



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112752838 A

(43) 申请公布日 2021.05.04

(21) 申请号 201980062820.4

(22) 申请日 2019.07.26

(30) 优先权数据

2018-140523 2018.07.26 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/029537 2019.07.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/022512 JA 2020.01.30

(71) 申请人 国立大学法人京都大学

地址 日本国京都府

申请人 国立大学法人滋贺医科大学

(72) 发明人 河本宏 县保年 永野诚治

寺田晃士 增田乔子

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 张莹

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

C12N 5/0789 (2006.01)

A61K 35/545 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

权利要求书3页 说明书30页
序列表11页 附图26页

(54) 发明名称

制备引入外源抗原受体的细胞的方法

(57) 摘要

本文提供了一种制备导入抗原特异性受体基因的细胞的方法,该方法包括将外源TCR或CAR基因引入到材料细胞中,以使所引入的基因在材料细胞的T细胞受体表达控制系统下表达的步骤;以及提供一种用于引入外源抗原受体基因的材料细胞,所述材料细胞在其基因组的TCR基因座中,从上游到下游包括TCR基因座的V区启动子,耐药基因或报告基因,或已知的TCR或CAR基因,TCR基因座的C区增强子。

1. 一种制备导入抗原特异性受体基因的细胞的方法,该方法包括将外源TCR或CAR基因引入到材料细胞中,以使所引入的基因在材料细胞的T细胞受体表达控制系统下表达的步骤。

2. 根据权利要求1的方法,其中所述材料细胞的基因组中的T细胞受体基因尚未重排。

3. 根据权利要求1或2的方法,其中所述材料细胞是多能干细胞。

4. 根据权利要求1-3中任一项的方法,其中所述外源TCR或CAR基因通过重组酶-介导盒式交换(RMCE)方法或基因组编辑方法引入所述材料细胞中。

5. 一种用于引入外源抗原受体基因的材料细胞,所述材料细胞在其基因组的TCR基因座中,从上游到下游包括TCR基因座的V区启动子,耐药基因或报告基因,或已知的TCR或CAR基因,TCR基因座的C区增强子。

6. 根据权利要求5的用于引入外源抗原受体基因的材料细胞,其包含TCR基因座中的V区启动子与耐药基因或报告基因或已知的TCR或CAR基因之间的重组酶的靶序列(i),以及耐药基因或报告基因或外源TCR或CAR基因与TCR基因座中的C区增强子之间的重组酶的靶序列(ii)。

7. 根据权利要求5或6的用于引入外源抗原受体基因的材料细胞,其中所述细胞具有已知的TCR或CAR基因。

8. 一种用于引入外源抗原受体基因的材料细胞,所述材料细胞在其基因组的TCR基因座中,从上游到下游包括TCR基因座的V区启动子,耐药基因或报告基因,或已知的TCR或CAR基因,第一重组酶的靶序列(i),可在材料细胞中表达的启动子,被连接以可在材料细胞中表达的启动子序列下表达的第一耐药基因,第一重组酶的不同于靶序列(i)的靶序列(ii),第二耐药基因,第二重组酶的靶序列和TCR基因座的C区增强子。

9. 根据权利要求5至8中任一项的材料细胞,其中所述材料细胞中的TCR基因座是所述材料细胞中的TCR α 或TCR β 链。

10. 根据权利要求9的材料细胞,其中除了引入了耐药基因或报告基因或外源已知的TCR或CAR基因的TCR链以外,所述材料细胞中的TCR α 和TCR β 链是有缺陷的。

11. 根据权利要求5-10中任一项的材料细胞,其中所述材料细胞是多能干细胞。

12. 一种制备根据权利要求8-11中任一项的材料细胞的方法,其包括以下步骤:

(a) 制备包含耐药基因盒的载体,所述载体从上游到下游依次包含TCR基因座的V区启动子序列,第一重组酶的靶序列(i),可在所述材料细胞中表达的启动子序列,被连接以可在所述材料细胞中表达的启动子序列下表达的第一耐药基因,第一重组酶的不同于靶序列(i)的靶序列(ii)和第二耐药基因;

(b) 将步骤(a)中制备的载体敲入材料细胞基因组中的TCR基因座中;和

(c) 选择成功敲入耐药基因盒的细胞,包括在第一耐药基因具有耐性的药物存在下培养步骤(b)中获得的细胞。

13. 根据权利要求12的方法,其中在步骤(b)中,将步骤(a)中制备的载体敲入到非重排TCR基因座中V区启动子下游的位点,从而使耐药基因盒被替换为V区启动子下游的V区和DJ区。

14. 根据权利要求12的方法,其中步骤(a)中制备的载体进一步包含在最上游位点的TCR基因座中的V区启动子,并且在步骤(b)中,步骤(a)中制备的载体被敲入材料细胞基因

组中TCR基因座的DJ区。

15. 根据权利要求12的方法,其中步骤(a)中制备的载体进一步包含在最下游位点的TCR基因座中的C区增强子,并且在步骤(b)中,步骤(a)中制备的载体被敲入材料细胞基因组中TCR基因座的DJ区。

16. 一种制备导入外源抗原受体基因的细胞的方法,该方法包括以下步骤:

(A) 提供根据权利要求8所述的材料细胞;

(B) 制备TCR或CAR基因盒式交换载体,所述TCR或CAR基因盒式交换载体从上游到下游依次包含第一重组酶的靶序列(i),外源TCR或CAR基因,第二重组酶的靶序列,可在材料细胞中表达的启动子,和第一重组酶的靶序列(ii);

(C) 将TCR或CAR基因盒式交换载体引入到材料细胞中,并同时应用第一重组酶以使耐药基因盒与TCR或CAR基因盒式交换载体中第一重组酶的靶序列(i)和(ii)夹持的序列交换;

(D) 选择已经成功地交换了盒的细胞,包括在第二耐药基因具有耐性的药物存在下培养细胞;和

(E) 使第二重组酶作用于步骤(C)中选择的细胞,以除去第二重组酶的靶序列夹持的第二耐药基因。

17. 一种制备导入外源抗原受体基因的细胞的方法,该方法包括以下步骤:

(1) 制备包含耐药基因盒的载体,所述载体从上游到下游依次包含TCR基因座中的V区启动子,第一重组酶的靶序列(i),可在材料细胞中表达的启动子,被连接以在可在材料细胞中表达的启动子下表达的第一耐药基因,第一重组酶的不同于靶序列(i)的靶序列(ii),第二耐药基因和第二重组酶的靶序列,

(2) 将步骤(1)中获得的载体敲入材料细胞基因组上的TCR基因座中;

(3) 在第一耐药基因具有耐性的药物存在下培养步骤(2)中获得的细胞,以选择已成功敲入耐药基因盒的细胞;

(4) 制备TCR或CAR基因盒式交换载体,所述TCR或CAR基因盒式交换载体从上游到下游依次包含第一重组酶的靶序列(i),外源TCR或CAR基因,第二重组酶的靶序列,可在材料细胞中表达的启动子,和第一重组酶的靶序列(ii);

(5) 将TCR或CAR基因盒式交换载体引入步骤(3)中选择的已敲入耐药盒的材料细胞中,同时将第一重组酶应用到材料细胞,以使耐药基因盒中的序列被TCR或CAR基因盒式交换载体中第一重组酶的靶序列(i)和(ii)夹持的序列替换;

