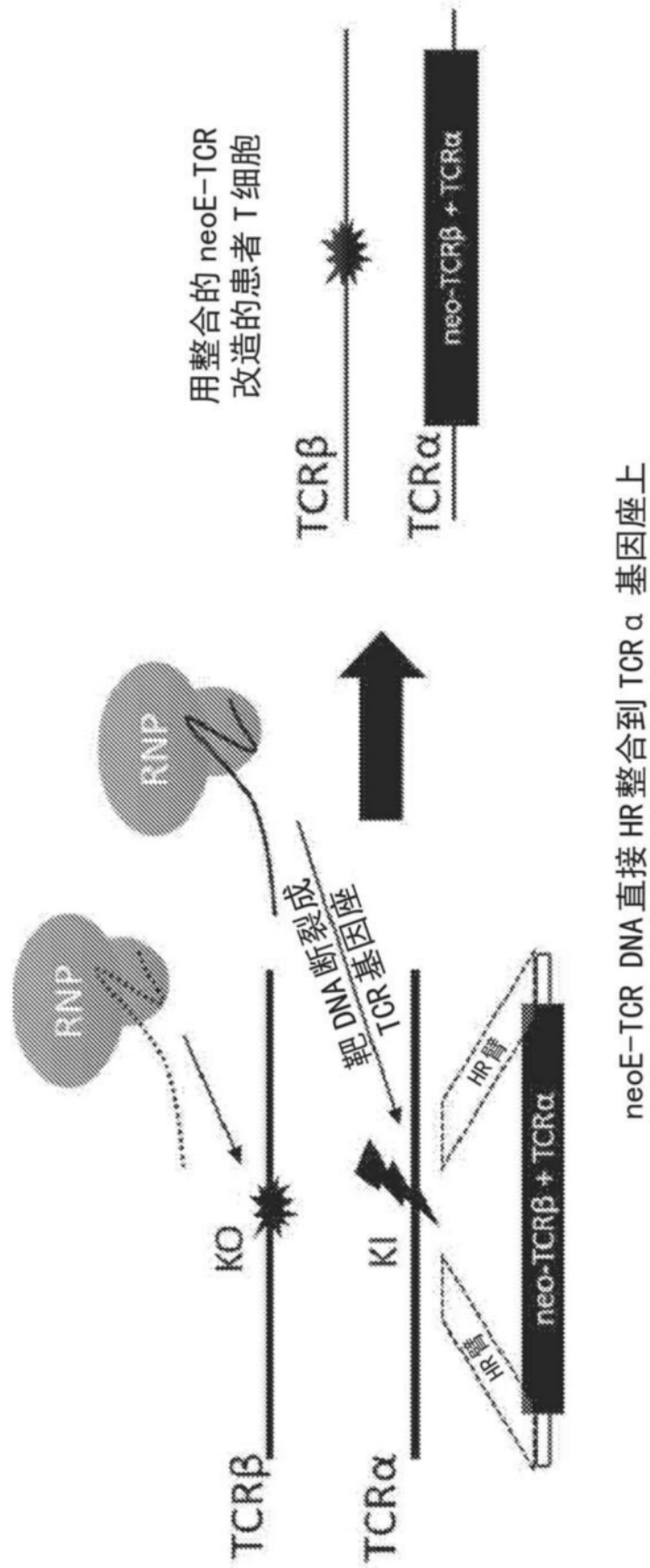


图1A

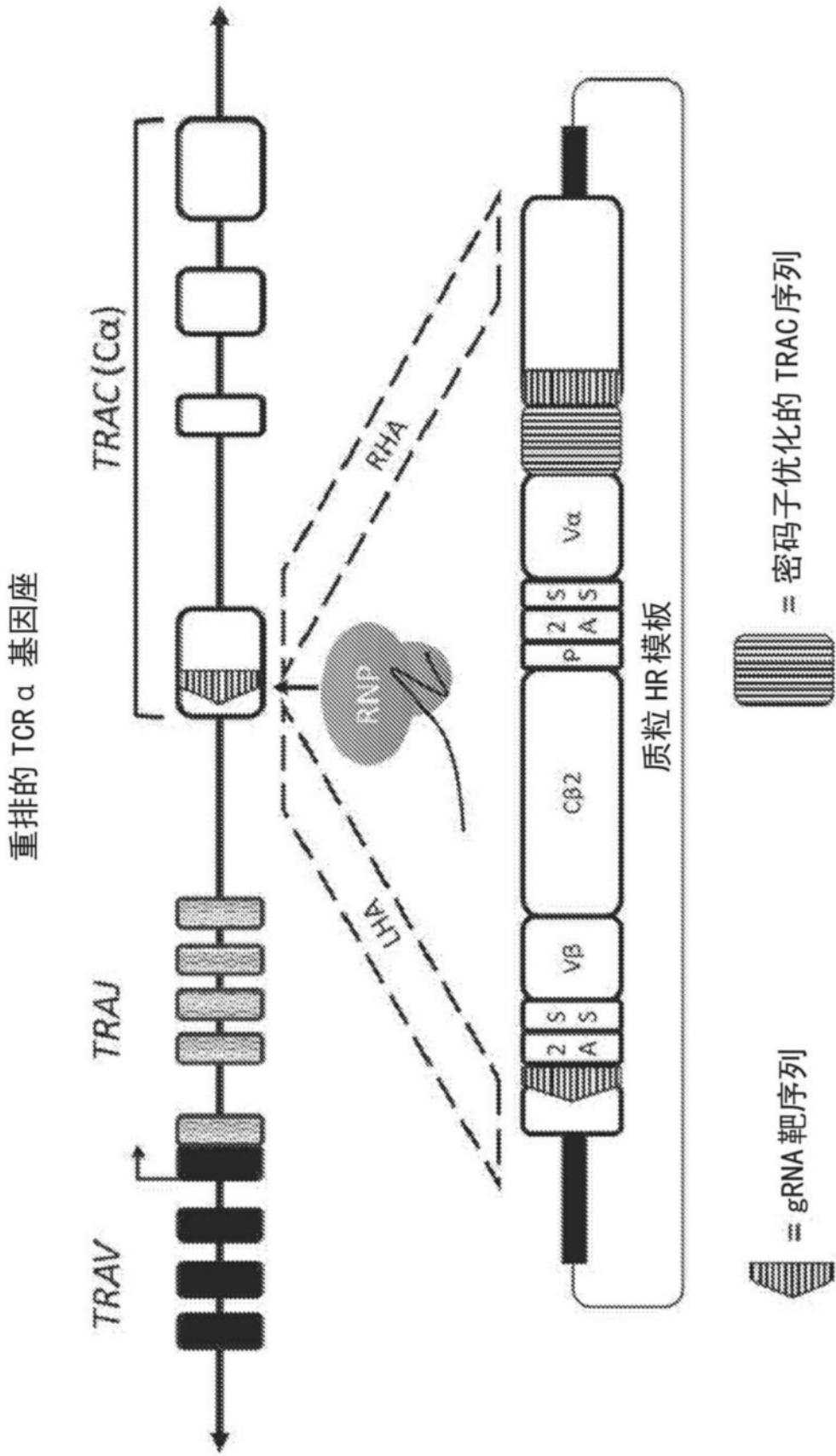


图1B

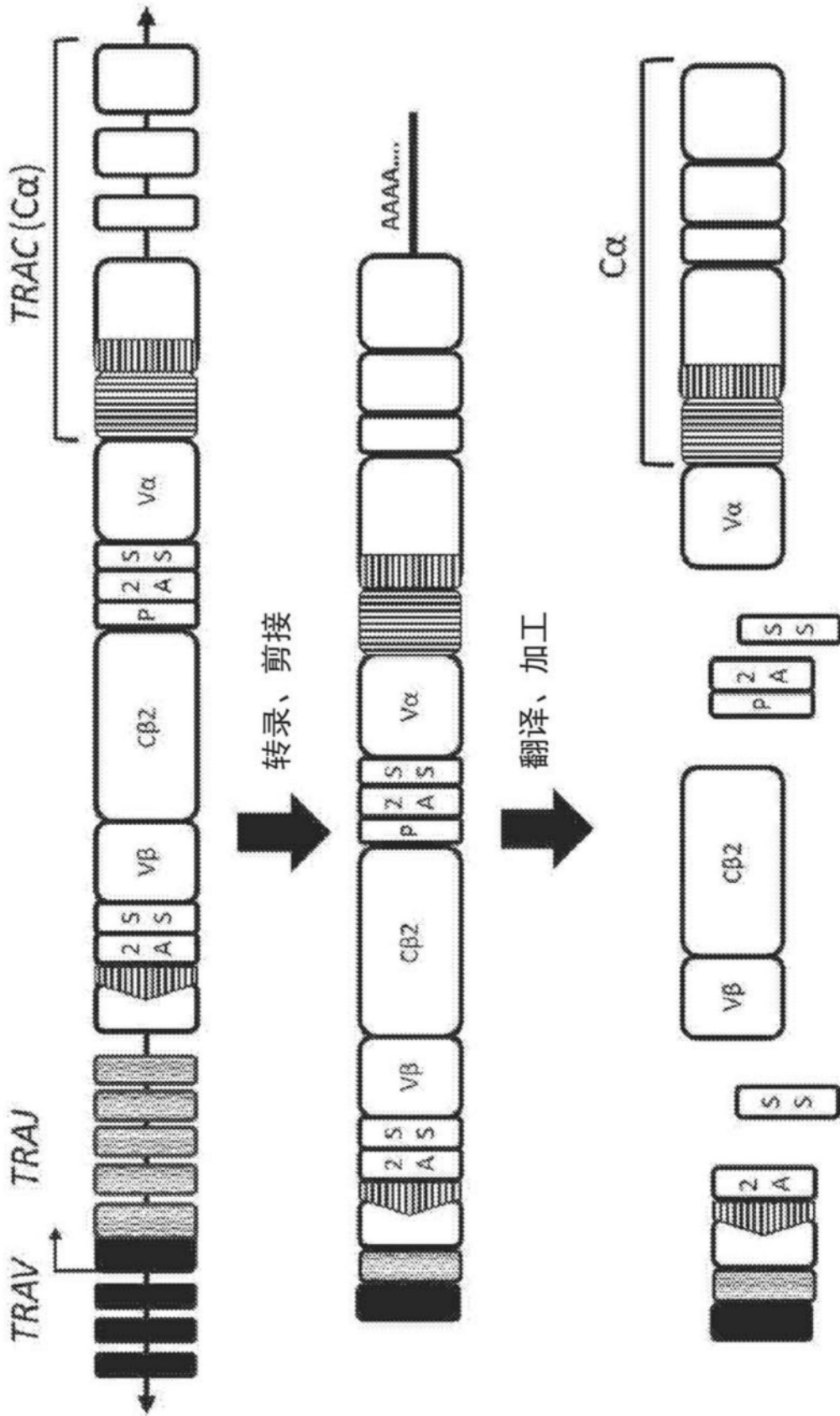


图1C

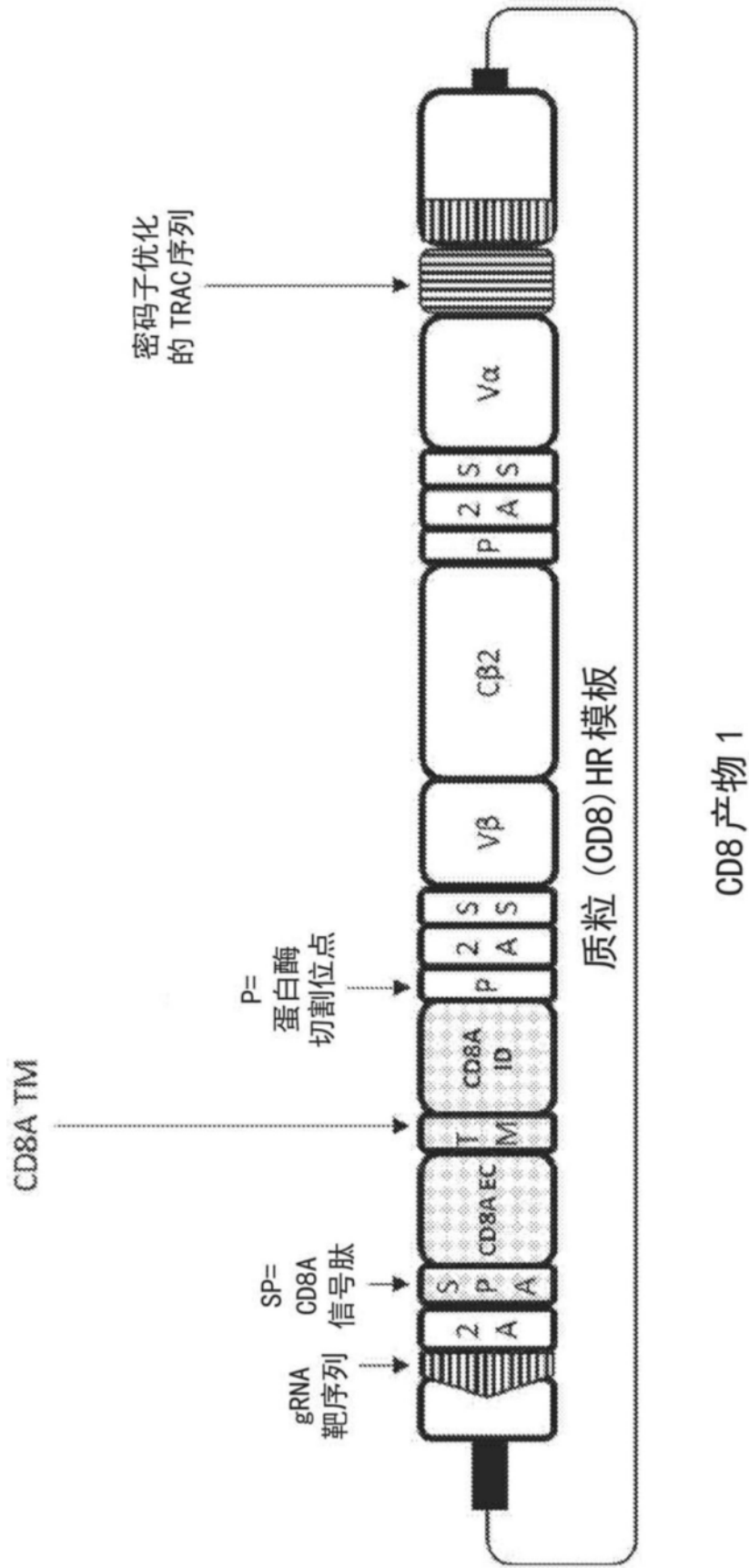


图2A

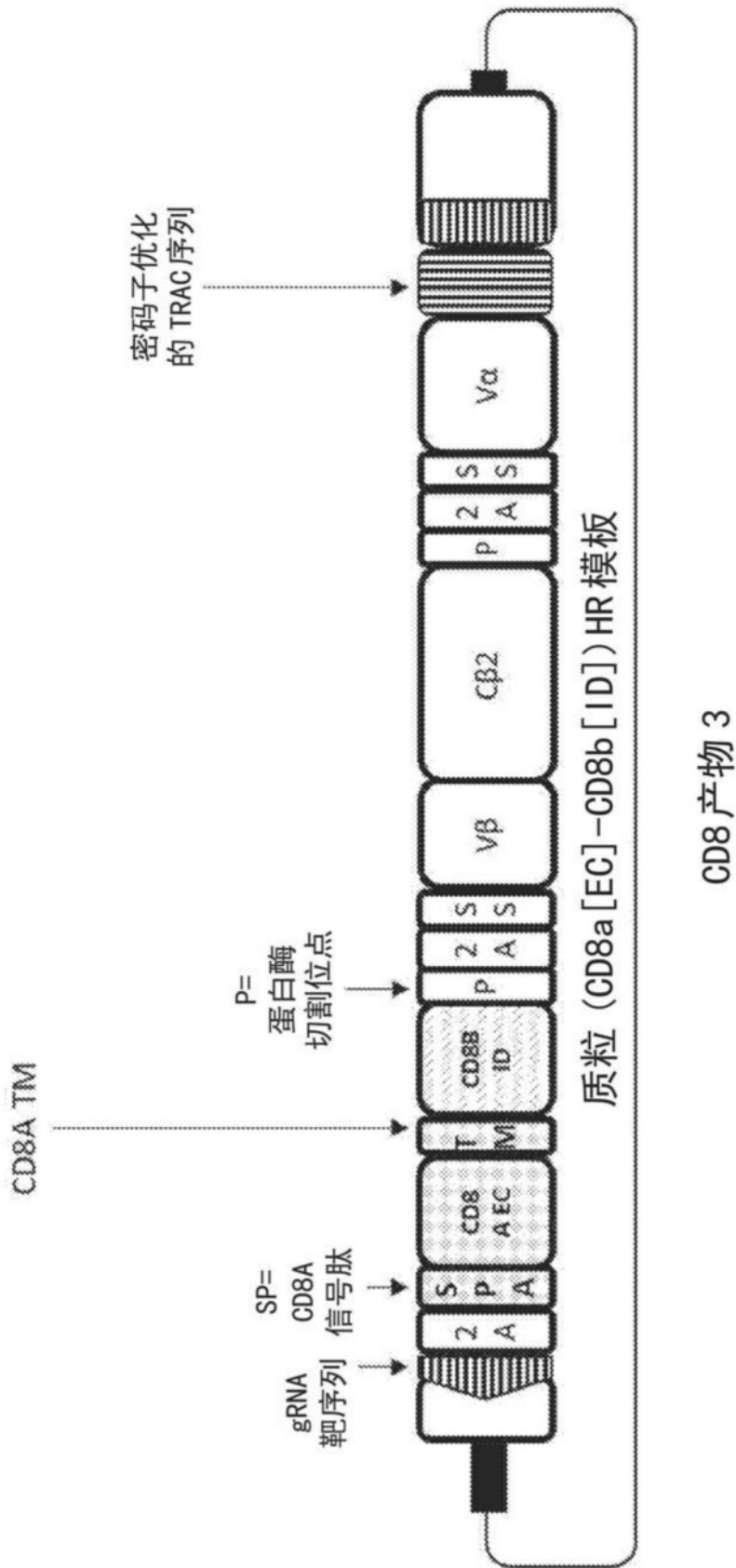


图2C

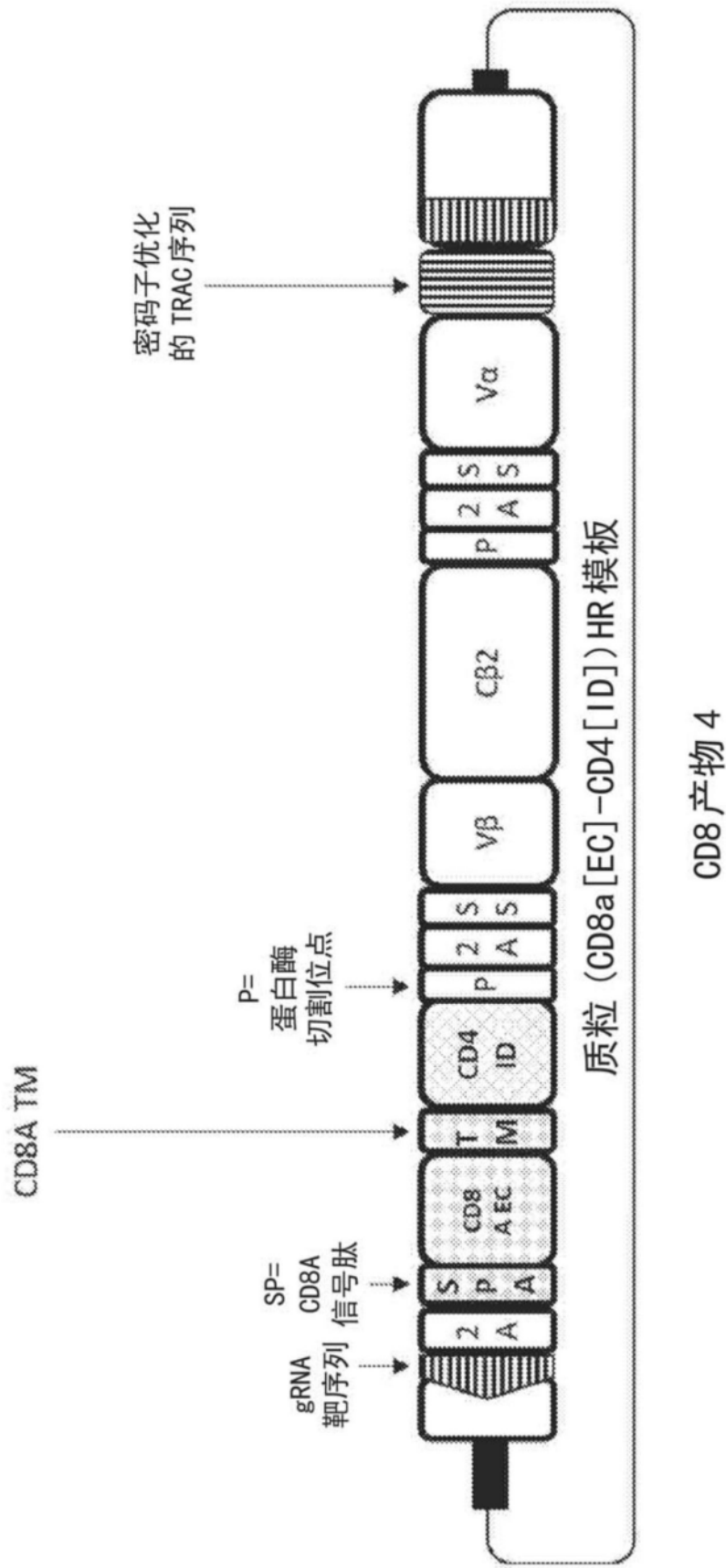