(6) 将第二耐药基因具有耐性的药物应用于细胞以选择已经成功交换了盒的细胞;和

(7) 将第二重组酶应用于步骤(6)中选择的细胞,以去除第二重组酶的靶序列夹持的第二耐药基因部分。

18. 根据权利要求16或17的方法,其中所述外源TCR或CAR基因是重排的TCR或CAR基因。

19. 根据权利要求16或17的方法,其中所述外源TCR基因包含重排的TCR α 和TCR β 链二者。

20. 一种制备用于免疫疗法的细胞的方法,其包括通过权利要求16-18中任一项的方法制备导入外源TCR或CAR的细胞,并将所述细胞分化为T细胞。

21. 一种制备用于免疫疗法的细胞的方法,其包括以下步骤:

将权利要求5-7中任一项的用于引入外源抗原受体基因的材料细胞分化为T祖细胞或T细胞,并通过重组酶介导的盒式交换法或基因组编辑将外源TCR或CAR基因引入到所述T祖细胞或T细胞的基因组上TCR中的V区启动子和C区增强子之间。

22. 一种制备用于免疫疗法的细胞的方法,其包括以下步骤:

将权利要求7的用于引入外源抗原受体基因的材料细胞分化为T祖细胞或T细胞,并通过重组酶介导的盒式交换法(RMCE)将所述T祖细胞或T细胞中的已知TCR或CAR基因与外源TCR或CAR基因交换,并通过使用对已知TCR或CAR具有特异性的抗体或四聚体去除未与TCR或CAR基因成功交换的细胞。

制备引入外源抗原受体的细胞的方法

技术领域

[0001] 本公开涉及引入了外源性T细胞受体或嵌合抗原受体的细胞。

背景技术

[0002] 已经提出了通过使用成熟T细胞的治疗方法,所述成熟T细胞通过引入编码抗原特异性受体(例如疾病特异性T细胞受体(TCR)和嵌合抗原受体(CAR))的基因而被转导。特别地,已经批准并临床使用了使用CAR-T细胞或引入了CAR的细胞的治疗方法。CAR-T治疗是一种所谓的自体移植系统,其中源自患者的T细胞用于引入编码CAR的基因。通过逆转录病毒或慢病毒将基因随机引入基因组。当通过这种方法引入基因时,存在损坏正常基因并激活癌症基因的风险。另一方面,已经提出了通过基因组编辑方法敲除在重排的TCR基因座中编码CAR的基因的方法(Nature,543:113,2017)。在这种方法中,引入的基因处于生理TCR表达控制系统的控制之下,以这种方式制备的CAR-T细胞被认为具有更高的功能性。

[0003] 本发明人已提出了在多能干细胞中引入TCR的方法(专利文献1)。然后,将引入了TCR基因的多能干细胞分化为T细胞,并用于细胞治疗。M Sadelain提出将CAR基因引入多能干细胞(专利文献2和非专利文献1)。

[0004] 迄今为止,还没有报道将编码TCR或CAR的基因引入不是T细胞的细胞的TCR基因座中。T细胞以外的其他细胞中的TCR基因座不会重排。没有关于在未发生基因重排的细胞的TCR基因座中敲除TCR或CAR基因的报道。

[0005] 重组酶介导的盒式交换(Recombinase-mediated cassette exchange, RMCE)已知是将基因引入细胞的过程。在该过程中,可以使用具有类似“盒式平台(cassette deck)”结构的材料细胞。具有“盒式平台结构”的细胞在其基因组中具有特定位点,可以与目的基因或“盒式磁带基因”交换。通过使用重组酶(例如Cre或Flippase),像交换盒式磁带一样,将外源基因(目的基因)引入宿主细胞。该过程已经被应用于操纵T细胞系(非专利文献2)。没有关于将RMCE应用于T细胞受体基因座的报道。

[0006] 通常,已经将TCR或CAR基因引入成熟T细胞中。一些本发明人提出将TCR基因引入多能干细胞中(专利文献3-5)。也已经提出将CAR基因引入多能干细胞中。在那些过程中,通过使用例如慢病毒载体,将TCR或CAR基因随机引入细胞的基因组中。但是,最好在宿主细胞的原始TCR基因座中敲入TCR或CAR基因,以期预期引入的TCR或CAR基因的生理表达模式。实际上,有报道称将CAR基因引入成熟T细胞中的重排TCR基因座中。通常,所有类型的细胞都有TCR基因座。但是,TCR基因重排不在T细胞以外的细胞中发生。仅通过将TCR/CAR基因插入细胞的TCR基因座中,不能在T细胞以外的细胞中表达外源TCR/CAR。尽管期望在细胞治疗中使用各种类型的TCR/CAR基因,但是将每个单个TCR/CAR敲入宿主细胞基因组中的所需基因座将需要大量的时间和成本。

[0007] 引文清单

[0008] 专利文献

[0009] [PTL 1]W02016/010154

- [0010] [PTL 2]W02014/165707
[0011] [PTL 3]W02016/010153
[0012] [PTL 4]W02016/010154
[0013] [PTL 5]W02016/010155
[0014] 非专利文献
[0015] [NPL 1]Themeli et al.,Nat Biotechnol.(2013)928-33
[0016] [NPL 2]Gong Ying et al.,Journal of Cell Biology(2015)1481-1489
[0017]

发明内容

[0018] 本发明要解决的问题

[0019] 本申请的一个目的是提供一种有效的方法,以提供稳定表达可用于细胞治疗的外源TCR或CAR基因的细胞。本申请的另一个目的是提供带有空的“盒式平台”的细胞,其可用于通过RMCE引入TCR或CAR基因的盒。

[0020] 解决问题的手段

[0021] 本申请提供了一种制备导入抗原特异性受体基因的细胞的方法,该方法包括将外源TCR或CAR基因引入材料细胞中的步骤,以使所引入的基因在材料细胞的T细胞受体表达控制系统下表达。

[0022] 在一个方面,本申请提供了一种制备细胞的方法,所述细胞中引入了编码抗原特异性受体的基因,所述方法包括以下步骤:将包括外源TCR或CAR基因的基因引入到材料细胞中,从而将外源基因引入TCR基因座的C区增强子和V区启动子之间,使得C区增强子和V区启动子彼此足够靠近,以使TCR表达控制系统表达插入基因。

[0023] 在另一个方面,本申请提供了一种制备细胞的方法,所述细胞中引入了编码抗原特异性受体的基因,该方法包括以下步骤:从上游到下游依次将基因,外源V区启动子基因和包括外源TCR或CAR基因的基因,引入材料细胞中TCR基因座的C区增强子的上游,使得引入的V区启动子和C区增强子彼此足够靠近,以使TCR表达控制系统表达插入基因。

[0024] 在另一方面,本申请提供了一种制备细胞的方法,所述细胞中引入了编码抗原特异性受体的基因,所述方法包括以下步骤:将从上游到下游依次包含外源TCR或CAR基因和外源C区增强子的基因引入材料细胞的TCR基因座中V区启动子的上游,使得V区启动子和引入的C区增强子彼此足够靠近,以使TCR表达控制系统表达插入基因。

[0025] 本申请还提供了用于抗原受体转导的材料细胞,其中在材料细胞基因组中的TCR基因座中从上游到下游依次包含V区启动子,被第一重组酶靶序列夹住的第一耐药基因,第二耐药基因和第二重组酶靶序列,以及C区增强子。

[0026] 本申请进一步提供了一种制备用于细胞治疗的细胞的方法,其包括诱导已通过本申请的方法将外源抗原受体基因引入TCR基因座的材料细胞分化为T细胞的步骤。

[0027] 发明效果

[0028] 本申请的方法使得有可能制备高度通用的细胞,所述细胞可用于使用表达TCR和CAR的细胞进行细胞治疗。另外,可以容易地将外源TCR基因或CAR基因引入用于抗原受体转导的材料细胞中,并确保TCR/CAR基因在最终产物中的稳定表达。结果,可以有效且容易地

产生表达外源TCR或CAR的免疫治疗细胞。

附图说明

[0029] [图1]显示了TCR $\alpha\beta$ 的示意图和TCR β 基因座的基因重排的示意图。在图中,P表示启动子,E表示增强子。在V-DJ重排中,重组使增强子和启动子靠得更近,并且表达了TCR。

[0030] [图2]显示本申请方法的概念的示意图。在这些图中,P代表启动子,E代表增强子。

[0031] [图3-1]显示实施例的耐药基因盒载体的构建过程的示意图。使用了带有小鼠磷酸甘油酸激酶(PGK)基因(pPGK)的启动子的pBRBII-AscI_FRTPGKpac Δ tkpA_AscI载体。(A)中的引物1和引物2具有与序列1和序列2相同的序列,它们分别是(B)中pBRMC1DTApA载体的限制酶切割位点5'侧和3'侧的DNA序列。所得的PCR产物在两端具有与pBRMC1DTApA载体中的序列-1和序列-2相同的序列。通过Gibson组装法,将载体和PCR产物通过相同的序列组合以形成(C)中的结构。

[0032] [图3-2]分别从(E)的PB-flox(CAG-mCherry-IH;TRE3G-miR-155-LacZa)载体和(F)的pBRBIII-AscI_FRTPGKpac Δ tkpA_AscI载体中,获得了在PGK载体(D)的限制酶切位点具有序列-3和序列-4的PCR产物。使用Gibson组装法通过相同序列将DNA片段连接在一起,以获得(G)的耐药基因盒载体。将片段连接到载体后,证实了载体含有这样的序列。

[0033] [图4]显示获得用于构建耐药基因盒敲入靶向载体的5'和3'臂的DNA片段以及启动子的过程的示意图。基于人TCR β 基因座的DB2区(A)的DNA序列设计了包括引物5'-1(1)和引物3'-1(2)以及引物5'-2(3)和引物3'-2(4)的引物,通过PCR获得了用于构建耐药基因敲入靶向载体的5'臂和3'臂(图5)的DNA片段。基于人TCR β 基因座的V区(B,左侧)的DNA序列设计了引物(F和R),并以相同方式获得了VB20-1启动子DNA片段。将这些片段连接至载体后,证实了载体包含这些片段,并用于后续步骤。

[0034] [图5]显示用于将耐药基因敲入TCR β 基因座的DB2区中的靶向载体的构建过程的示意图。用限制酶切割耐药盒载体(A),并通过Gibson组装法(B)将3'臂DNA片段(图4A)引入切割位点。类似地,引入了5'臂DNA片段和VB20-1启动子DNA片段(C,D)。

[0035] [图6]显示通过同源重组将耐药基因盒敲入Jurkat细胞TCR β 基因座的DB2区中的过程的示意图。该图显示了人TCR β 基因座的DJ区域(上图),耐药基因敲入靶向载体(KI靶向载体)(中图)和同源重组后TCR β 基因座的DJ区域(下图)。CRISPR/Cas9n切割DNA(切口)两条链中的一条。切口促进同源重组。在同源重组中,KI靶向载体的5'和3'臂部分以及两臂夹持的部分被TCR β 基因座中的相应5'和3'臂部分替换。结果,仅将夹在5'和3'臂之间的KI靶向载体的一部分引入到材料细胞的基因组DNA中(下图)。

[0036] [图7]显示TCR β -p2A-TCR α 载体(TCR供体载体)的构建过程的示意图。pENTR1A载体的限制酶切割位点的5'侧的约15bp被称为序列1,3'侧的约15bp被称为序列2(A)。引物1(B)具有TCR β 的一部分序列和与序列-1相同的序列,而引物4(C)具有TCR α 的一部分和与序列2相同的序列。引物2(B)和引物3(C)分别具有一部分TCR β 序列和大部分p2A序列,一部分TCR α 序列和一部分p2A序列。p2A序列(D)之间有16bp的重叠。通过Gibson组装法将载体和PCR产物通过彼此重叠而连接,以获得TCR供体载体(E)。与载体连接后,确认了通过PCR获得的DNA片段的序列。引物2和引物4可分别用于扩增所有的人TCR β 和TCR α 。AttL1和attL2用于制备TCR盒式交换载体(图8)。

[0037] [图8]盒式交换载体的构建中载体骨架的制备过程的示意图。以frt和PGK启动子连续位于其中的pBRB111-AscI_FRTPGKpac Δ tkpA_AscI质粒载体为模板(A),使用引物1和引物2进行PCR反应。引物1(A)具有frt的一部分,限制性酶切位点,lox2272,以及与(B)的pBluescriptSK(-)载体上的序列1相同的序列,引物2具有PGK启动子的一部分,loxP,以及与(B)的pBluescriptSK(-)载体上的序列2相同的序列。通过Gibson组装法将获得的PCR产物与限制酶切割的载体(B)连接,得到如图3(C)所示的Frt-PGK载体。(C)的Frt-PGK载体在引物1内的限制酶识别位点处被切割,并使用DNA连接酶(E)将具有与被切割的末端互补的序列的DNA 1连接到其上。可在引物1中设计的限制酶识别位点再次切割该载体,然后将DNA2以与DNA 1相同的方式连接到其上。通过重复此过程多次,可在lox2272和frt序列之间引入多个任意的DNA片段。引入可以通过DNA连接反应或通过Gibson组装(D-G)来完成。

[0038] [图9]显示用于构建盒式交换载体的前盒式交换载体(pre-cassette exchange vector)的构建过程的示意图。通过用限制酶NheI和XhoI消化CSIV-TRE-RfA-CMV-KT载体获得含有attR1-ccdb-attR2 DNA的RfA盒。将所获得的片段以图8D至8G的方式(B)与用限制酶NheI和XhoI消化的Frt-PGK载体连接。基于Frt-PGK载体(A)以图8D至8G所示的方式构建前盒式交换载体1至3(B,D,F),其中引入了attR1-ccdb-attR2 DNA片段(B),attR1-ccdb-attR2 DNA片段和聚A添加序列(D),attR1-ccdb-attR2 DNA片段,聚A添加序列和内含子(lox2272和attR1之间)(F)。使用限制酶(C)从质粒载体获得聚A添加序列。通过PCR获得内含子序列,使其具有部分外显子而没有翻译起始密码子(E)。与载体连接后,确认通过PCR获得的DNA片段的序列。

[0039] [图10]制备TCR盒式交换载体的过程的示意图。上图显示了前盒式交换载体3,中图显示了TCR供体载体,下图显示了TCR盒式交换载体。在前盒式交换载体和TCR供体载体中,与attL1序列重组的attR1序列和与attL2序列重组的attR2序列,及其夹持的部分被替换(下行)。attR1(2)序列与attL1(2)序列重组形成attB1(2)序列。