图2D

(CD8A_CD8 产物 1)

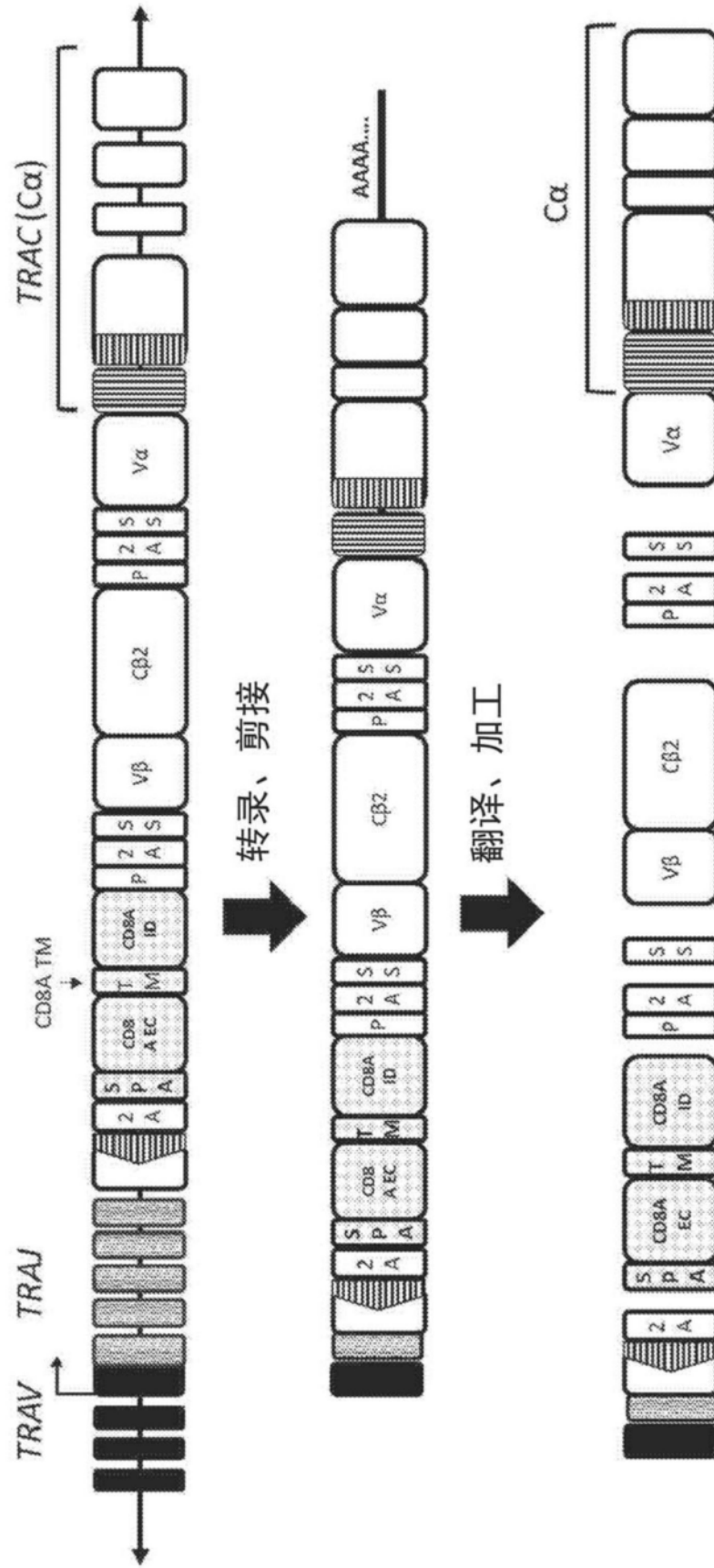


图3A

(CD8 α -P2A-CD8 β _CD8 产物 2)

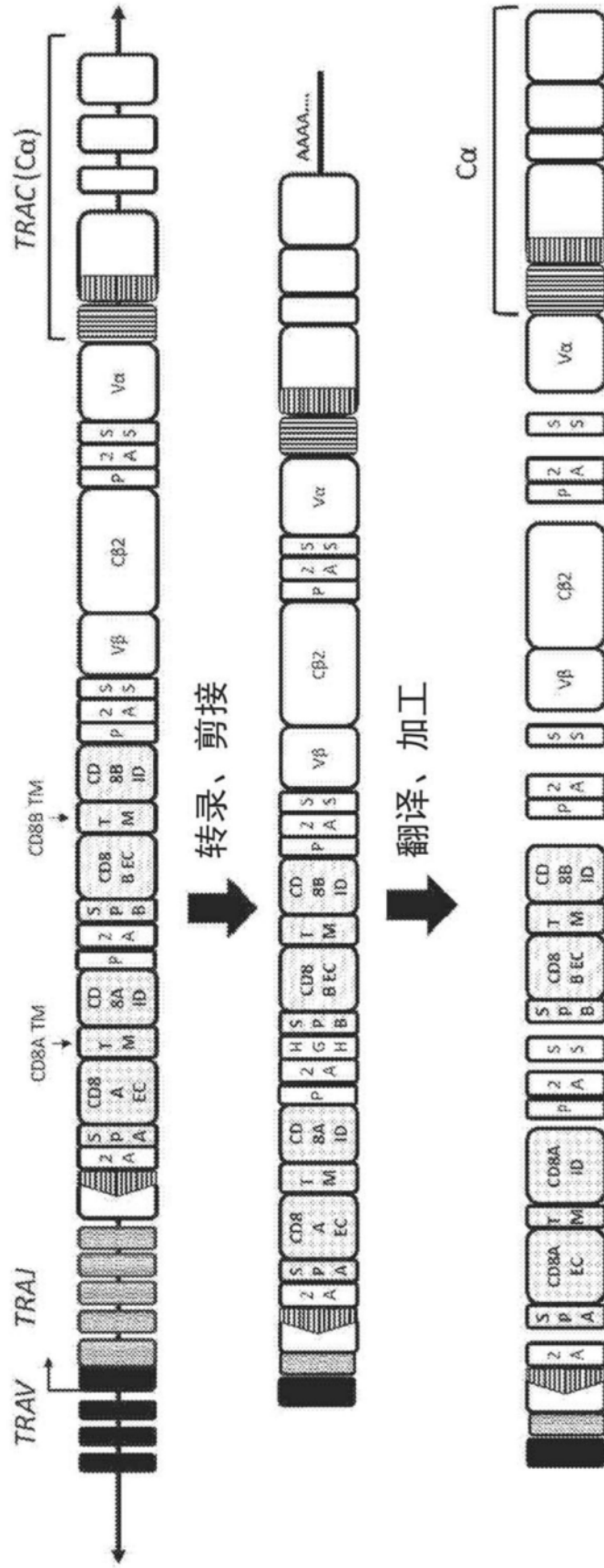


图3B

(CD8A[EC]-CD8B[ID]_CD8产物3)

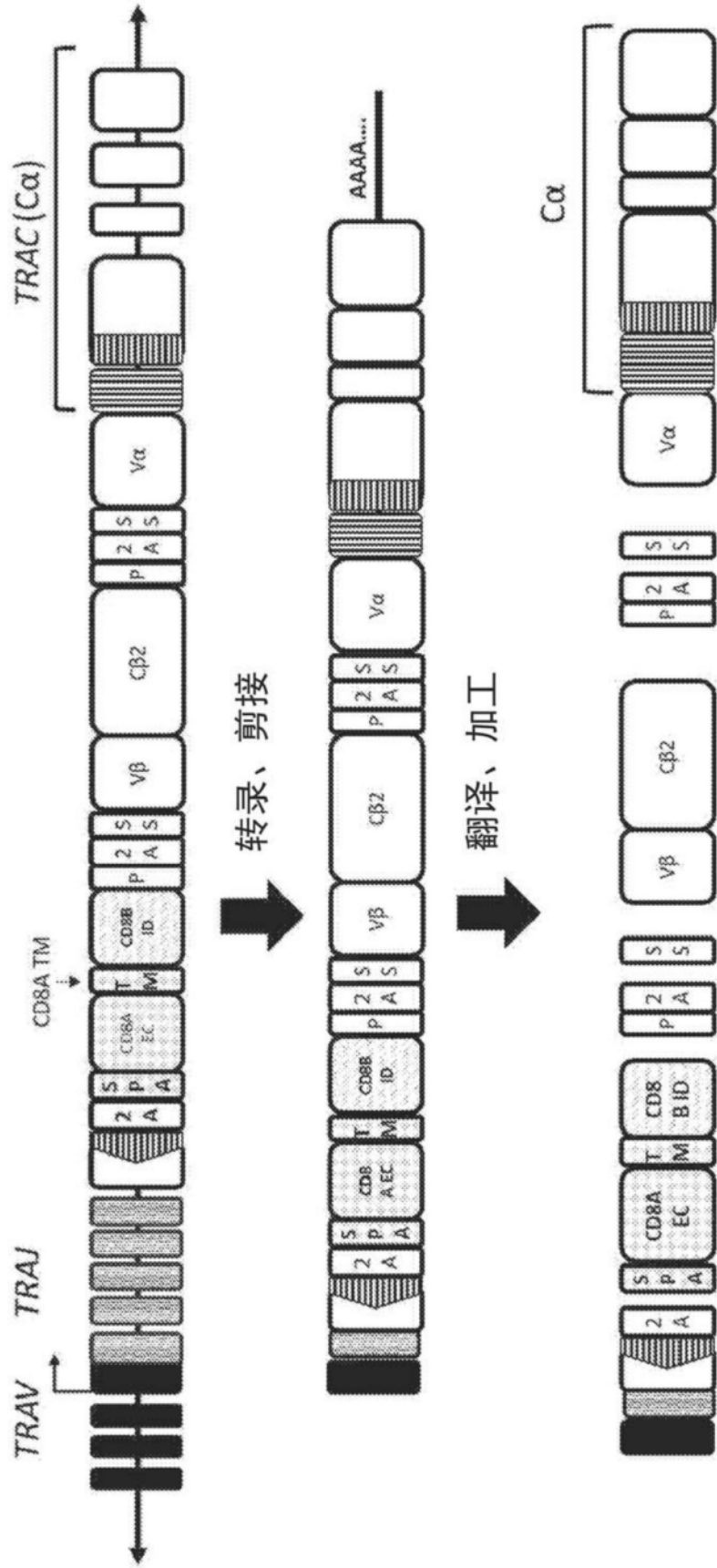


图3C

(CD8a[EC]-CD4[ID]_CD8产物4)