[0040] [图11]用TCR盒交换耐药基因盒的过程的示意图(产生TCR盒交换的Jurkat细胞)。上图显示与耐药基因KI靶向载体同源重组后,人TCRB基因座中的DJ区。中图显示TCR盒式交换载体。下图显示盒式交换后人TCRB基因座的DB2区。将TCR盒式交换载体和Cre重组酶表达载体一起引入耐药基因KI-Jurkat细胞时,Cre重组酶促进lox2272和lox2272之间以及loxP和loxP之间的重组。结果,lox2272和loxP序列夹持的部分换(盒式交换)。盒式交换后,开始进行嘌呤霉素耐性基因的表达。

[0041] [图12]产生表达外源TCR的Jurkat细胞的过程的示意图。在TCR盒式交换后,FLP在细胞中表达。frt序列夹持的部分在FLP的作用下被缺失。结果,增强子(Enh)有效地作用于启动子(V β 20-1启动子),然后下游基因(TCR)被表达。

[0042] [图13]用于检查外源引入的TCR和CD3在盒式交换的Jurkat细胞的细胞表面上的表达的FACS分析。野生型(WT) Jurkat细胞表达内源TCR(上图)。外源引入的TCR在没有FLP表达的盒式交换的Jurkat细胞中不表达(中图)。相反, Jurkat细胞在FLP表达时表达外源引入的TCR,但高比例的群体不表达TCR(下图)。

[0043] [图14]显示用更昔洛韦去除其中FLP介导的重组失败的细胞的过程的示意图。更昔洛韦不影响通过FLP成功重组并丢失puror- Δ tk基因的细胞(A)。在FLP重组失败的细胞中,更昔洛韦被puror Δ TK磷酸化,而磷酸化的更昔洛韦抑制DNA复制。结果,FLP介导的重组

失败的细胞无法在更昔洛韦的存在下复制DNA,并且会通过细胞死亡而从细胞群体中移出(B)。

[0044] [图15]TCR和CD3在细胞表面的表达水平的FACS分析。WT Jurkat细胞中的内源TCR表达(上图)。没有FLP表达的细胞不表达TCR(中间行)。在表达FLP的细胞(下行)中观察到外源引入的TCR表达,与图13相比,更昔洛韦的选择大大降低了非TCR表达细胞的比例。

[0045] [图16] (A)显示了被CRISPR/Cas9切割的人TCRB区域中的位点以及与每个引物相对应的位点。(B)耐药基因靶向载体和与各个引物相对应的位点的示意图。(C)用引物获得的PCR产物的电泳照片,以证实耐药基因盒的敲入。

[0046] [图17]显示获得用于构建用于耐药基因盒敲入的靶向载体的启动子的5'和3'臂以及DNA片段的过程的示意图。根据人TCRB基因座中V β (A)和C β 2区的DNA序列设计引物,并通过PCR获得用于构建耐药基因敲入靶向载体的DNA片段,所述DNA片段用作5'和3'臂(图18)。与载体连接后,确认了通过PCR获得的DNA片段的序列,并用于后续步骤。

[0047] [图18]显示用于将耐药基因盒敲入TCRB基因座中V β 20-1和C β 2基因相连的区域的耐药基因敲入靶向载体的构建过程的示意图。用限制酶切割耐药基因盒载体,并使用Gibson组装法将3'臂DNA片段引入切割位点。类似地,引入了5'臂DNA片段。结果,获得了耐药基因敲入靶向载体。

[0048] [图19]显示通过同源重组将耐药基因盒敲入Jurkat细胞中TCRB基因座中V β 20-1和C β 2基因相连的位点的过程的示意图(上图)。耐药基因敲入靶向载体(KI靶向载体)(中图)。同源重组后的TCRB基因(下图)。在同源重组中,KI靶向载体的5'和3'臂以及两臂夹持的序列可以分别用TCRB基因座中的相应5'和3'臂代替。结果,仅夹在5'和3'臂之间的KI靶向载体的序列可以被引入到材料细胞的基因组DNA中(下图)。

[0049] [图20]实施例3的过程的示意图,其中从未发生基因重排的人TCRB基因座中除去了V β 20-1和C β 2基因之间的区域。上图显示了TCRB基因座和CRISPR/Cas9n靶位点。为V β 20-1和C β 2基因分别提供了两个靶位点(垂直线)。下图显示了去除基因间区域后的TCRB基因座和连接位点。垂直线表示V β 20-1和C β 2基因的连接位点。

[0050] [图21]显示了实施例3的结果。分离出了从其基因组中除去了V β 20-1和C β 2基因之间大约180kbp区域的细胞系。图21A显示了未转染(左图)和转染(右图)的细胞的FACS分析。通过分选(圈出区域)从转染的细胞中分离出具有高表达EGFP的细胞。图21B代表去除180kbp区域后的TCRB基因座。箭头指示正向和反向引物。垂直线指示去除后基因之间的连接位点。图21C是使用模板DNA从每个克隆细胞的基因组DNA获得的PCR产物的电泳结果。图21D是克隆#10(序列号51)的PCR产物的一部分。大约180kbp的区域变为6bp。带下划线(直线)部分:V β 20-1侧阵列,带下划线(波浪线)部分:C β 2侧阵列。两者之间最初大约有180kbp,但后来变成了6bp。

[0051] [图22]将耐药盒平台敲入人iPS细胞的TCRB基因座中的D β 2区的实施例的示意图。

[0052] [图23]iPS细胞中“盒式磁带”被交换的实施例的示意图。

[0053] [图24]经盒式交换的TCR-iPS细胞中的Puror Δ TK区域被去除的实施例的示意图。

[0054] [图25]显示通过诱导细胞分化为T细胞,从经盒式交换的TCR-KI-iPS细胞获得了CTL的结果。

[0055] [图26]显示图25中的CTL具有抗原特异性的细胞毒活性的结果。

[0056] [图27] Jurkat-TCR1细胞中人TCR β 基因DJ区的示意图。

[0057] [图28] 显示用Cre重组酶交换TCR盒式磁带的示意图。上图显示TCR β 基因座DJ区，其中已整合了TCR1。中图显示TCR2盒式磁带交换载体。下图显示盒式磁带交换后的人TCR β 基因座D β 2区。当将TCR盒式交换载体和Cre重组酶表达载体一起引入Jurkat-TCR1细胞时，Cre重组酶介导lox2272之间和loxP之间的重组。这导致夹在lox2272和loxP之间的部分被替换(盒式磁带交换)。在已发生盒式磁带交换的细胞中，TCR1被TCR2(Jurkat-TCR 2)替换。

[0058] [图29] A: TCR β 基因座D β 2区的示意图，其中整合了TCR1(上图)或TCR2(下图)基因。指出了在PCR反应中使用的引物的位置。B: 每种引物组合中PCR产物的电泳分析。PCR 1显示使用引入了TCR2的Jurkat细胞的基因组DNA的PCR反应结果，PCR 2显示使用Jurkat-TCR1细胞的PCR反应结果，PCR 3显示使用转染了TCR2盒式交换载体和Cre重组酶表达载体的Jurkat-TCR1细胞的基因组DNA的PCR反应结果。

[0059] 实施方案

[0060] 在本说明书和权利要求书中，当数值带有术语“约”时，意图包括该数值的 $\pm 10\%$ 以内的范围。例如，“大约20”应包括“18至22”。数字范围包括两个端点之间的所有数字以及两个端点的数字。范围的“约”适用于该范围的两个端点。因此，例如，“约20至30”应包括“18至33”。

[0061] 当V区上游的启动子(V区启动子)和C区下游的增强子(C区增强子)由于基因重排而彼此靠近时，TCR基因被表达。TCR β 基因重排和表达机制的示意图如图1所示。

[0062] 如果将T细胞的重排的TCR基因替换为外源的重排的TCR或CAR基因(以下统称为TCR/CAR基因)，则在TCR表达控制系统下表达转导的TCR/CAR基因。如果将TCR/CAR基因简单地引入尚未经过基因重排的细胞的基因组的TCR基因座中，则原始的TCR表达控制系统将无法正常工作。仅当V区启动子和C区增强子彼此靠近时，才会激活TCR表达控制系统。换句话说，本申请提供了一种通过使TCR基因座中的V区启动子和C区增强子彼此靠近接近的方式敲入外源TCR/CAR基因来将外源抗原受体基因表达达到材料细胞中的方法。

[0063] 在本申请中，“抗原受体基因”是指TCR基因或CAR基因。对外源TCR基因或外源CAR基因没有特别限制，可以选自己知的重排的TCR基因或CAR基因。或者，可以通过已知方法从对细胞治疗的靶抗原具有特异性的T细胞中扩增并使用TCR基因，或者可以构建用于靶抗原的CAR基因。

[0064] 术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指重组多肽构建体，其至少包含胞外抗原结合结构域、跨膜结构域、胞质信号传导结构域(包含与抗原结合时足以刺激T细胞的CD3 ζ 链的胞质序列)、以及任选的一种或多种(例如2、3或4种)胞质共刺激蛋白(当抗原结合结构域与抗原结合时，这些蛋白共同刺激T细胞)。共刺激蛋白的实例可以包括CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40L、CD40、PD-1、PD-L1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、CD160、LIGHT、BTLA、TIM3、CD244、CD80、LAG3、NKG2C、B7-H3以及与CD83特异性结合的配体。

[0065] 在本申请中，如图2中概述的，有三种方法可以将外源TCR/CAR基因引入能够分化为T细胞且具有未重排TCR基因座的材料细胞中，并在所述材料细胞的TCR表达控制系统下表达该基因：

[0066] (1) 在材料细胞的TCR基因座的C区增强子和V区启动子之间引入包含外源TCR/CAR基因的基因，以使增强子和启动子之间的距离彼此靠近(图2-1)。

[0067] (2) 将从上游到下游依次包含TCR基因座的V区启动子和外源TCR/CAR基因的基因引入材料细胞中TCR基因座的C区增强子的上游,使得V区启动子和C区增强子彼此足够靠近,以使TCR表达控制系统表达夹在它们之间的基因(图2-2)。

[0068] (3) 将从上游到下游依次包含外源TCR/CAR基因和TCR基因座的C区增强子的基因引入材料细胞中TCR基因座的V区启动子的下游,使得V区域启动子和C区域增强子彼此足够靠近,以使TCR表达控制系统表达夹在它们之间的基因(图2-3)。

[0069] 在“V区启动子和C区增强子彼此足够靠近以使TCR表达控制系统表达夹在它们之间的基因”的上下文下,它们之间的距离不受特别限制,只要V区启动子由C区增强子控制即可。举例来说,在引入外源TCR/CAR基因后,V区启动子和C区增强子之间的距离为例如约8至50kbp,约10至40kbp,约12至32kbp或约14kbp至22kbp。

[0070] 未经过TCR基因座的基因重排并且能够诱导分化为T细胞的细胞适合用作本申请方法的材料细胞。对于“未经过TCR基因座的基因重排并且能够诱导分化为T细胞的细胞”,必须满足以下三个要求:(1) 未经过TCR基因座的基因重排的细胞,(2) 能够诱导分化为T细胞的细胞,以及(3) 能够承受基因修饰过程中的选择过程的细胞。这样的细胞包括多能干细胞(例如ES细胞和iPS细胞),以及白细胞干细胞。

[0071] 如本文和权利要求书中所使用的多能干细胞是能够分化为存在于活生物体中的多种类型细胞并且能够自我更新的多能干细胞。多能干细胞包括,例如,胚胎干(ES)细胞,源自通过核移植获得的克隆胚胎的胚胎干(ntES)细胞,精子干细胞(“GS细胞”),胚胎生殖细胞(“EG细胞”),诱导多能干(iPS)细胞,以及源自培养的成纤维细胞和骨髓干细胞的多能细胞(“Muse细胞”)。ES细胞和iPS细胞是适合使用的。考虑到使用具有特定HLA的人源细胞制备用于治疗细胞库,优选使用iPS细胞。

[0072] 至于iPS细胞,它们可以源自身体任何部位的体细胞。从体细胞诱导iPS细胞的方法是众所周知的。iPS细胞可以通过将Yamanaka因子引入体细胞中来获得(Takahashi和Yamanaka,Cell 126,663-673(2006),Takahashi等人,Cell 131,861-872(2007)和Grskovic等人,Nat.Rev.Drug Discov.10,915-929(2011))。用于诱导iPS细胞的重编程因子不限于Yamanaka因子,而是可以使用本领域技术人员已知的任何因子或方法。

[0073] 将重排的TCR/CAR基因引入材料细胞可以通过一次操作进行,也可以分多个步骤进行。也可以通过常规已知的重组技术(例如同源重组技术、基因组编辑技术、以及使用重组酶如Cre重组酶和Flippase重组酶的组的技术)来进行。

[0074] 如果外源TCR/CAR是TCR α 和 β 的异二聚体,则在材料细胞基因组中引入了TCR/CAR基因的TCR基因座可以是TCR α 基因座或TCR β 基因座。可在一个基因座的TCR表达控制系统下引入重排的TCR α 和TCR β 基因。或者,可将TCR α 和TCR β 基因分别引入TCR α 和TCR β 基因座。

[0075] 在本申请中,盒式平台/盒式磁带方法可用于引入TCR/CAR基因。为了交换磁带,可以使用重组酶介导的盒式交换(RMCE)方法,该方法使用重组酶及其靶序列的结合,例如Cre/lox和Flippase(FLP)/Frt。在RMCE方法中,诱导侧翼为特定靶序列夹持的靶基因的盒式交换反应。盒式磁带部分应构造成包括适当切割和粘贴的阵列。可以从一开始就将包含TCR/CAR基因的盒式磁带引入材料细胞,或者可以先引入包含耐药基因的盒式磁带以构建盒式平台结构,然后再引入包含外源TCR/CAR基因的盒式磁带。即,可在TCR基因座的生理表达控制系统下将盒式平台整合到材料细胞中,然后再通过这种方法将各种类型的TCR/CAR

基因引入一种类型的材料细胞中。

[0076] 在一个方面,本申请提供了一种用于引入外源抗原受体基因的材料细胞,其中该材料细胞在基因组的TCR基因座中从上游到下游依次包含TCR基因座的V区启动子,耐药基因或报告基因,或已知的TCR或CAR基因,TCR的C区增强子。

[0077] 材料细胞可以包括TCR基因座中的V区启动子与耐药基因或报告基因,或已知TCR或CAR基因之间的重组酶的靶序列(i),以及耐药基因或报告基因或外源TCR或CAR基因与TCR基因座中的C区增强子之间的,与靶序列(i)不同的重组酶的靶序列(ii)。