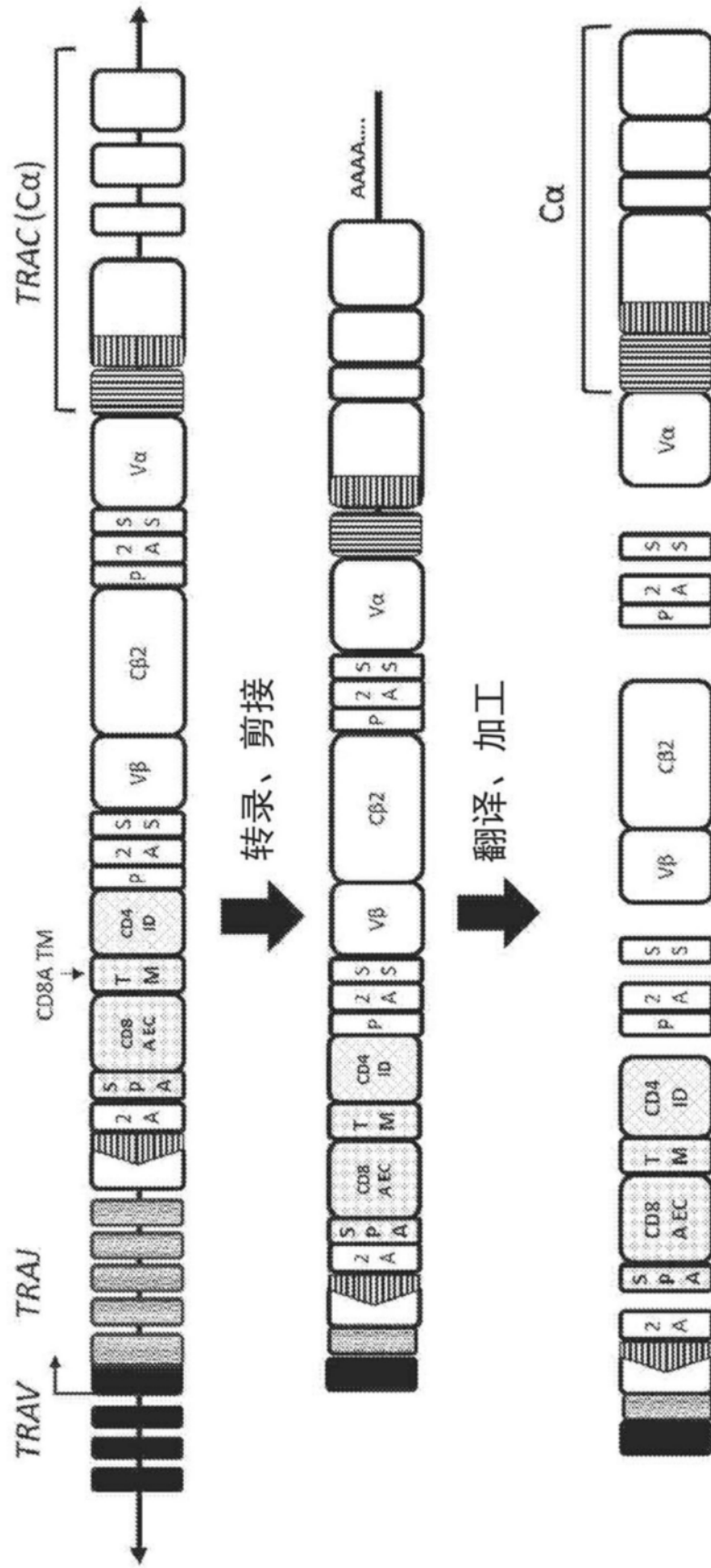


图3D

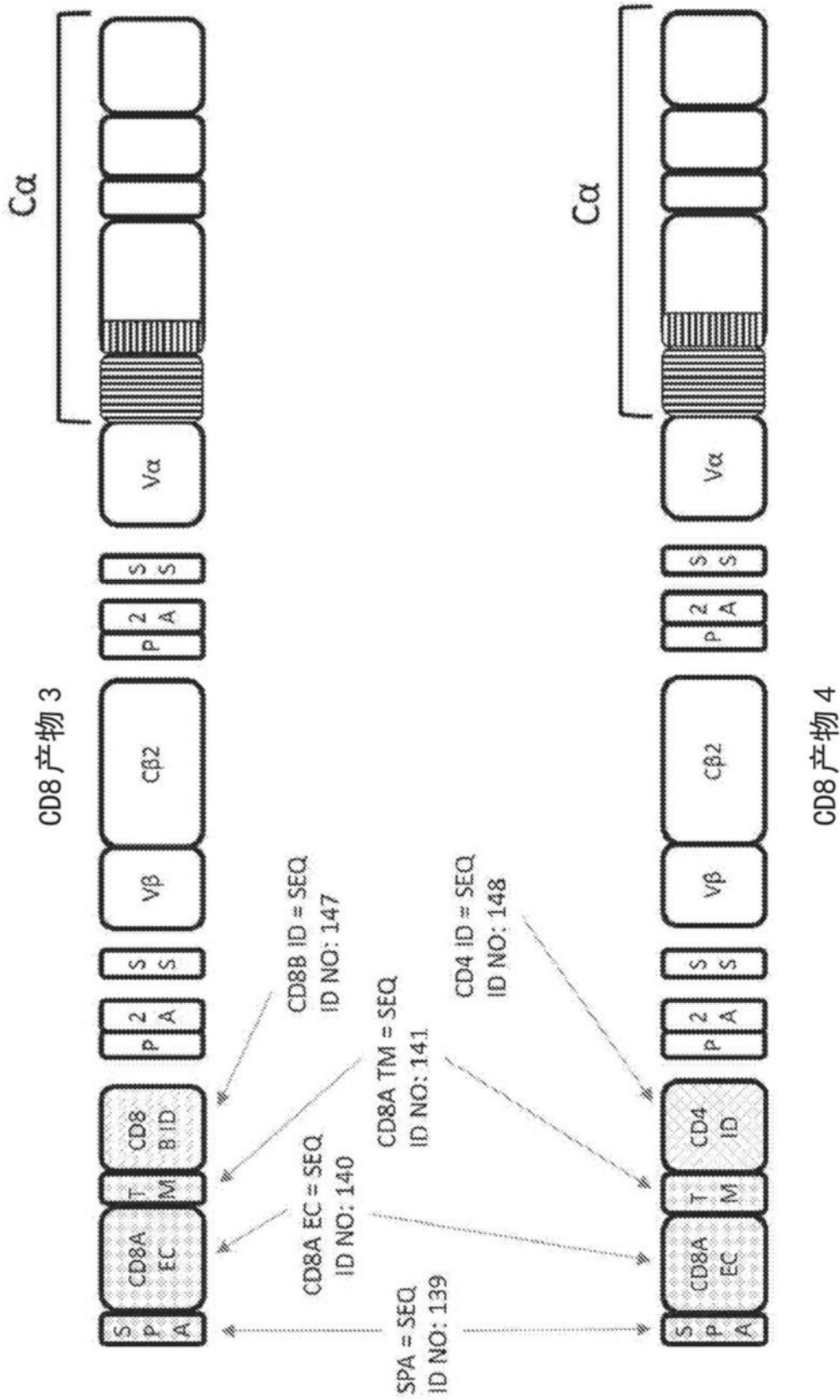


图4B

NeoTCR 产物核酸序列

ACATTAANAACAAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCAGTAAAGGAAAAAGC
 CTCCAGCAGCTCCTGCTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGACTCACTA
 GCACTCTATCAGGGCCATAATCTGCAGGGTCAAGTGGCTCCAACCTAACAATTTGTTGGTACTT
 TACAGTTTATAAATAGATGTTTATATGGAAGCTCTCATTCTTTCTCAGAAAGAGCCTGGCT
 AGGAAAGTGGATGAGGCACCATATTCATTTGCAAGGTGAAATTCCTGAGATGTAAGGAGCT
 GCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGTGGGCTTAGACGCAGGTG
 TTCTGATTTATAGTTCAAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTT
 CCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCAATCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGA
 GACCACCTCCAGATCCAAAGATGACAGTTTGTCTTGTGGGCTTTTCCCATGCCTGCCTTTA
 CTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAAGAATAAGCAGT
 ATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAAGTTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACG
 TTCCTGAAATCATGGCCTCTGGCCAAAGATTGATAGCTTGTGCTGTCCCTGAGTCCCAGTC
 CATCACGAGCAGCTGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCCGTGACTTGCC
 AGCCCCACAGAGCCCCGCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCA
 AAGAGGGAAATGAGATCATGTCTTAACCCTGATCCTCTTGTCCACACAG

左 HR 臂 (SEQ ID NO:1)

TRAC CDS (SEQ ID NO:2)

ATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGT
 ACAAGTCTGTCTGCCTATTTC

GAATTCGGCTCCGGA

GSG 接头 1 (SEQ ID NO:3)

GCCACTAACTTCTCCCTGTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAGAAAAACCCCGG
 TCCT

P2A (SEQ ID NO:4)

图5

HGH/SS/2 (SEQ ID NO:5)
 ATGCCACCGGCTTAGAACAAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGCCTGCTCTGCCTCCCATGGCTC
 CAAGAAGGATCTGCT
 neoTCR TRB_VDJ
 序列的插入位点
 TCR-β / 恒定 (SEQ ID NO:7)
 CTGAAAAACGTGTTCCCTCCAAAAGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCC
 ACACACAGAAAGCCACACTCGTGTCTGGCTACCGGCTTCTACCCCGATCACGTGGAATG
 TCTTGGTGGTCAACGGCAAGAGGTGCACAGGGCGTACACACAGATCCCCAGCCCTCTGA
 AAGAACAGCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCTGTCTAGCAGACTGAGAGTGTCCGC
 CACCTTCTGGCAGAACCCAGAAACCACTTCAAGATGCCAGGTCCAGTTCTACGGCCTGAGCG
 AGAACGATGAGTGGACCCAGGACAGAGCCCAAGCCTGTGACACAGATCGTGTCTGCCGAAG
 CCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACAGCGAGTCATACCAGCAGGGCGTGTGTCTGC
 CACCATCCTGTATGAGATCCTGCTCGGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGTGTGTCTGCTCT
 GGTGCTGATGGCTATGGTCTCCCGGGAGCGCATCCCCGAGGCC
 CGGGCCAAGCGG
 GGCAGCGGC
P2A (SEQ ID NO:10)
 GCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCGCGGACGTGGAGGAGAAACCCCGGCCCT
HGH SS (SEQ ID NO:11)
 ATGCCACAGGCAGACAACATCTCTGCTGGCCTTCGGACTGCTGTGTCTGCCTTGCT
 GCAAGAGGGTTCCGCC

弗林蛋白酶切割位点 (SEQ ID NO:8)

GSG接头 1 (SEQ ID NO:9)

图5续

neoTCR TRA_VDJ
序列的插入位点

TCR-α / 恒定
(SEQ ID NO:13)

TRAC CDS/右 HR 臂
(SEQ ID NO:14)

右 HR 臂 (SEQ ID NO:15)

(SEQ ID NO:16)

[[TRA_VDJ序列，特异于 NeoTCR]]

ATATTCAGAACCCCGATCCTGCTGTGTATCAGCTGCGGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGC
GTGTGTTTGTTG

ACCGATTTTGATTTCAAAACAATGTGTCAAAAGTAAGGATTTCTGATGTATATCACAGAC
AAAACCTGTGTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGTGGCCTGGAGCA
ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCAGAAGACACCTTCT
TCCCCAGCCCCAGG

TAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGCCAGGTTCTGCC
CAGAGCTGTGTCATGATGCTAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCC
ACCAAACCCTCTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTCTGGCAGTCCAGAGAATGACAC
GGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAGGTTGCCAGGAGGACGTTGGCCAGCCTCAGTCT
CTCCAACCTGAGTTCCCTGCCTGCTGCTGCTCAGACTGTTGGCCCTTACTGCTCTCTAGG
CCTCATTTAAGCCCCCTTCCAAGTTGCCCTCTCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAATCTTT
CCCAGCTCACTAAGTCAGTCTACGCAGTCACTCATTAAACCCCACTGATTGTGCCCGG
CACATGAATGCCAGGTTTGAAGTGAGGAAATTAATAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCA
GAGGAAGCACCACTTAGTTGGGGAGCCCCATCTGTGAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTT
CAGATTGGAATGTTTTAACTCAGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAG
GGAAAGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAG
GACCCATAGAGGCCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAAGGAGAGCAGCAGGCGCATGA
GTTGAATGAAAGGAGGCCGGGTCACAGGGCCTTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAG

GCTAGC

图5续

pBR 322_起点
(SEQ ID NO:17)

CGCGTTGCTGGCGTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCT
 CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAG
 CTCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCCTTCTCCCT
 TCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTT
 CGTCCAAAGCTGGCGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGG
 TAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG
 GTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCC
 TAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGTCTGCTGAAGCCAGTTACCTT
 CGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAACCCCGCTGGTAGCGGTGGTTTT
 TTTGTTTGCAAAGCAGCAGATTACGGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAGATCCTTTGATCT

卡那霉素抗性基因
(KanR2) (SEQ ID NO:18)

TTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCA
 TATTTTGA AAAAGCCGTTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTACCCGAGGCAGTCCATAGGAT
 GGCAAGATCCTGTAICGGTCTCGGATCCGACTCGTCCAAATCAATCAACCTATTAATTC
 CCCTCGTCAAAAATAAGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGA
 GAATGGCAAAAAGTTATGCAATTTCTTCCAGACTTGTTCACACAGGCCAGCCATTACGCTCGTC
 ATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCCAGACGAAA
 TACGCGATCGCTGTAAAAAGGACAATTAACAACAGGAATCGAATGCAACCCGGCGCAGGAAC
 ACTGCCAGGCATCAACAATATTTTCACTGAATCAGGATATCTTCTAATACCTGGAATGCTG
 TTTTCCGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTG
 ATGGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCACTCATCTGTAAACATCA
 TTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTGGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAG
 CGATAGATTGCGCACCTGATTGCCCGACATTAATCGCGAGCCCAATTAATACCCATATAAATCAG
 CATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCAT

卡那霉素启动子
(SEQ ID NO:19)

AACACCCCTGTATTACTGTTTATGTAAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATAATTTTATC
 TTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC

CD8 产物 1 产物核酸序列

ACATTAACAACAATACTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAAAGC
 CTCCAGCAGCTCCTGCTTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGACTCACTA
 GCACCTATCACGGCCATATCTGGCAGGGTCACTGGCTCCAACTAACATTTGTTTGGTACTT
 TACAGTTTATTAATAGATGTTTATATGGAGAGCTCTCAITTTCTTCAGAAAGCCTGGCT
 AGGAAGGTGGATGAGGCACCATATTCATTTTGCAGGTGAAATTCCTGAGATGTAAGGAGCT
 GCTGTACTTGCTCAAGGCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGCTTAGACGCAGGTG
 TTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCTGGTAAATGTAGATATT
 CCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCAGCCTAAGTTGGGGA
 GACCACTCCAGATCCAAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCTTTTCCCATGCCTGCCTTTA
 CTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGTTTTGAAGAAAGATCCTATTAATAAAGAATAAAGCAGT
 ATTATTAAGTAGCCCTGCATTCAGGTTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCTGGCCGTGAACG
 TTCCTGAAATCATGGCTCTTGCCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTC
 CATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCCGTGACTTGCC
 AGCCCCACAGAGCCCCCTTGTCATCACTGGCACTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCA
 AAGAGGGAAATGAGATCATGTCTCAACCCTGATCCTCTTGTTGCCACAG

左 HR 臂 (SEQ ID NO:22)

TRAC CDS (SEQ ID NO:23)

ATATCCAGAAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTG
 TCTGCCTATTC

GSG 接头 1 (SEQ ID NO:24)

GAATTCGGCTCCGGA

P2A (SEQ ID NO:25)

GCCACTAACTCAGCCTGTTGAAGCAGGCCGGCAGCTTGAGGAAAACCCCGGTCCT

图6

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCCGCAGGCC
 CD8A 信号肽 (SEQ ID NO:26)
 G
 AGCAGTTCGGGTGTCGCCGCTGATCGGACCTGGAACTGGGCGAGACAGTGGAGCTG
 AGTGCCAGGTGCTGTCCAACCCGACGTGGGTGCTCGTGGCTCTTCCAGCCGCGCG
 CD8A 细胞外结构域 (SEQ ID NO:27)
 GCGCCGCCAGTCCCACCTTCCCTATACCTTCCCAAACAAGCCCAAGGCGCCGAG
 GGGCTGGACACCCAGCGGTTCTGGGCAAGAGTTGGGGACACCTTCGTCCTCACCCCTG
 AGCGACTTCGCCGAGAGAACGAGGGCTACTATTCTGCTCGGCCCTGAGCAACTCCATCAT
 GTACTTCAGCCACTTCGTGCCGGTCTTCTGCCAGCGAAGCCACCACGACGCCAGCGCCGC
 GACCACCAACCCGGCCACCATCGCTCGCAGCCCTGTCCCTGGCCCAAGAGGCGTG
 CCGGCCAGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCCTGTGAT
 ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACC
 CD8A 跨膜结构域 (SEQ ID NO:28)
 CTTTACTGCAACCACAGGAACCGAAGACGTGTTGCAAATGTCCCGCCTGTGTCAAATC
 CD8A 细胞内结构域 (SEQ ID NO:29)
 GGGAGACAAGCCAGCCCTTCGGCGAGATACGTC
 AGGGCTAAACGG
 弗林蛋白酶切割位点 (SEQ ID NO:30)
 GAATTCGGCTCCGGA
 GSG 接头 (SEQ ID NO:31)
 GCCACTAATTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAGAAACCCCGGTCCT
 P2A (SEQ ID NO:32)
 ATGGCCACGGCTCTAGAACAAGCCTGCTCGCTTTTGGCCTGCTCTGCCCTCCATGGCTC
 HGH/SS/2 (SEQ ID NO:33)
 CAAGAAGGATCTGCT