[0078] 将外源TCR/CAR基因引入在此方面提供的用于引入外源抗原受体基因的材料细胞中,以便与耐药基因、报告基因或已知的TCR或CAR基因进行交换(“盒式交换”)。通过使用耐药基因、报告基因或已知的TCR或CAR基因作为阴性对照的指示剂,可以选择已成功交换盒的细胞。在耐药基因的情况下,通过在该基因具有耐性的药物的存在下培养细胞,来选择未与外源TCR/CAR基因进行盒式交换的细胞。在报告基因的情况下,可以分离表达该基因的细胞,以去除其中没有发生盒式交换的细胞。在已知的TCR或CAR基因的情况下,可使用对该基因具有特异性的抗体或四聚体来去除没有发生盒式交换的细胞。

[0079] 至于用于引入外源抗原受体基因的材料细胞,该细胞可以具有两步确认系统,该系统确认空盒已被正确地引入材料细胞中,并在引入外来TCR/CAR基因后进一步确认该外来TCR/CAR基因已被正确引入。

[0080] 作为具有这样的两步确认系统的用于引入外源抗原受体基因的材料细胞的一个实施方式,本申请提供一种用于引入抗原受体基因的材料细胞,其在材料细胞基因组的TCR基因座中从上游到下游依次包含:TCR基因座中的V区启动子,第一重组酶的靶序列(i),可在材料细胞中表达的启动子,被连接以在可在材料细胞中表达的该启动子下表达的第一耐药基因,不同于靶序列(i)的第一重组酶的靶序列(ii),第二耐药基因和第二重组酶的靶序列以及TCR基因座的C区增强子。

[0081] 如本文和权利要求书中所使用的,“重组酶”是诱导位点特异性重组的酶,并且重组酶的靶序列是被重组酶识别并且能够在两个靶序列之间诱导缺失、导入或倒置的序列。重组酶及其靶序列的组合的实例包括Cre重组酶和loxP及其衍生物,FLP重组酶和frt以及克隆酶和attB/attP/attL/attR。

[0082] 当在本申请的方法中使用第一重组酶和第二重组酶时,使用的第一重组酶是可以诱导对多个靶序列特异性的重组的酶,例如Cre重组酶及其靶序列loxP、lox2272、loxloxP、lox2272、lox511和loxFas。在Cre重组酶的存在下,分别促进相同靶序列之间的重组。通过重组,例如,可以将材料细胞基因组中lox2272和loxP夹持的序列与载体上lox2272和loxP夹持的序列交换。

[0083] 第二重组酶及其靶序列的组合没有特别限制。可以使用与第一重组酶不具有交叉反应性的任何重组酶,例如FLP/frt系统。

[0084] “TCR基因座的C区增强”和“TCR基因座的V区启动子”可以是源自材料细胞,源自与该材料细胞相同动物物种的其他个体的细胞,或源自其他动物物种的细胞的序列。

[0085] 可在材料细胞中表达的启动子不受限制,并且可以是可在材料细胞中诱导与其连接的耐药基因表达的任何启动子。实例包括但不限于巨细胞病毒(CMV)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子和磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子。小鼠磷酸甘油酸激酶(PGK)基因(pPGK)的启

动子是一个实例。

[0086] 作为耐药基因,可以使用可在材料细胞中用作标志物的耐药基因。例如,可以使用对潮霉素、嘌呤霉素或新霉素具有耐性的基因。当使用第一和第二耐药基因时,两个基因的组合不受限制,只要它们之间没有交叉反应即可。耐药基因的下游可以优选连接至聚A序列。

[0087] 第二耐药基因优选是在其下游具有药物敏感基因的融合基因。药物敏感基因是一种响应于外部添加的物质而表达时诱导细胞凋亡的基因。这样的药物敏感基因可以选自适当的已知基因,并且没有特别限制。例如,可以使用单纯疱疹病毒和水痘带状疱疹病毒的胸苷激酶基因。更昔洛韦是在导入该基因的细胞中诱导细胞凋亡的物质中的一个实例。

[0088] 第二耐药基因序列优选是其中起始密码子已被去除以避免在盒式交换之前基因表达的序列。

[0089] 下面描述制备用于引入抗原受体基因的材料细胞的方法。如图2-1、2-2和2-3所示,有三种可能的方法可在材料单元细胞的TCR基因座中创建包括所谓的“空盒”的“盒式平台”。“空盒”序列的例子是耐药基因或报告基因,或已知的TCR或CAR基因。这些基因可以被夹在重组酶的靶序列(i)和(ii)之间。或者,作为具有两步确认系统、用于抗原受体基因转移的材料细胞中的“空盒”的例子是以包括以下各项的序列:第一重组酶的靶序列(i),可在材料细胞中表达的启动子序列,被连接以在可在该材料细胞中表达的该启动子序列下表达的第一耐药基因,不同于靶标序列(ii)的第一重组酶的靶标序列(ii),第二耐药基因和第二重组酶的靶标序列。

[0090] 图2-1)在材料细胞的TCR基因座中的C区增强子和V区启动子之间引入“空盒”,使得增强子和启动子彼此足够靠近(图2-1)。

[0091] 图2-2)将V区启动子和TCR基因座的“空盒”从上游到下游依次引入材料细胞的TCR基因座,使得V区启动子足够靠近材料细胞的C区增强子。

[0092] 图2-3)将TCR基因座的“空盒”和C区增强子从上游到下游依次引入到V区启动子下游的材料细胞基因组中的TCR基因座中,使得材料细胞上的V区启动子和C区增强子足够靠近。

[0093] 在下文中,作为实例,详细解释了图2-2的方法,其中“空盒磁带”是包含以下各项的序列:第一重组酶的靶序列(i),可在材料细胞中表达的启动子序列,被连接以在可在材料细胞中表达的启动子序列下表达的第一耐药基因,不同于靶序列(ii)的第一重组酶的靶序列(ii),第二耐药基因和包含第二重组酶的靶序列的序列。该实施方式包括以下步骤:

[0094] (a) 制备包含耐药基因盒的载体,所述载体从上游到下游依次包含TCR基因座的V区启动子序列和第一重组酶的靶序列(i),可在材料细胞中表达的启动子序列,被连接以在可在材料细胞中表达的启动子序列下表达的第一耐药基因,不同于靶序列(ii)的第一重组酶的靶序列(ii)和第二耐药基因;

[0095] (b) 将包含(a)的载体上的V区启动子序列的序列敲入材料细胞中的第二重组酶靶序列;和

[0096] (c) 选择已成功敲入耐药基因盒的细胞,包括在第一耐药基因具有耐性的药物存在下培养在(b)中获得的细胞。

[0097] 作为在本申请中使用的载体,可以适当地使用在基因重组中使用的载体,例如病

毒、质粒和人工染色体等载体。病毒载体的实例包括逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和仙台病毒载体。人工染色体载体包括例如人人工染色体 (HAC), 酵母人工染色体 (YAC) 和细菌人工染色体 (BAC, PAC)。作为质粒载体, 可以使用哺乳动物细胞的质粒载体。可以根据目的选择和使用市售的载体。

[0098] 当制备 $\alpha\beta$ T细胞时, 敲入耐药基因盒的材料细胞基因组上的TCR基因座可以是TCR α 或TCR β 基因座。可以优选缺失不用于基因转移的TCR α 和 β 基因座。特定基因座的缺失可以适当地使用已知方法来进行, 并且可以使用已知的基因组编辑技术 (例如CRISPR/Cas9和Talen) 来进行。

[0099] 在本实施例中, 可以首先进行以下的步骤 (a) :