图6续

neoTCR TRB_VDJ
序列的插入位点

[[TRB_VDJ序列, 特异于 NeoTCR]]

CTGAAAAACGTGTTCCCTCCAAAAGTGGCCGTGTTTCGAGCCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCC
ACACACAGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCTACCCGGCTTCTACCCCGATCACGTGGAACGTG
TCTTGGTGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGGCTCAGCACAGATCCCCAGCCTCTGA
AAGAACAGCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCCTGTCTAGCAGACTGAGAGTGTCCGC
CACCTTCTGGCAGAACCCAGAAACCACTTCAGATGCCAGGTCCAGTTCTACGGCCTGAGCG
AGAACGATGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAAGCCGTGTACACAGATCGTGTCTGCCGAAG
CCTGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGAGTCATACCAGCGGCGTGTCTGTCTGC
CACCATCCTGTATGAGATCCTGCTCGGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGCTGGTGTCTGCTCT
GGTGTGATGGCTATGTTCTCCCGGAGCGGCATCCCCGAGGCC

弗林蛋白酶切割位点 (SEQ ID NO:36)

CGGGCCAAAGCGG

GGCAGCGGC

GSG接头 (SEQ ID NO:37)

GCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCT

P2A (SEQ ID NO:38)

ATGGCCACAGGCAGCAGAACATCTCTGTCTGCTGGCCTTCGGACTGCTGTGTCTGCCCTTGGCT

HGH/SS (SEQ ID NO:39)

GCAAGAGGGTCCGCC

neoTCR TRA_VDJ序列的插入位点

[[TRA_VDJ序列, 特异于 NeoTCR]]

ATATTCAGAACCCGATCCTGCTGTGTATCAGCTGCGGCAGCAAGAGCAGCGACAAGAGC

TCR- α / 恒定 (SEQ ID NO:41)

GTGTGTTTGTTTC

图6续

TRAC CDS/右 HR 臂
(SEQ ID NO:42)

ACCGATTTGATTCTCAAAACAATGTGTCAAAAAGTAAAGGATTCTGATGTATATACAGAC
AAAAGTGTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTCTGTGGCCTGGAGCA
ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAACCGCCTTCAACAACAGCATTATCCAGAAGACACCTTCT
TCCCCAGCCCCAGG

右 HR 臂
(SEQ ID NO:43)

TAAGGGCAGCTTTGGTGCCCTCGCAGGCTGTTCCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCC
CAGAGCTGGTCAATGATGCTAAAACTCCTCTGATTGGTGTCTCGGCCTTATCCATTGCC
ACCAAAACCCTCTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACAC
GGGAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCT
CTCCAACTGAGTTCCTGCTGCCCTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCTAGG
CCTCATTCTAAGCCCCCTTCTCCAAAGTTGCCCTCCTTAITTTCCCTGTCTGCCAAAAATCTTT
CCCAGCTACTAAGTCAGTCTACGCAGTCACTCATTAACCCCAATCACTGATTGTGCCGG
CACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATAAAAGTCAAGATGAGGGGTGTGCCCA
GAGGAAGCACCATCTAGTTGGGGGAGCCCCATCTGTACGTGGGAAAAGTCCAAAATAACTT
CAGATTGGAATGTGTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGTACCTTCAGGACAAAAGTCAG
GGAAGGGCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAG
GACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAAGGAGAAAGAGCAGCAGGCATGA
GTTGAATGAAGGAGGCGGGGTCACAGGGCCTTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAG

(SEQ ID NO:44)

GCTAGC

图6续

pBR322_起点
(SEQ ID NO:45)

CGCGTTGCTGGCGTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCT
CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACGAGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAG
CTCCCTCGTGGCTCCTCTGTTCCGACCTGCCGTTACCGGATACTGTCCGCCCTTCTCCCT
TCGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTAICTCAGTTCGGGTAGGTCGTT
CGCTCCAAGCTGGGCTGTGACGAAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGG
TAACTATCGTCTTGAGTCCAAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG
GTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCC
TAACTACGGCTACACTAGAAAGACAGTATTTGGTAICTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTT
CGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTT
TTTGTTCGAAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAGATCCTTTGATCT
TTAGAAAACATCGAGCATCAAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCA
TATTTTTGAAAAAGCCGTTTCGTATGAAAGGAGAAACTCACCGAGGCAGTTCATAGGAT
GGCAAGATCCTGGTATCGGCTGCGATCCGACTCGTCCAAACATCAATAACAACCTATTAATTC
CCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGA
GAATGGCAAAAGTTTATGCAATTCCTCCAGACTTGTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTC
ATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCCAGACGAAA
TACGCGATCGCTTTAAAAGGACAATTAACAACAGGAATCGAATGCAACCCGGCGCAGGAAC
ACTGCCAGCGCATCAACAATAITTTACCTGAATCAGGATAITCTTAATACCTGGAATGCTG
TTTTCCGGGATCGCAGTGTGAGTAAACCAATGCAATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTG
ATGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCA
TTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAG
CGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACATATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAG
CATCCAATGTTGGAATTTAATCGCGGCCCTCGACGTTTCCCGTTGAATAATGGCTCAT

卡那霉素抗性
(KanR2) (SEQ ID NO:46)

AACACCCCTTGTTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTTATTGTTCAIGATGATATATTTTTATC
TTGTGCAATGTAAACATCAGAGATTTTGAGACAC

卡那霉素启动子
(SEQ ID NO:47)

图6续

CD8 产物 2 产物核酸序列

ACATTAACAACAATCCTACGGAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAAAGC
 CTCCAGCAGCTCCTGCTTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGACTCACTA
 GCACTCTATCACGGCCATATCTGCGAGGTCAGTGGTCCAACTAACATTTGTTTGGTACTT
 TACAGTTTATTAATAGATGTTTATATGGAGAAGCTCTCAATTTCTTCTCAGAAGAAGCCTGGCT
 AGGAAGTGGATGAGGCCACCATAATTCATTTGCAAGGTGAAATTCCTGAGATGTAAGGAGCT
 GCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGTGGGCTTAGACGCAGGTG
 TTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTT
 CCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATCTGCTAATGCCCAAGCCTAAGTTGGGGA
 GACCACTCCAGATCCAAGATGIACAGTTTGTCTTGTGGGCTTTTCCCATGCCCTGCCITTA
 CTCTGCCAGAGTTATATGCTGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAGAATAAGCAGT
 ATTTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCCTGAGTGGCAGGCCAGGCTGGCCGTGAACG
 TTCCTGAAATCATGGCCTCTGGCCAAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTC
 CATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCCGTGACTTGCC
 AGCCCCACAGAGCCCCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCA
 AAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCCTGATCCTCTTGTCCCCACAG

左 HR 臂 (SEQ ID NO:49)

TRAC CDS (SEQ ID NO:50)

ATATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTG
 TCTGCCTATTC

GSG 接头 1 (SEQ ID NO:51)

GAATTCGGCTCCGGA

P2A (SEQ ID NO:52)

GCCACTAACTTCAGCCTGTTGAAGCAGGCCGGCAGCTTGAGGAAAACCCCGGTCCT

图7

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGGCC
CD8A 信号肽
 (SEQ ID NO:53)
 G

AGCCAGTTCGGGTGTCGCCGCTGGATCGGACCTGGAACCTGGGCGAGACAGTGAGCTG
 AAGTGCCAGGTGCTGTCCAACCCGACGTGGGCTGCTCGTGGCTCTCCAGCCGCGCG
 GCGCCCGCCAGTCCACCTTCCCTATACCTCTCCAAAACAAGCCCAAGGCGGCCGAG
CD8A 细胞外结构域
 (SEQ ID NO:54)
 GGGTGGACACCCAGCGTTCTCGGGCAAAGAGTTGGGGACACCTTCGTCTCACCCCTG
 AGCGACTTCCGCCGAGAACGAGGGCTACTATTTCTGCTCGGCCCTGAGCAACTCCATCAT
 GTACTTCAGCCACTTCGTGCCGTCTTCTGCCAGCGAAGCCACCCAGCCAGCCAGCGCCGC
 GACCACCAACCCGGCCACCATCGCTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCCAAGAGGCGTG
 CCGGCCAGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCCTGTGAT

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACC
CD8A 跨膜结构域
 (SEQ ID NO:55)

CTTTACTGCAACCACAGGAACCGAAGACGTGTTGCAAATGTCCCGCCTGTGGTCAAATC
CD8A 细胞内结构域
 (SEQ ID NO:56)
 GGGAGACAAAGCCAGCCCTTCGGCGAGATACGTC

AGAGCAAAGCGG
弗林蛋白酶切割位点 (SEQ ID NO:57)

GGCTCCGGA
GSG接头 (SEQ ID NO:58)

GCTACCAATTTAGCCTCTGAAGCAGGCTGGCGATGTTGAGGAAACCCCTGGTCCC
P2A (SEQ ID NO:59)

ATGGCGCGGCTGTGGCTCCTCTTGGCCGCGCAGCTGACAGTTCTCCATGGCAACTCAGT
CD8B 信号肽 (SEQ ID NO:60)
 C

图7续

CD8B 细胞外结构域
(SEQ ID NO:61)

CTCCAGCAGACCCCTGCATACATAAAGGTGCAAAACCAACAAGATGGTGATGCTGTCTCCTGCCGA
GGTAAATCTCCCTCAGTAACATGCGCATCTACTGGCTGAGACAGCGCCAGGCCACCCGAGCA
GTGACAGTCACCCAGGTTCCCTGGCCCTCTGGGATCCGCAAAAGGACTATCCACGGTGA
AGAGTGGAAACAGGAGATAGCTGTGTTTCGGGATGCAAGCCGGTTCATTCTCAATCTC
ACAAAGCGTGAAGCCGGAAGACAGTGGCATCTACTTCTGCATGATCGTCGGGAGCCCCGAGC
TGACCTTCGGGAAGGAACTCAGCTGAGTGTGTTGATTTCCCTCCACCACTGCCAGCCC
ACCAAGAAGTCCACCCCTCAAGAAGAGAGTGTGCCGGTTACCCAGGCCAGAGACCCAGAAG
GGCCCACTTTGTAGCCCC

CD8B 跨膜结构域
(SEQ ID NO:62)

ATCACCCTTGGCCTGCTGGTGGCTGGCGTCTGGTTCTGCTGGTTTCCCTGGGAGTGGCCAT
C

CD8B 细胞内结构域
(SEQ ID NO:63)

CACCTGTGCTGCCGGGGAGGAGAGCCCGGCTTCGTTTCATGAAACAATTTACAAA

AGGGCTAAACGG

弗林蛋白酶切割位点 (SEQ ID NO:64)

GAATTCGGCTCCGGA

GSG接头 (SEQ ID NO:65)

GCCACTAATTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGAIGTTGAAAGAAAACCCCGGTCT P2A (SEQ ID NO:66)

ATGGCCACCGGCTCTAGAACAAGCCGTGCTGCTCGCTTTTGGCCCTGCTCTGCCTCCCATGGCTC HGH/SS/2 (SEQ ID NO:67)
CAAGAAGGATCTGCT

图7续

neoTCR TRB_VDJ
序列的插入位点

[[TRB_VDJ序列, 特异于 NeoTCR]]

CTGAAAACGTTCCCTCCAAAGTGGCCGTGTCGAGCCTTCTGAGCCGATCAGCC
 ACACACAGAAAGCCACACTCGTGTCTGGCTACCGGCTTCTACCCCGATCACGTGGAACCTG
 TCTTGGTGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTCTGA
 AAGAACAGCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCTGTCTAGCAGACTGAGAGTGTCCGC
 CACCTTCTGGCAGAACCCAGAAACCACTTCAGATGCCAGGTCCAGTTCTACGGCCTGAGCG
 AGAACGATGATGGACCCAGGACAGAGCCAAAGCCTGTGACACAGATCGTGTCTGCCGAAG
 CCTGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAAGCGAGTCATACCAGAGGCGTGTCTGTGC
 CACCATCCTGTATGAGATCCTGCTCGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGCTGGTGTCTGCTCT
 GGTGCTGATGGCTAIGTCTCCCGGGAGCGCATCCCCGAGGCC

弗林蛋白酶切割位点 (SEQ ID NO:70)

CGGGCCAAGCGG

GSG接头 (SEQ ID NO:71)

GGCAGCGGC

GCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGCGACGTGGAGGAGAAACCCCGGCCCT **P2A (SEQ ID NO:72)**

ATGGCCACAGGCAGCAGAACATCTCTGCTGCTGGCCTTCGGACTGCTGTCTGCCTTGGCT **HGH/SS/2 (SEQ ID NO:73)**

GCAAGAGGGTCCCGC

neoTCR TRA_VDJ
序列的插入位点

[[TRA_VDJ序列, 特异于 NeoTCR]]

ATATTAGAAACCCGATCCTGCTGTATCAGCTGCGGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGC **TCR-α / 恒定**
 GTGTGTTTGTTTC **(SEQ ID NO:75)**

图7续

TRAC CDS/右 HR 臂
(SEQ ID NO:76)

ACCGATTTGATTCTCAAAACAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTATATACAGAC
AAAAGTGTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGGCTGGAGCA
ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCCTTCAACAACAGCATTATCCAGAAGACACCTTCT
TCCCCAGCCCCAGG

右 HR 臂
(SEQ ID NO:77)

TAAGGGCAGCTTTGGTGCCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGCCAGGTTCTGCC
CAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACCTCTCTGATTGGTGTCTCGGCCCTTATCCATTGCC
ACCAAAACCCCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACAC
GGGAAAAAGCAGATGAAGAGAGAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCCAGCCTCAGTCT
CTCCAACTGAGTTCCTGCCTGCCCTTGTCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCTAGG
CCTCATTCTAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAATCTTT
CCCAGTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGG
CACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCA
GAGGAGCACCATTTAGTTGGGGAGCCCCATCTGTCAAGTGGGAAAAGTCCAAAATAACTT
CAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAG
GGAAGGGCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAG
GACCCTATAGAGGCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAAGGAGAAAGAGCAGGCGCATGA
GTTGAATGAAGGAGGCGGGGTCACAGGGCCCTTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAG

(SEQ ID NO:78)

GCTAGC

图7续

pBR322_起点
(SEQ ID NO:79)

CGGTTGCTGGGTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCT
 CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGGAAG
 CTCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCGCTACCGGATAACCTGTCCGCCCTTCTCCCT
 TCGGGAAGCGTGGCGCTTTCATAGCTCACGCTGATGATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTT
 CGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGG
 TAACTATGCTTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATGCCACTGGCAGCAGCCACTG
 GTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGTACAGAGTTCCTTGAAGTGGTGCC
 TAACTACGGCTACACTAGAAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTT
 CGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCCCGCTGGTAGCGGTGGTTTT
 TTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGGCGCAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT

卡那霉素抗性
(KanR2) (SEQ ID NO:80)

TTAGAAAACATCATCGAGCATCAAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCA
 TATTTTGA AAAAGCCGTTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTACCCGAGGCAGTTCATAGGAT
 GGCAAGATCCTGTAICGCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCC
 CCTCGTCAAAAATAAGTTATCAAGTGAGAAATCACCAATGAGTGACGACTGAATCCGGTGA
 GAATGGCAAAAAGTTATGCAATTTCTTCCAGACTTGTTCAAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTC
 ATCAAAATCAGCTCGCATCAACCAACCGTTATTCATTCTGATTGCGCCTGAGCCAGACGAAA
 TACGCGATCGCTGTAAAAGGACAATTACAACAGGAATCGAATGCAACCCGGCAGGAAAC
 ACTGCCAGCGCATCAACAATAITTTTCCCTGATCAGGATATCTTCTAATACCTTGGAAATGCTG
 TTTTCCGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAAATGCTTG
 ATGGTCGGAAGAGGCATAAAATCCGTCAGCCAGTTAGTCTGACCAATCTCATCTGTAACATCA
 TTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGTTCCTCCATAACAAG
 CGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACATTAATCGCGAGCCCAATTAATACCCATATAAATCAG
 CATCCATGTTGGAATTTAATCGGGGCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCAT

卡那霉素启动子
(SEQ ID NO:81)

AACACCCCTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTCAATGATGATAATAATTTTATC
 TTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC

图7续

CD8 产物 3 产物核酸序列

ACATTAACAACAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAAAGC
 CTCCAGCAGCTCCTGCTTTCTGAGGGTGAAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGACTCACTA
 GCACTCTATCAGGCCATATCTGGCAGGGTCAGTGGCTCCAACCTAACATTTGTTGGTACTT
 TACAGTTTATTAATAGATGTTTATATGGAGAAGCTCTCATTCTTCTCAGAAGAGCCTGGCT
 AGGAAGTGGATGAGGCACCAATATTCATTTGCAAGGTGAAATTCCTGAGATGTAAGGAGCT
 GCTGTACTTGCTCAAGGCCTTATAICGAGTAAACGGTAGTGTGGGCTTAGACGCAGGTG
 TTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCTGTAATGTGATAGATTT
 CCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGA
 GACCACTCCAGATCCAAGATGTACAGTTTGTCTTGTGGGCTTTTCCCATGCCCTGCCTTTA
 CTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAGAATAAGCAGT
 ATTATTAAGTAGCCCTGCATTTACAGTTTCCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCTGGCCGTGAACG
 TTCACTGAAATCATGGCCCTCTGGCCAAAGATTGATAGCTTGTCCCTGTCCCTGAGTCCCGATC
 CATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCCGTGACTTGCC
 AGCCCCACAGAGCCCCCCTTGTCCATCACTGGCACTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCA
 AAGAGGGAAATGAGATCAITGTCCTAACCCCTGATCCTCTTGTCACACAG

左 HR 臂 (SEQ ID NO:83)

TRAC CDS (SEQ ID NO:84)

ATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTG
 TCTGCCTATTC

GSG 接头 1 (SEQ ID NO:85)

GAATTCGGCTCCGGA

P2A (SEQ ID NO:86)

GCCACTAACTTCAGCCTGTTGAAGCAGGCCGGCAGCTTGAGGAAAACCCCGGTCCT

图8

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCC
CD8A 信号肽
 (SEQ ID NO:87)
 G

AGCCAGTCCGGGTGTCGCCGCTGGATCGGACCTGGAACCTGGGCGAGACAGTGGAGCTG
 AAGTGCCAGGTGCTGTCCAACCCGACGTCGGGCTGCTCGTGGCTCTCCAGCCGCGCG
CD8A 细胞外结构域
 (SEQ ID NO:88)
 GCGCCGCCAGTCCACCTTCTCTATACCTCTCCAAACAAGCCCAAGCGGCCGAG
 GGGCTGGACACCCAGCGGTTCTCGGGCAAGAGTTGGGGACACCTTCGTCTCACCCCTG
 AGCGACTTCGCCGAGAGAACGAGGGCTACTATTCTGCTCGGCCCTGAGCAACTCCATCAT
 GTACTTCAGCCACTTCGTGCCGGTCTTCTGCCAGCGAAGCCACACGACGCGGCCGCG
 GACCACCAACACCGGCCACCATCGCTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCCAAGGCGGTG
 CCGGCCAGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGTGGACTTCGCCTGTGAT

ATCTACATCTGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTTGGGTCCTTCTCTGCTCACTGGTTATCACC
CD8A 跨膜结构域
 (SEQ ID NO:89)
 CACCTGTGCTGCCGGGAGGAGAGCCCGGCTTCGTTTCATGAAACAATTTACAAA
CD8B 细胞内结构域
 (SEQ ID NO:90)
 AGGGCTAAACGG
 弗林蛋白酶切割位点 (SEQ ID NO:91)
 GAATTCGGCTCCGGA
 GSG接头 (SEQ ID NO:92)

GCCACTAACTTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAGAAAACCCCGGTCTT
P2A (SEQ ID NO:93)

ATGGCCACCGGCTAGAACAAAGCCTGCTCGCTTTTGGCCCTGCTCTGCCCTCCCATGGCTC
HGH/SS/2 (SEQ ID NO:94)
 CAAGAAGGATCTGCT

图8续

neoTCR TRB_VDJ
序列的插入位点

[[TRB_VDJ序列, 特异于 NeoTCR]]

CTGAAAAACGTGTTCCCTCCAAAGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCC
 ACACACAGAAAGCCACACTCGTGTCTGGCTACCGGCTTCTACCCCGATCACGTGGAAGCTG
 TCTTGGTGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTCTGA
 AAGAACAGCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCTGTCTAGCAGACTGAGAGTGTCCGC
 CACCTTCTGGCAGAACCCAGAAACCACTTCAGATGCCAGGTCCAGTTCTACGGCCTGAGCG
 AGAACGATGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAAGCCTGTACACAGATCGTGTCTGCCGAAG
 CCTGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTACCAGCGAGTCATACCAGCAGGGCGTGTCTGTC
 CACCATCCTGTATGAGATCCTGCTCGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGCTGGTGTCTGCTCT
 GGTGCTGATGGCTATGTTCTCCCGGGAGCGCATCCCCGAGGCC

TCR-β / 恒定 (SEQ ID NO:96)

CGGGCCAAGCGG

弗林蛋白酶切割位点 (SEQ ID NO:97)

GGCAGCGGC

GSG接头 (SEQ ID NO:98)

GCCACCAACTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAAACCCCGGCCCT P2A (SEQ ID NO:99)

ATGGCCACAGGCAGACAATCTCTGCTGCTGGCCCTTCGGACTGCTGTCTGCCTTGGCT HGH/SS/2 (SEQ ID NO:100)

GCAAGAGGGTCCGCC

neoTCR TRA_VDJ序列的插入位点

[[TRA_VDJ序列, 特异于 NeoTCR]]

ATATTAGAAACCCGATCCTGCTGTGTATCAGCTGCGGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGC TCR-α / 恒定
 GTGTGTTTGTTC (SEQ ID NO:102)

图8续

TRAC CDS/右 HR 臂
(SEQ ID NO:103)

ACCGATTTGATTCTCAAAACAATGTGTCAAAAAGTAAAGGATTCTGATGTATATACAGAC
AAAACGTGTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGTGGCCCTGGAGCA
ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCT
TCCCCAGCCCCAGG

右 HR 臂
(SEQ ID NO:104)

TAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTCCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCC
CAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGTCTCGGCCCTTATCCATTGCC
ACCAAAACCCCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACAC
GGGAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCT
CTCCAACTGAGTTCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCTAGG
CCTCATTCTAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCCCTCCTTATTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTT
CCCAGTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGG
CACATGAATGCACCAGGTGTTGAAAGTGGAGGAATAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCA
GAGGAGCACCATTTAGTTGGGGAGCCCATCTGTCAAGTGGAAAAGTCCAAATAACTT
CAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAG
GGAAGGGCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAG
GACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAAGGAGAAGAGCAGCAGGCATGA
GTTGAATGAAGGAGGCAGGGCCGGTCCACAGGGCCCTTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAG

(SEQ ID NO:105)

GCTAGC

图8续

pBR322_起点
(SEQ ID NO:106)

CGCGTTGCTGGCGTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCT
CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAG
CTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCCTTACCGGATACCTGTCCGCCCTTCTCCCT
TCGGAAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGGTGAGGTCGTT
CGCTCCAAGCTGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCGACCCGCTGCGCCTTATCCGG
TAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG
GTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCC
TAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTT
CGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAACCCCGCTGGTAGCGGTGGTTTT
TTTGTTCGCAAGCAGCAGATTACGGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAGATCCTTTGATCT

卡那霉素抗性
(KanR2) (SEQ ID NO:107)

TTAGAAAACATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCA
TATTTTTGAAAAAGCCGTTCTGTAAATGAAGGAGAAAACCTACCGAGGCAGTTCATAGGAT
GGCAAGATCCTGTTATCGTCTCGGATCCGACTCGTCCAACATCAATAACAACCTATTAATTC
CCCTCGTCAAAAATAAGTTATCAAGTGAAGAAATCACCATGAGTACGACTGAATCCGGTGA
GAATGGCAAAAAGTTATGCAATTTCTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTC
ATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCCAGACGAAA
TACGCGATCGCTGTAAAAGGACAATTACAAAACAGGAATCGAATGCAACCCGGCGCAGGAAC
ACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATCTTCTAATACCTGGAATGCTG
TTTTTCCGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAAATGCTTG
ATGGTCGGAAGAGGCATAAAATCCGTCCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCA
TTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTTCAGAAACAACCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAG
CGATAGATTGCGCACCTGATTGCCCGACATTAATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAG
CATCCATGTTGGAATTAATCGCGGCCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCAT

卡那霉素启动子
(SEQ ID NO:108)

AACACCCCTTGTTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATC
TTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC

图8续

CD8 产物 4 产物核酸序列

ACATTAACAACACAAATCCTACGGAATACTACGGAATACTGAGATGAGTCTCAGCACTAAGGAAAAGC
 CTCCAGCAGCTCCTGCTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGACTCACTA
 GCACTCTATCAGCGCCATATCTGGCAGGGTCAGTGGCTCCAACCTAACATTTGTTTGGTACTT
 TACAGTTTATTAATAAGATGTTTATATGGAGAAGCTCTCATTTCTTCTCAGAAGAGCCTGGCT
 AGGAAGGTGGATGAGGCACCATAATTCATTTGCAGGTGAAATCCTGAGATGTAAGGAGCT
 GCTGTACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGTGGGGCTTAGACGCAGGTG
 TTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGCAATCTCTGGTAATGTGATAGATTT
 CCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATCTGCTAATGCCAGCCTAAGTTGGGGA
 GACCACTCCAGATCCCAAGATGTACAGTTTGTCTGGGCTTTTCCCATGCCTGCCTTTA
 CTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAGAATAAGCAGT
 ATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAAGTTTCCCTTGAAGTGGCAGGCCAGGCCCTGGCCGTGAACG
 TTCACTGAAATCATGGCCCTCTGGCCAAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTC
 CATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCC
 AGCCCCACAGAGCCCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCA
 AAGAGGGAAATGAGATCATGTCTTAACCCCTGATCCTCTTGTCCACACAG

左 HR 臂
 (SEQ ID NO:110)

ATATCCAGAAACCCTGACCCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAAGTCTG
 TCTGCCTATTC

TRAC CDS (SEQ ID NO:111)

GSG 接头 1 (SEQ ID NO:112)

GAATTCGGCTCCGGA

P2A (SEQ ID NO:113)

GCCACTAACTCAGCCTGTTGAAGCAGGGCCGGCAGCGTTGAGGAAAACCCCGGTCCT

图9

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCGGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCGCAGGCC
 CD8A 信号肽
 (SEQ ID NO:114)
 G
 AGCCAGTTCGGGTGTCCGGCTGGATCGGACCTGGAACCTGGCGGAGACAGTGGAGCTG
 AAGTGCCAGGTGCTGTCCAACCCGACGTCGGGCTGCTCGTGGCTCTCCAGCCGCGCG
 GCGCCGCCAGTCCACCTTCCCTATACTCTCCAAACAAAGCCCAAGGGCGCCGAG
 GGGCTGGACACCCAGCGGTTCTCGGGCAAGAGGTTGGGGACACCTTCGTCCTCACCCCTG
 CD8A 细胞外结构域
 (SEQ ID NO:115)
 AGCGACTTCGCCGAGAGAACGAGGGTACTATTTCTGCTCGGCCCTGAGCAACTCCATCAT
 GTACTTCAGCCACTTCGTGCCGTCTTCTGCGAGCGAAGCCCAACGACGCGCCAGCGCCGC
 GACCACCAACACCGGCCACCATCGCTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCCAAGAGCGGTG
 CCGGCCAGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT
 CD8A 跨膜结构域
 (SEQ ID NO:116)
 ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCC
 CD8A 细胞内结构域
 (SEQ ID NO:117)
 TGTGTCAGGTGCCCGCACCGAAGGCCCAAGCAGAGCGGATGTCTCAGATCAAGAGACTCC
 TCAGTGAGAAAGAACCTGCCAGTGTCTCACCCGGTTTCAGAAAGACATGTAGCCCCCATT
 弗林蛋白酶切割位点 (SEQ ID NO:118)
 AGGGCTAAACGG
 GSG 接头 (SEQ ID NO:119)
 GAATTCGGCTCCGGA
 P2A (SEQ ID NO:120)
 GCCACTA ACTTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAGAAACCCCGGTCCT
 HGH/SS/2 (SEQ ID NO:121)
 ATGGCCACCGGCTAGAAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGCCCTGCTCTGCCCTCCCATGGCTC
 CAAGAAGGATCTGCT

图9续

neoTCR TRB_VDJ
序列的插入位点

[[TRB_VDJ序列, 特异于 NeoTCR]]

CTGAAAACGTGTTCCCTCCAAAAGTGGCCGTGTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCC
ACACACAGAAAGCCACACTCGTGTCTGGCTACCGGCTTACCCCGATCACGTGGAACCTG
TCTTGGTGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTCTGA
AAGAACAGCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCTGTCTAGCAGACTGAGAGTGTCCGC
CACCTTCTGGCAGAACCCAGAAACCCTTCAGATGCCAGGTCCAGTTCTACGGCCTGAGCG
AGAACGATGAGTGGACCCAGGACAGAGCCCAAGCCTGTGACACAGATCGTGTCTGCCGAAG
CCTGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTACCAGCGAGTCAATACCAGAGGCGGTGTCTGTGC
CACCATCTGTATGAGATCCTGCTCGGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGTGGTGTCTGTCTCT
GGTGTGATGGCTATGTTCTCCCGGAGCGCATCCCCGAGGCC

弗林蛋白酶切割位点 (SEQ ID NO:124)

CGGGCCAAGCGG

GSG接头 (SEQ ID NO:125)

GGCAGCGGC

GCCACCAACTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCAGCGTGGAGGAGAACCCCGGCCCT P2A (SEQ ID NO:126)

ATGGCCACAGGCAGCAGAACATCTCTGCTGCTGGCCTTCGGACTGCTGTGTCTGCCTTGGCT HGH/SS/2 (SEQ ID NO:127)

GCAAGAGGGTCCGCC

neoTCR TRA_VDJ
序列的插入位点

[[TRA_VDJ序列, 特异于 NeoTCR]]

ATATTAGAAACCCCGATCCTGCTGTATCAGCTGCGCGACAGCAAGAGCAGCGACACAAGAGC TCR-α / 恒定
GTGTGTTTGTTC (SEQ ID NO:129)

图9续

TRAC CDS/右 HR 臂
(SEQ ID NO:130)

ACCGATTTTGATTCTCAAACAATGTGCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGAC
AAAACTGTGCTAGACATGAGGCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTCTGTGGCCTGGAGCA
ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCT
TCCCCAGCCCCAGG

右 HR 臂
(SEQ ID NO:131)

TAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCC
CAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCC
ACCAAACCCCTCTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAAATGACAC
GGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAAGGTGGCAGGAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCT
CTCCAACTGAGTTCCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGGCCCTTACTGCTCTTCTAGG
CCTCATTCTAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCCCTCTCCTTAITTTCTCCCTGTCTGCCAAAAATCCTT
CCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAAACCCACCACTGATTGTGCCGG
CACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAATAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCA
GAGGAAGCACCATTTAGTTGGGGAGCCCATCTGTCAAGTGGGAAAAGTCCAAATAACTT
CAGATTGGAAATGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAAGTCAG
GGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAG
GACCCTATAGAGCCTGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGAGAAAGCAGCAGGCATGA
GTTGAATGAGGAGGCCAGGGCCGGTCCACAGGGCCTTCTAGGCCATGAGAGGGGTAGACAG

(SEQ ID NO:132)

GCTAGC

图9续

pBR322_起点
(SEQ ID NO:133)

CGCGTTGCTGGCGTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCT
CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATAACACGAGGCTTCCCCCTGGAAG
CTCCCTGTCGCTCCTGTCCGACCCTGCCCTTACCCGGATACCTGTCCGCCCTTCTCCCT
TCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGTAICTCAGTTCGGTGTAGGTCGTT
CGTCCAAAGCTGGGCTGTGTCACGAACCCCGTTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGG
TAACTATCGTCTTGAGTCCAAACCCGGTAAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG
GTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTCTTGAAAGTGGTGGCC
TAACTACGGCTACACTAGAAAGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTT
CGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACACCCCGCTGTAGCGGTGGTTTT
TTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAGATCCCTTTGATCT

卡那霉素抗性
(KanR2) (SEQ ID NO:134)

TTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCA
TATTTTGA AAAAGCCGTTCTGTATGAAAGGAGAAACTCACCGAGGCAGTCCATAGGAT
GGCAAGATCCTGGTATCGGCTGCGATTCCGACTCCGTCACATCAATACAACTTAAATTC
CCCTCGTCAAAAATAAGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGA
GAATGGCAAAAAGTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTC
ATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCCAGACGAAA
TACGCGATCGTGTAAAAGGACAATTACAACAGGAATCGAATGCAACCCGGCGCAGGAAC
ACTGCCAGCGCATCAACAATAATTTACCTGAATCAGGATAATCTCTAATAACCTGGAAATGCTG
TTTTTCCGGGATCGCAGTGGTGTAGTAAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAAATGCTTG
ATGGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCA
TTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAAACAACCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAG
CGATAGATTGTCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCAATTAACCCATATAAAATCAG
CATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCCTCGACGTTTCCCGTTGAAATATGGCTCAT

卡那霉素启动子
(SEQ ID NO:135)

AACACCCCTGTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTTATTTGTTTCATGATGATATATTTTTATC
TTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC

图9续

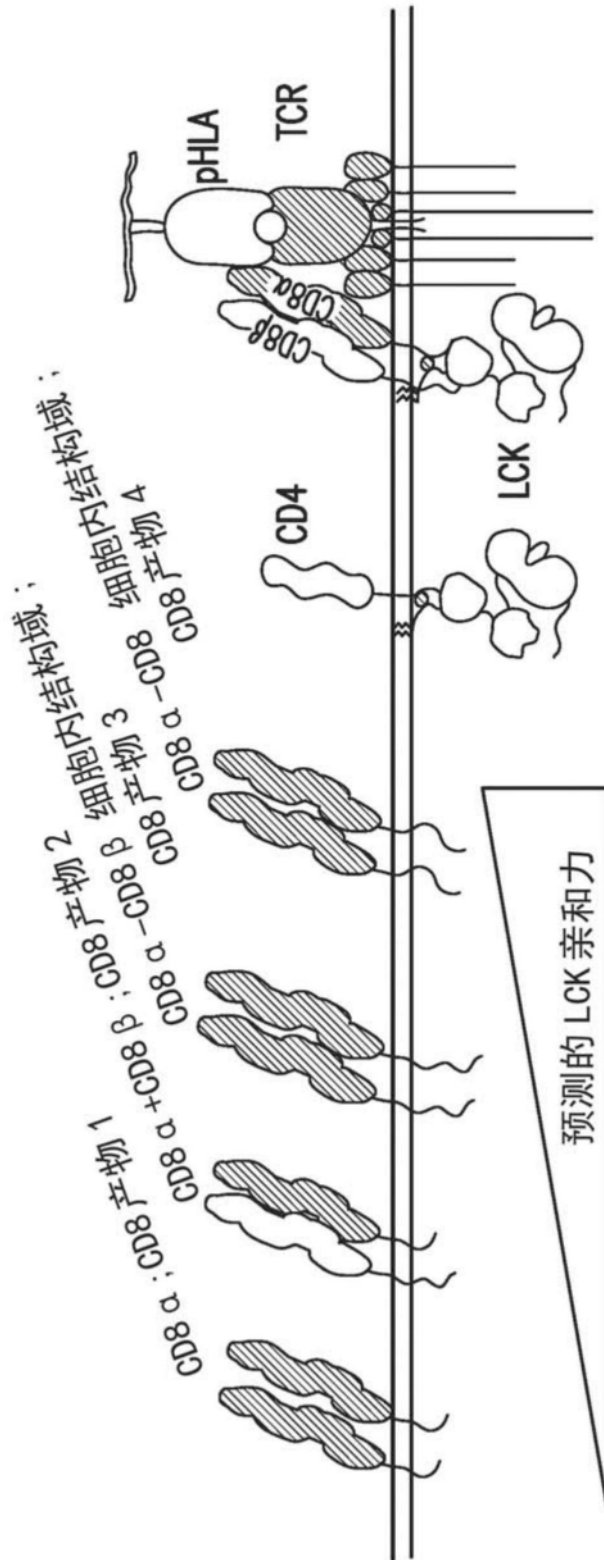


图10

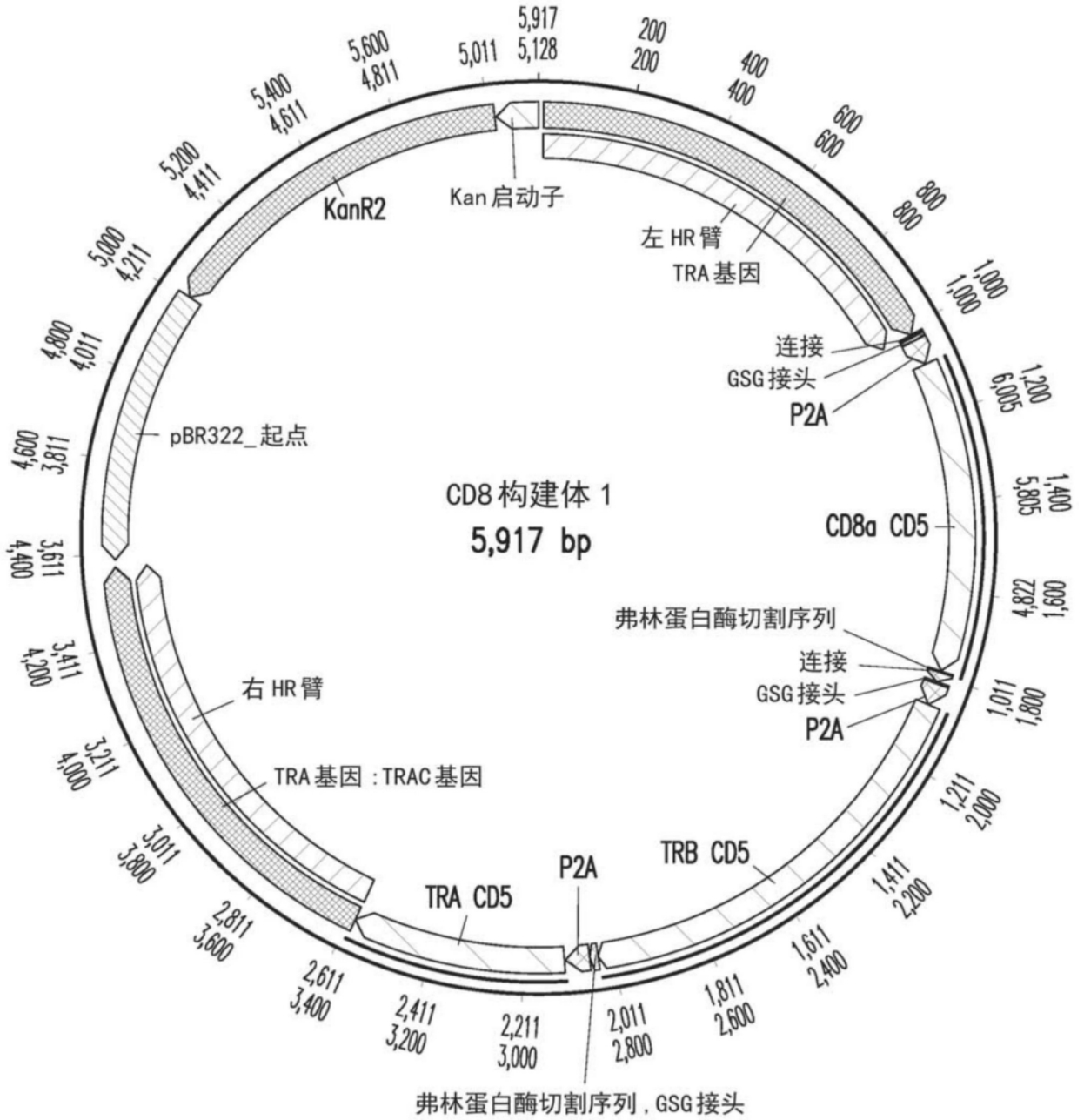


图11A