[0100] 构建包含耐药基因盒的载体, 所述载体从上游到下游依次包含TCR基因座的V区启动子和第一重组酶的靶序列 (i), 可在材料细胞中表达的启动子, 被连接以在可在材料细胞中表达的启动子下表达的第一耐药基因, 第一重组酶的靶序列 (i) 和第二耐药基因和第二重组酶的靶序列, 然后构建包含耐药基因盒上游的V区启动子的“耐药基因盒敲入靶向载体”。

[0101] 然后构建靶向载体, 该靶向载体包含耐药基因盒上游的TCR基因座的V区启动子。

[0102] 在TCR基因座的V区, 每个V基因都有一个启动子。所用的TCR基因座的V区启动子没有限制, 可以适当选择。例如, 在使用TCR β 基因座的情况下, 以V β 20-1启动子为例。可以通过使用引物通过PCR扩增序列来获得启动子, 所述引物被设计为获得紧接在V基因的第一个外显子的翻译起始点之前的上游启动子的DNA片段。

[0103] 在构建靶向载体时, 首先确定材料细胞基因组TCR基因座中将引入外源TCR/CAR基因的位点。当引入从上游到下游依次包含V区启动子和外源TCR/CAR基因的序列时, 引入外源基因的位点可以是材料细胞的C区增强子可以激活V区启动子的任何位点。

[0104] 具体地, 当将外源TCR/CAR基因引入到材料细胞的TCR β 基因座中时, 优选将基因引入TCR β 基因座未重排并且靠近增强子的区域, 例如DB2上游和CB1下游的位点。当将外源TCR/CAR基因引入材料细胞的TCR α 基因座时, 优选将基因引入TCR α 基因座未重排并且靠近增强子的区域。一个实例是在最上游的J α 基因的上游和最下游的V α 基因的下流的位点引入TCR/CAR基因。

[0105] 一旦确定了在材料细胞基因组的TCR基因座中的引入位点, 就将与引入位点上游和下游序列同源的序列分别引入作为5'臂和3'臂, 以允许同源重组。在这种情况下, 如果5'臂和3'臂的序列同源至分别发生同源重组的程度, 则“同源序列”就足够了。

[0106] 例如, 在将外源TCR/CAR基因引入到材料细胞基因组中的未重排TCR β 基因座中的情况下, 将从DB2基因上游约110bp至更上游约1.6kbp的DNA片段用作5'臂序列, 将DB2基因上游约50bp至下游约1.6kbp的DNA片段用作3'臂序列。每个5'和3'臂的DNA片段可以通过使用可以特异性扩增每个序列的引物, 通过PCR扩增材料细胞的基因组DNA作为模板来获得。

[0107] 换句话说, 作为耐药基因敲入靶向载体, 其示例为从上游到下游依次包含以下各项的载体: 与材料细胞基因组的TCR基因座中的引入位点的5'侧同源的序列 (5'臂), TCR基因座中的V区启动子, 第一重组酶的靶序列 (i), 可在材料细胞中表达的启动子, 被连接以在可在材料细胞中表达的启动子下表达的第一耐药基因, 不同于靶目标序列 (i) 的第一重组酶的目标序列 (ii), 第二耐药基因和第二重组酶的靶序列, 以及与材料细胞的引入位点的

3'侧同源的序列(3'臂)。当通过PCR扩增每个序列时,设计引物,使得所得的PCR产物包括将其引入药物耐受性载体所需的DNA序列。可以使用已知的方法,例如Gibson装配法,或可商购的试剂盒,将获得的PCR产物用于构建载体。

[0108] 耐药基因盒敲入靶向载体可以进一步包含可在材料细胞中表达的启动子和3'臂下游的标记基因。这种启动子-标记组合的一个实例是MC1启动子和白喉毒素(DTA)的组合。

[0109] 步骤(b)

[0110] 通过同源重组将耐药基因盒敲入靶向载体敲入材料细胞的TCR基因座。敲入载体可以通过已知方法例如通过电穿孔进行。

[0111] 为了提高同源重组的敲入效率,优选在敲入在耐药基因盒敲入靶向载体之前,在敲入位点附近,例如3'臂的起始位点(上游)附近引入两个单链断裂(切口)。切口的引入可以通过已知方法进行,并且CRISPR/Cas9n系统是一个实例。

[0112] 步骤(C):

[0113] 已经成功地进行同源重组的材料细胞通过引入的启动子的作用表达耐药基因1。因此,可在耐药基因1具有耐性的药物存在下选择已经成功地进行同源重组的材料细胞。此外,当将标记基因引入靶向载体3'臂的下游时,引入了不包含耐药基因盒的“5'和3'臂序列的外部”的材料细胞表达该标记,例如细胞毒素,并且细胞不存活。因此,通过选择活细胞,可以选择成功敲入耐药盒的细胞。可以通过PCR进一步确认所选择的材料细胞,以仅选择敲入了V区启动子和耐药基因盒的细胞。

[0114] 从已经敲入V区启动子和耐药基因盒的材料细胞获得的克隆可在本申请中用作“用于TCR/CAR基因敲入的材料细胞,其在材料细胞基因组的TCR基因座中从上游到下游依次包含TCR基因座中的V区启动子、第一重组酶的靶序列(i)、可在材料细胞中表达的启动子、被连接以在可在材料细胞中表达的启动子下表达的第一耐药基因、不同于靶序列(i)的第一重组酶的靶序列(ii)、第二耐药基因和第二重组酶的靶序列、以及TCR基因座C区增强子”。

[0115] 尽管以上描述主要基于图2-2的方式,但是本领域技术人员将理解,可以以相同方式实现其他两个实施方式。即,如果使用材料细胞中的V区启动子,或者同时使用材料细胞中的V区启动子和C区增强子,则可以根据构造适当地制备耐药基因盒敲入靶向载体的构建体。

[0116] 在实施例3中描述了图2-1的实施方式的一个具体实例。如果同时使用材料细胞中的V区启动子和C区增强子,则通过引入两个单链断裂(切口)可以排除约180kbp的基因组DNA,其中一个断裂(切口)在V区启动子的稍下游,另一个在C区增强子的稍上游,例如在TCR β 基因座的情况下,在TCRV β 20-1的翻译起始位点下游30bp至80bp的区域且在TCRC β 2基因的外显子1内,因此排除了两个切口之间的大约180kbp。随后,可以将耐药基因盒敲入彼此靠近的V区启动子和C区增强子之间,以产生用于TCR/CAR基因敲入的材料细胞,或者直接引入外源TCR/CAR基因。

[0117] 图17-19是获得材料细胞的过程的示意图,其中同时使用了材料细胞中TCR基因座中的V区启动子和C区增强子,其中可以制备用于TCR/CAR基因敲入的材料细胞,该材料细胞在材料细胞基因组的TCR基因座中,从上游到下游依次包含TCR基因座中的V区启动子,第一重组酶的靶序列(i),可在材料细胞中表达的启动子,被连接以在可在材料细胞中表达的启

动子下表达的第一耐药基因,不同于靶序列(i)的第一重组酶的靶序列(ii),第二耐药基因和第二重组酶的靶序列,以及TCR基因座的C区增强子。

[0118] 为了将外源TCR/CAR基因引入用于TCR/CAR转导的材料细胞,说明了以下步骤:

[0119] (A) 制备TCR或CAR基因盒式交换载体,其从上游到下游依次包含第一重组酶的靶序列(i),外源TCR或CAR基因,第二重组酶的靶序列,可在材料细胞中表达的启动子,以及第一重组酶的靶序列(ii);