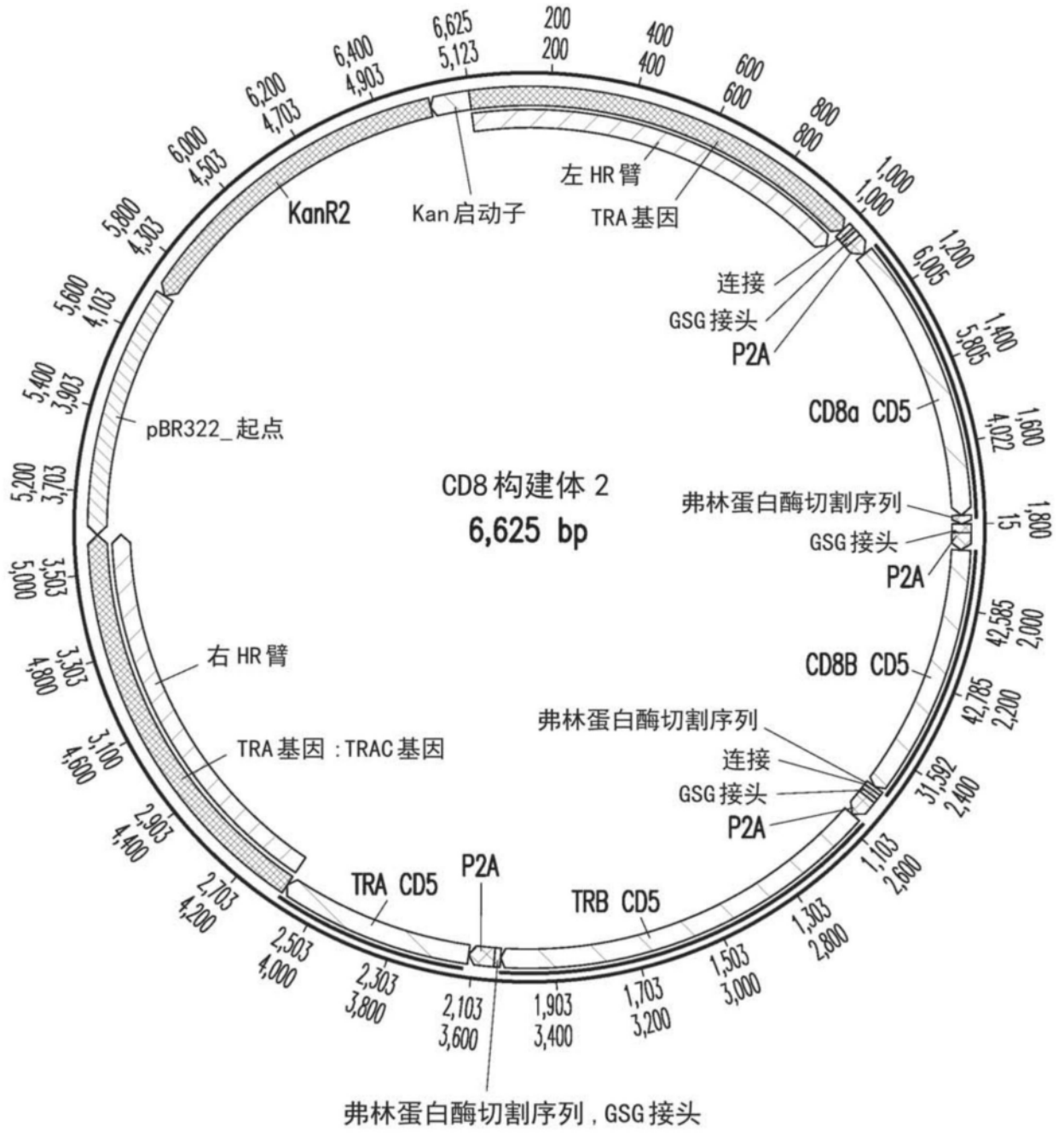


图11B

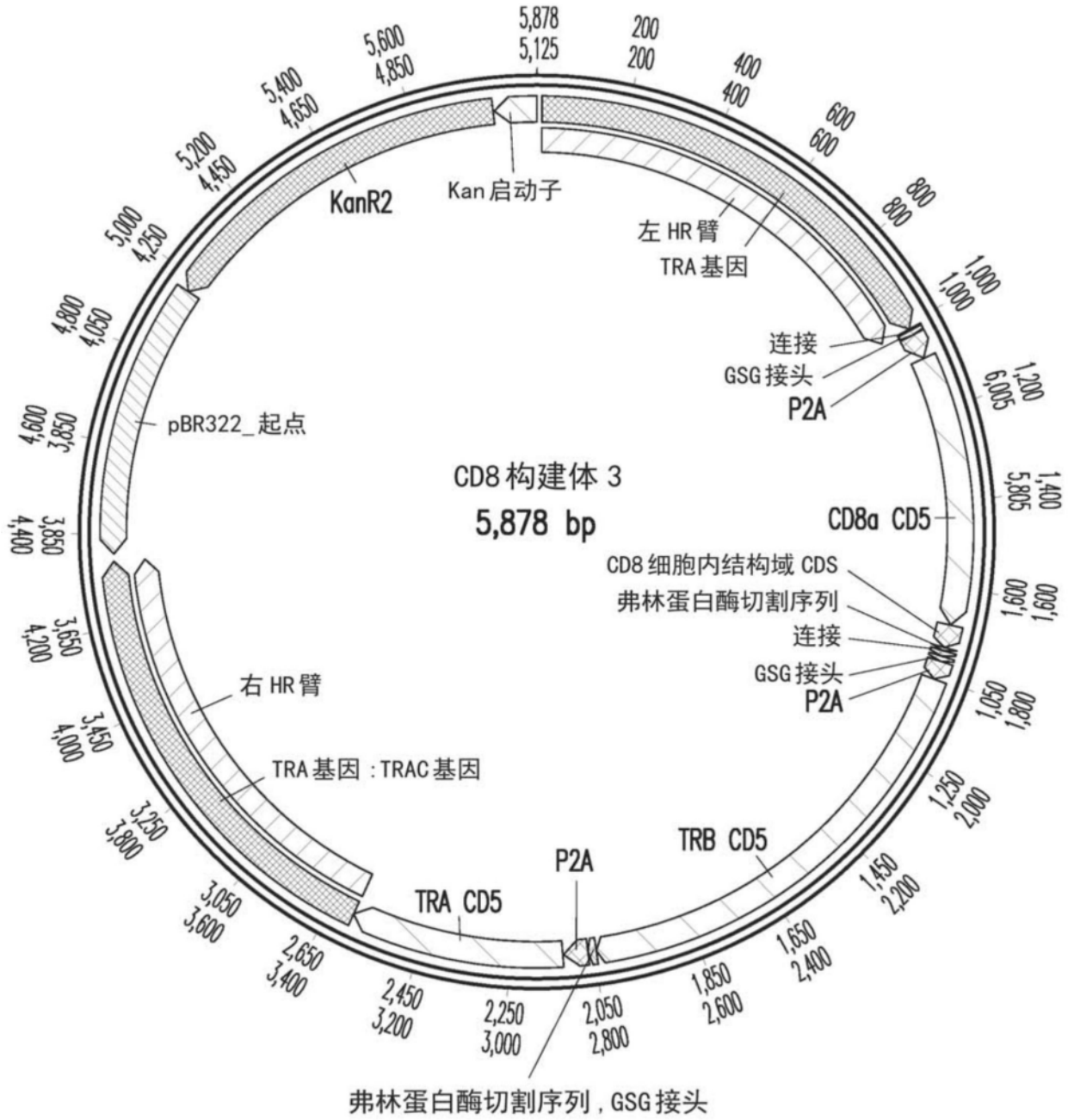


图11C

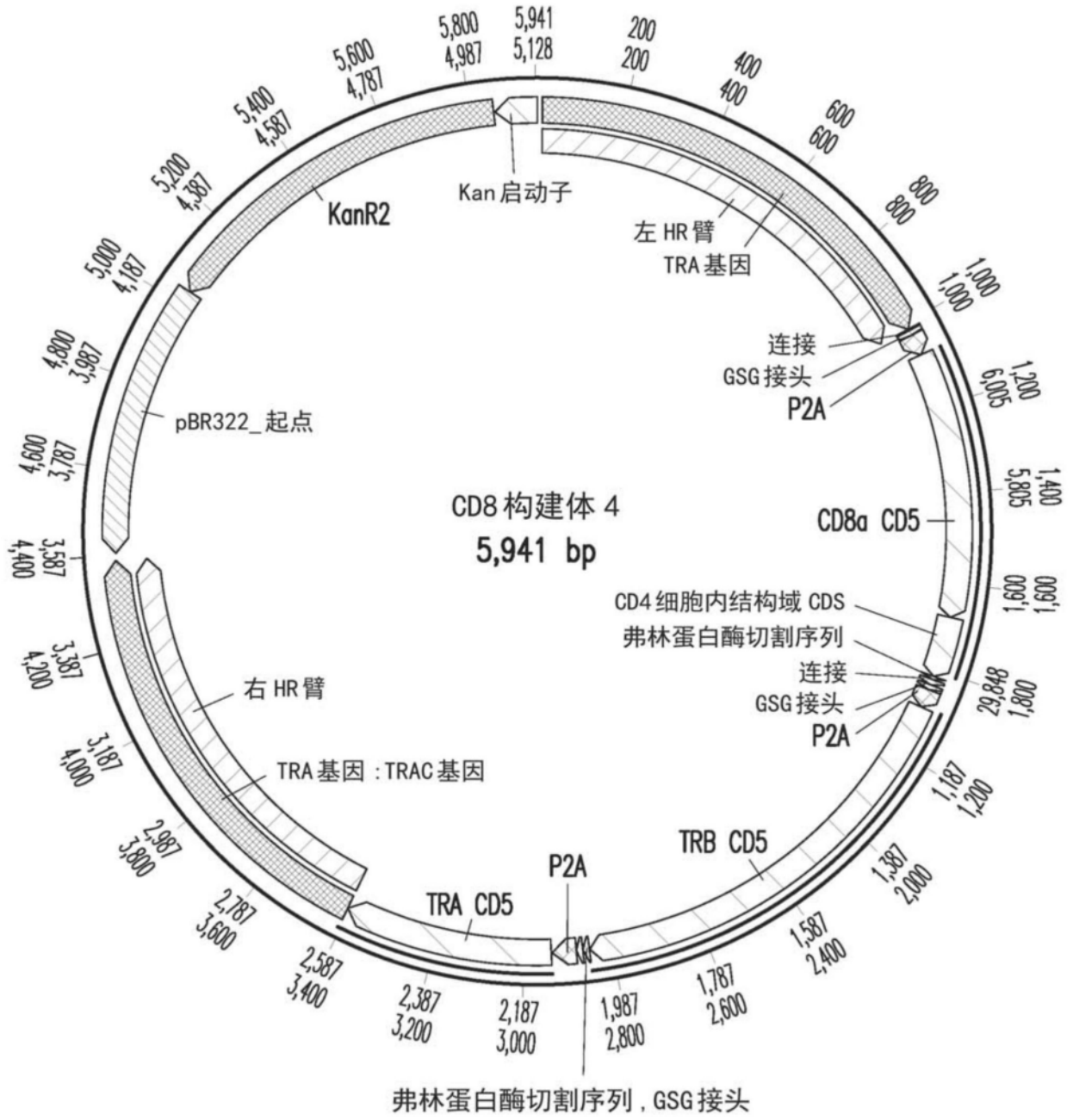


图11D

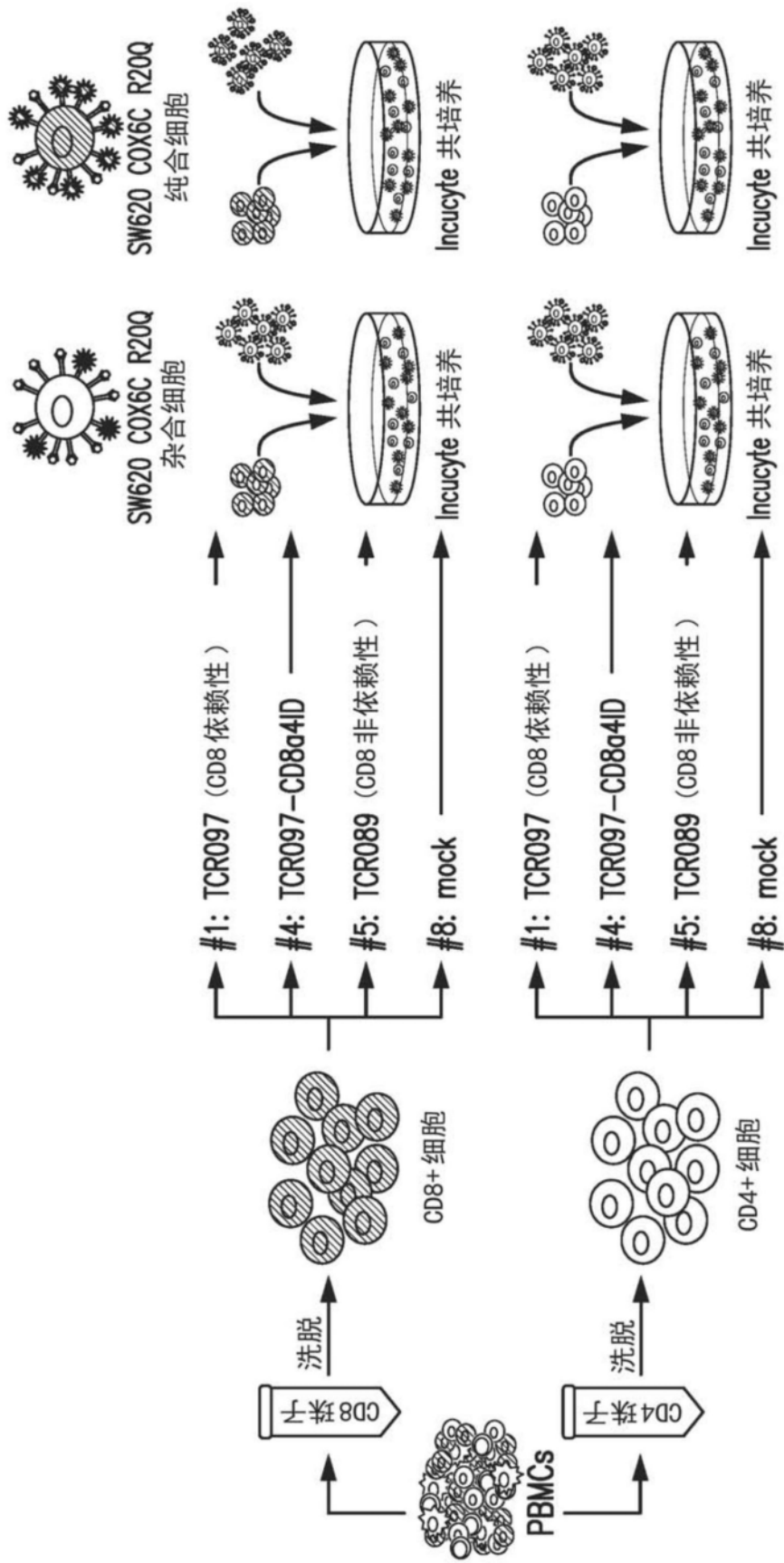


图12

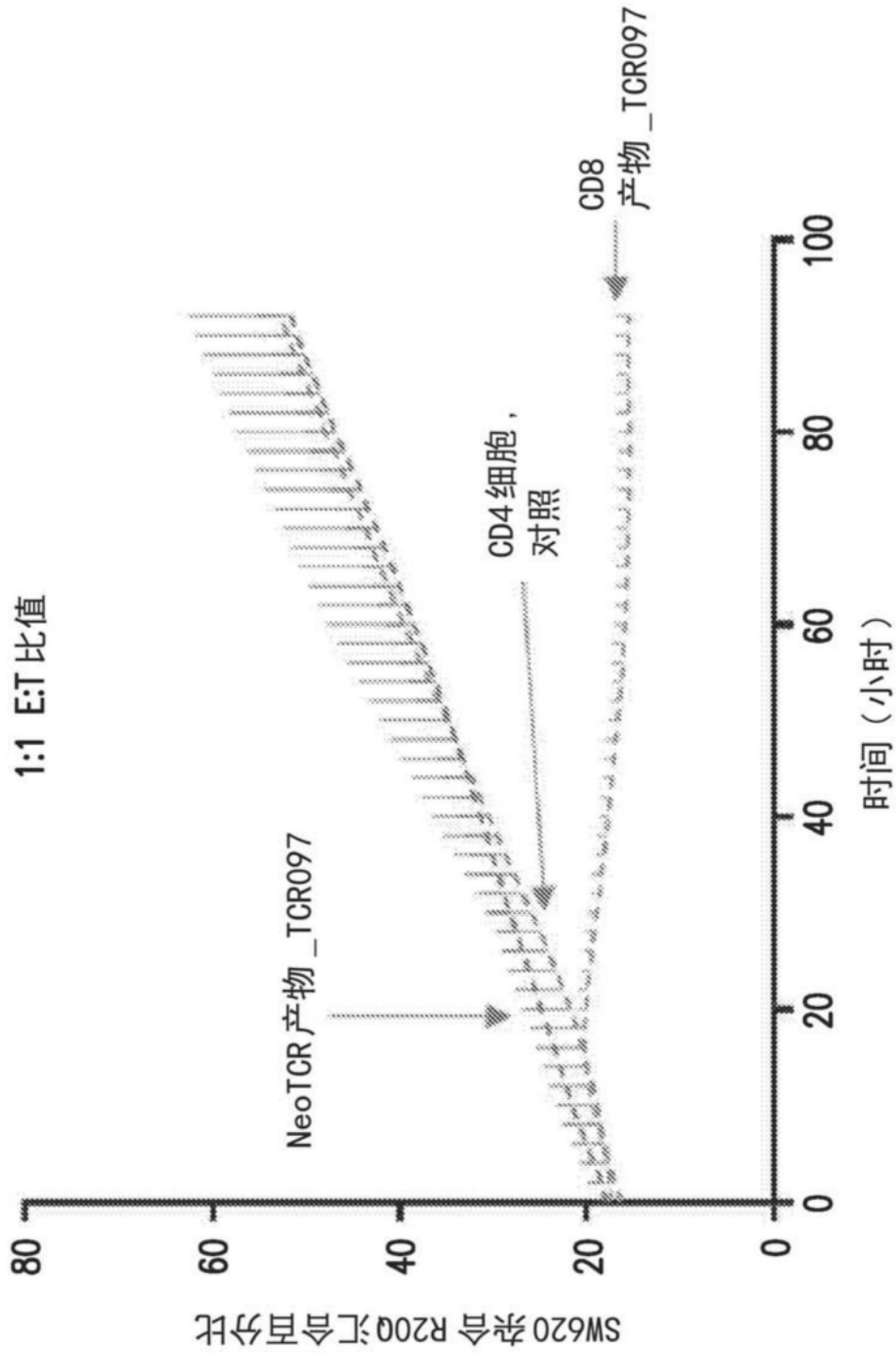


图13A

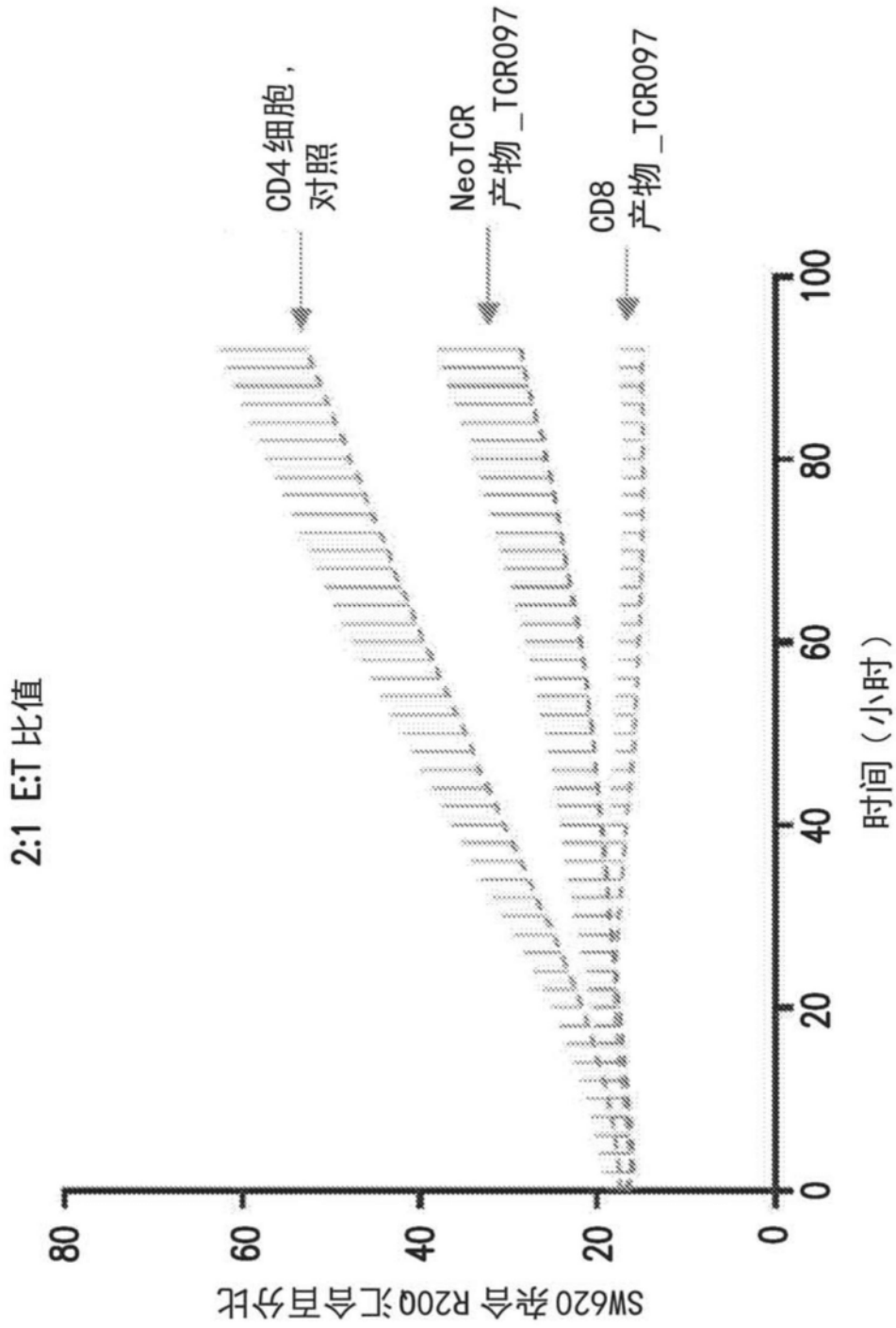


图13B

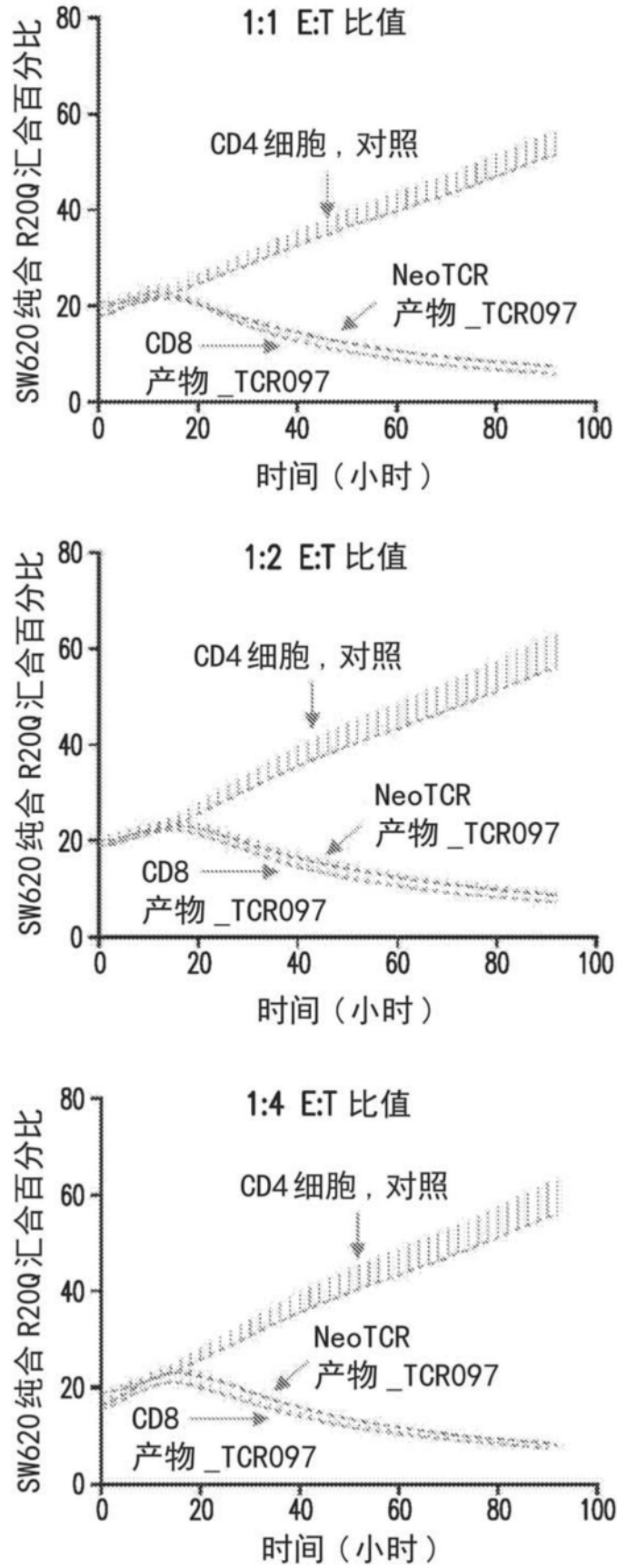


图14

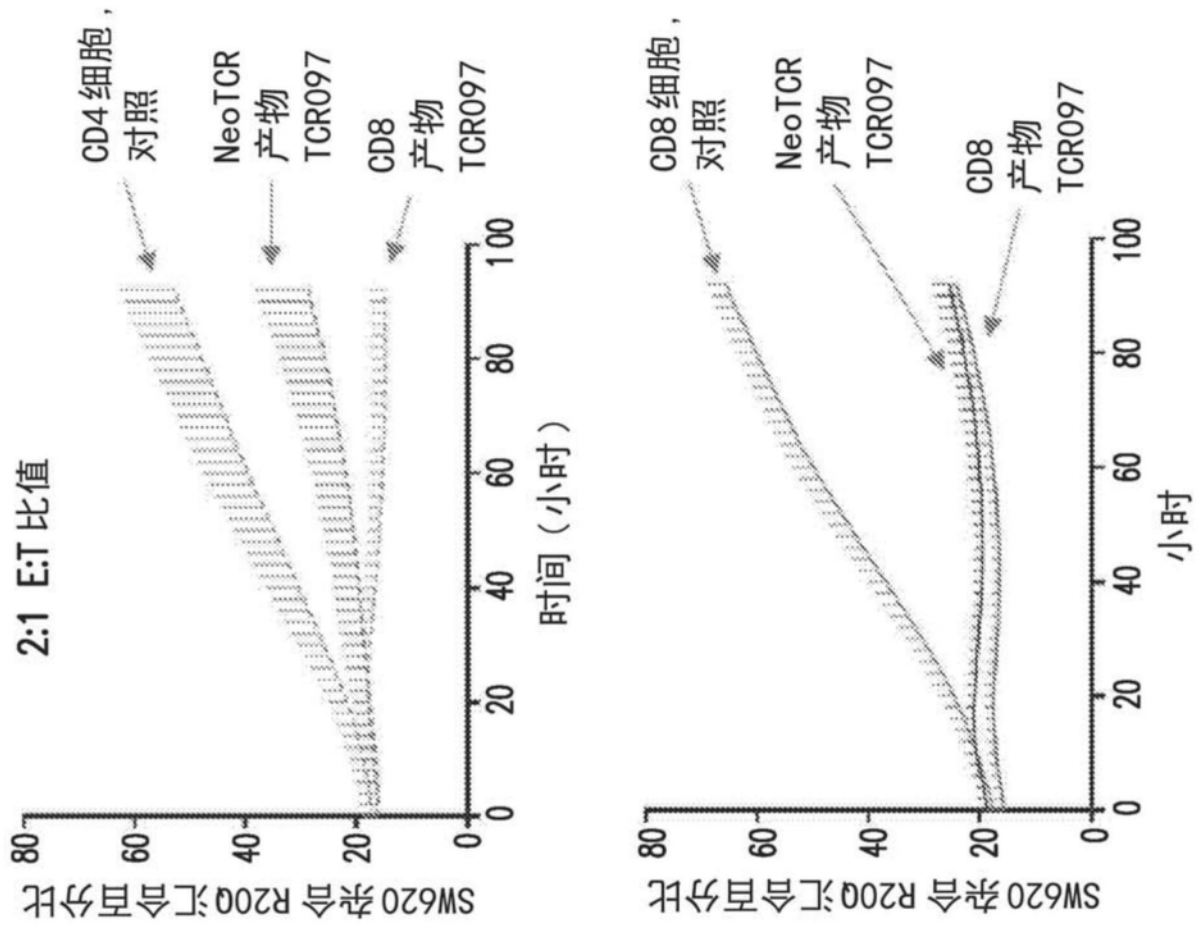


图15A

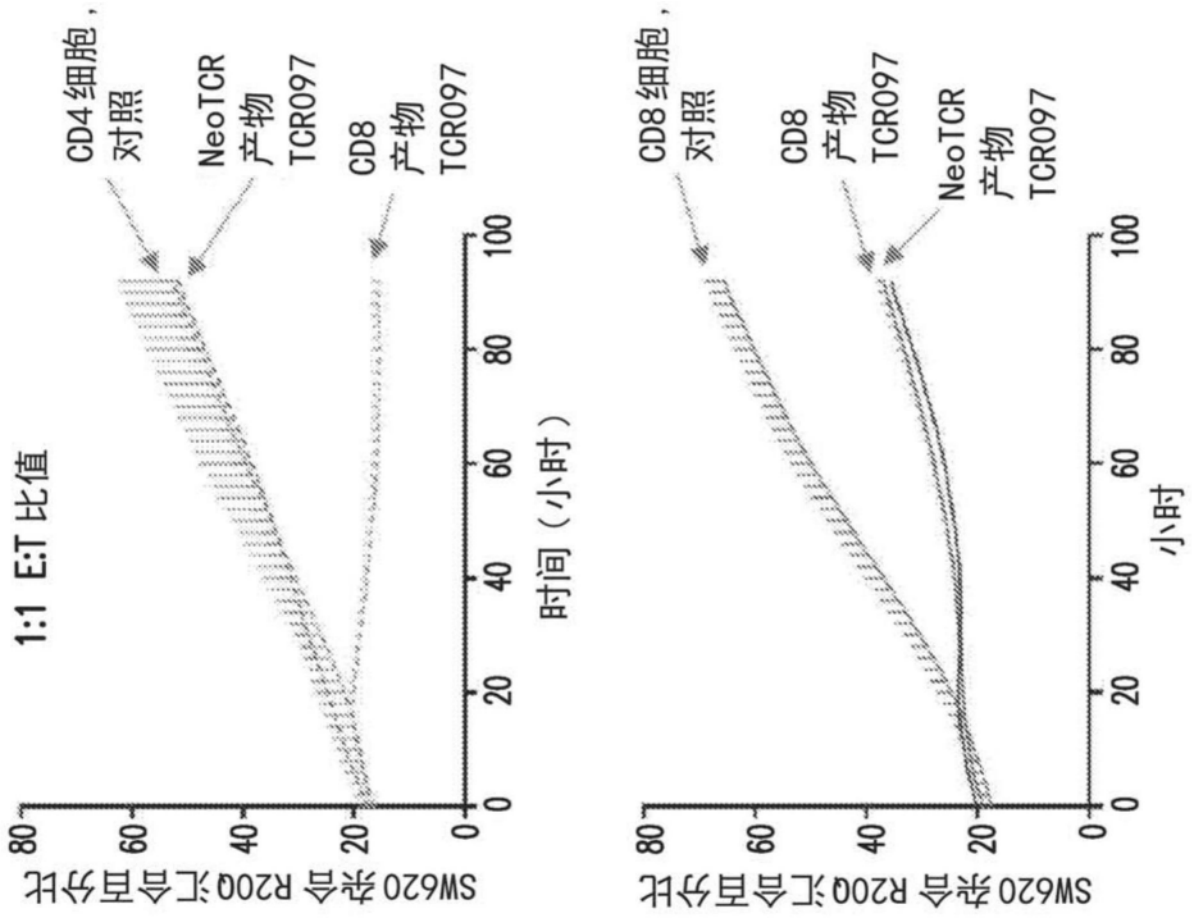


图15B

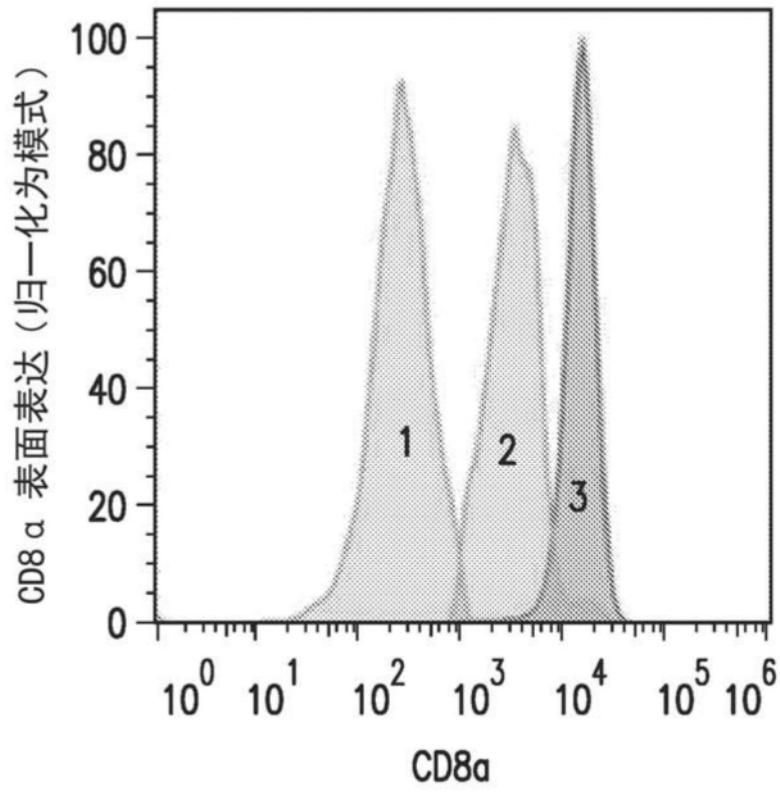


图16

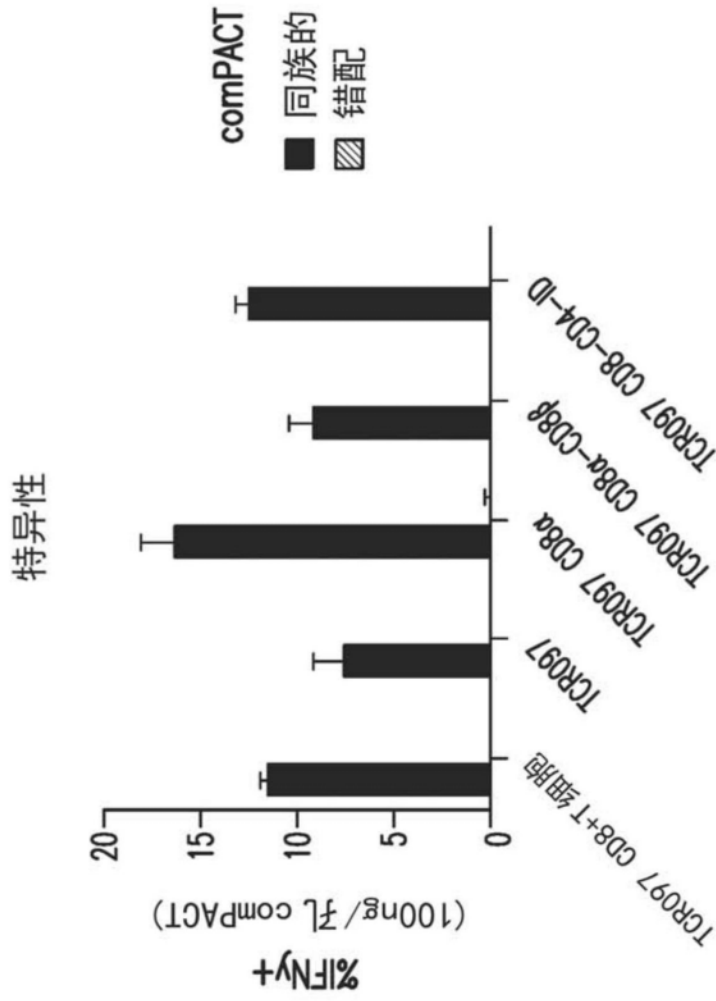


图 17B

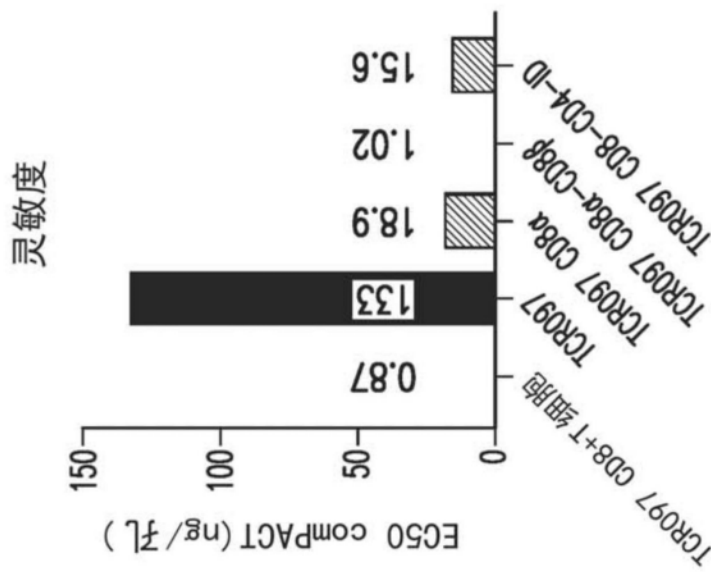


图 17A

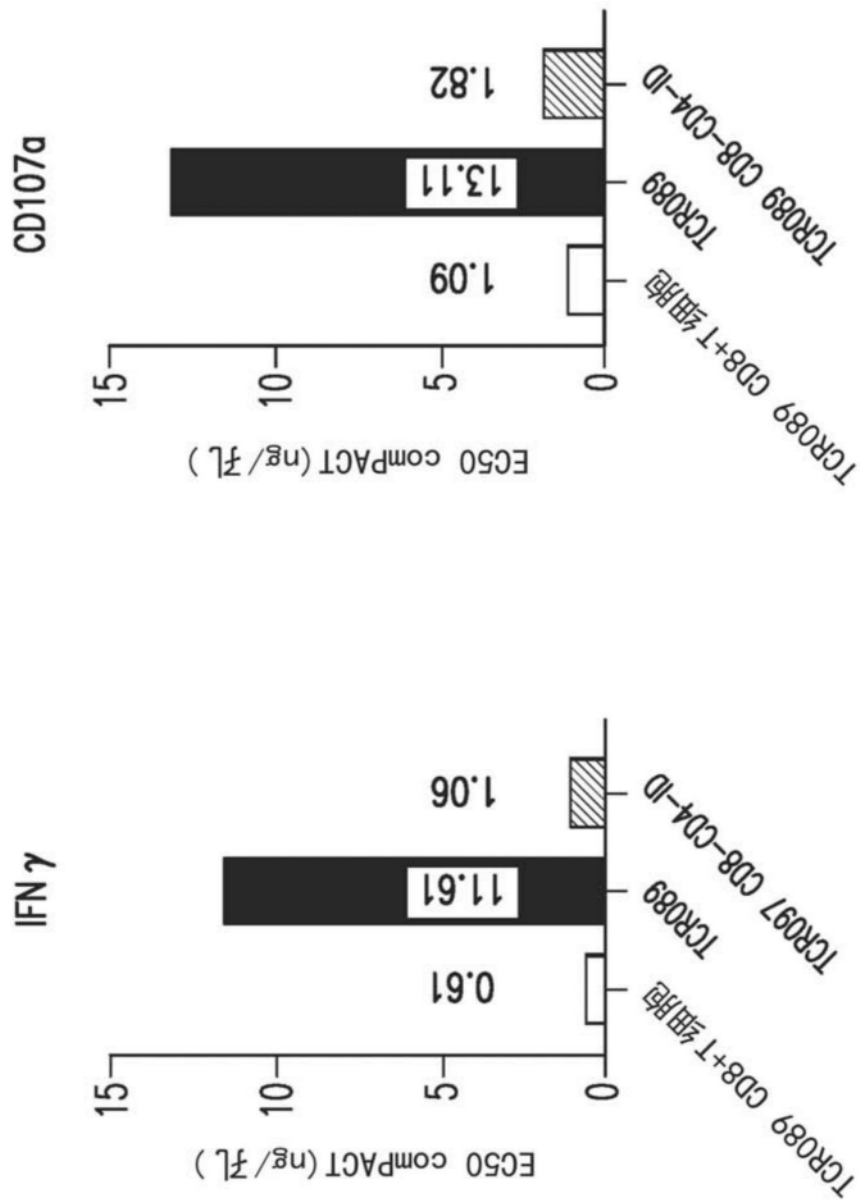


图18