[0120] (B) 将TCR或CAR基因盒式交换载体引入用于TCR/CAR转导的材料细胞中,同时应用第一重组酶以利用TCR或CAR基因盒式交换载体中第一重组酶的靶序列(i)和(ii)夹持的序列交换引入到材料细胞基因组中的耐药基因盒的第一重组酶的靶序列(i)和(ii)夹持的部分;和

[0121] (C) 选择已经成功地交换了盒的细胞,包括在第二耐药基因具有耐性的药物存在下培养细胞;和

[0122] (D) 使第二重组酶作用于在(C)中选择的细胞,以除去第二重组酶的靶序列夹持的第二耐药基因。

[0123] 步骤(A)

[0124] 为了引入重排的TCR或CAR基因,首先制备了TCR盒式交换载体,其从上游到下游依次包含第一重组酶的靶序列(i),外源TCR或CAR基因,第二重组酶的靶序列,可在材料细胞中表达的启动子和第一重组酶的靶序列(ii)。

[0125] 以下是用于引入TCR α 和TCR β 的异二聚体的基因的TCR盒式交换载体的实例。

[0126] 在表达TCR α 和TCR β 的异二聚体作为本申请的一个实施方式的情况下,举例说明了利用其中重排的TCR α 基因和TCR β 基因通过自切割2A肽连接的序列产生TCR盒式交换载体。通过将自切割2A肽置于 α 和 β 链之间,可在单个基因表达系统的控制下表达两个基因。

[0127] 可以使用诸如p2A, T2A, E2A和F2A的2A肽,并且据称具有良好切割效率的p2A肽是合适的。可将TCR α 基因或TCR β 基因之一引入上游,并且将聚A序列适当地连接至引入下游的TCR基因。

[0128] 内含子优选地包括在TCR基因的上游。内含子除了要通过剪接去除的序列外,还可以包括剪接供体序列和剪接受体序列。举例说明了人多肽链延长因子 α (EF1 α)基因的内含子或鸡 β -肌动蛋白(CAG)基因启动子的内含子。

[0129] 如果第二耐药基因不包含起始密码子,则将起始密码子引入到紧随可在材料细胞中表达的启动子之后并紧接在第一重组酶的靶序列(ii)之前的TCR盒式交换载体中。

[0130] 步骤(B)

[0131] 将TCR盒式交换载体引入用于TCR/CAR转导的材料细胞,并同时第一重组酶应用于材料细胞。为了应用第一重组酶,例如,将TCR盒式交换载体与第一重组酶表达载体一起引入。第一重组酶表达载体的表达分别促进了耐药基因盒上的靶序列(i)和TCR盒式交换载体上的靶序列(i)之间的重组,以及耐药基因盒上的靶序列(ii)和TCR盒式交换载体上的靶序列(ii)之间的重组。结果,耐药基因盒上第一重组酶的靶序列(i)和(ii)夹持的部分与TCR盒式交换载体上相同序列夹持的部分交换。

[0132] 步骤(C)

[0133] 在发生盒式交换的材料细胞中,表达了第二耐药基因。因此,通过在盒式交换之后

在第二耐药基因具有耐性的药物存在下培养材料细胞,可以选择已经成功交换盒的细胞。

[0134] 步骤(D)

[0135] 将第二重组酶应用于所选细胞。为了应用第二重组酶,例如,可以将第二重组酶表达载体引入所述选择的细胞中。

[0136] 第二重组酶的表达导致缺失第二重组酶的靶序列夹持的部分。如果将引入的第二耐药基因与药物敏感基因融合,则在触发该药物敏感基因激活的因子(例如细胞死亡诱导基因)存在下培养材料细胞,可以去除不能缺失第二重组酶的靶序列夹持的部分的细胞。PCR方法可以用于确认已经将TCR α 和TCR β 基因明确地引入到获得的细胞中。通过上述方法获得的细胞在材料细胞的TCR β 基因座中同时表达TCR α 和TCR β 。

[0137] 外源TCR/CAR基因转染的材料细胞向T细胞的分化

[0138] T细胞以外的其他细胞的TCR基因座处的TCR基因不会被表达,因为不会发生TCR基因重排。因此,将重排的TCR基因或CAR基因用于基因转移。当将除T细胞以外的细胞(如多能干细胞)用作材料细胞时,必须将它们分化为T细胞以表达重排的TCR或CAR基因,并且分化的T细胞可用于细胞治疗。在Timmermans等人, *Journal of Immunology*, 2009, 182:6879-6888, Nishimura T等人, 2013, *Cell Stem Cell* 114-126, WO 2013176197 A1, 和WO 2011096482 A1中举例说明了诱导多能干细胞向T细胞分化的方法。在分化时,可以缺失Rag 1和Rag 2基因以抑制TCR的重排。对于Rag 1和Rag 2基因,只需缺失一个或另一个。

[0139] T细胞是表达CD3以及CD4和CD8中至少之一的细胞。根据治疗目的,可以将细胞分化为表达CD8的杀伤性T细胞或表达CD4的辅助性T细胞。

[0140] 通过本申请的方法获得的细胞可以用于治疗免疫介导的疾病,例如表达与引入的TCR或CAR特异性结合的抗原的癌症、传染性疾病、自身免疫性疾病和变态反应。在本申请的方法中,将得到的T细胞悬浮在适当的培养基如生理盐水或PBS中,并用于治疗其HLA在一定程度上与获得材料细胞的供体匹配的患者。供体和患者的HLA类型可以完全匹配,或者如果供体具有纯合子的HLA单倍型,则至少一种HLA单倍型匹配。当然,源自患者自身的体细胞的多能干细胞可以用作材料细胞。向患者施用细胞应通过静脉内进行。

[0141] 例如,iPS细胞可以是具有与要治疗的受试者的至少一种HLA单倍型匹配的HLA单倍型并选自iPS细胞库的细胞,其中iPS细胞库存储了由具有纯合子HLA单倍型的供体细胞建立的iPS细胞以及有关每个供体的HLA的信息。

[0142] 要施用的细胞数没有特别限制,可以根据患者的年龄、性别、身高、体重、目标疾病、症状等适当确定。最佳的细胞数可以通过临床试验来确定。

[0143] 本申请的方法可用于诱导抗原特异性T细胞或抗原特异性CAR-T细胞。本申请的方法可以应用于针对各种疾病的免疫细胞治疗,例如癌症、传染病、自身免疫疾病和变态反应。

[0144] 在另一方面,本申请提供了一种制备用于细胞治疗的细胞的方法,其中将外源TCR α 和TCR β 基因引入具有基因重排的TCR的T细胞(材料细胞)的TCR基因座中的V区启动子和C区增强子之间。在作为材料细胞的T细胞上表达的TCR α 或TCR β 的表达控制系统下引入外源TCR α 和TCR β 基因,从而表达了两个引入的TCR基因。未用于引入外源TCR α 和TCR β 基因的TCR表达系统可以存在缺陷。

[0145] 在这方面中,将上述用于引入外源抗原受体基因的材料细胞分化为T祖细胞或T细

胞,然后通过基因组编辑或重组酶介导的盒式交换(RMCE)将外源TCR或CAR基因引入诱导的T祖细胞或T细胞的TCR基因座中的V区启动子和C区增强子之间。

[0146] 例如,如果用于引入外源抗原受体基因的材料细胞具有已知的TCR或CAR基因,则诱导的T祖细胞或T细胞中的已知TCR或CAR基因可基因组编辑或重组酶介导的盒式交换(RMCE)用外源TCR或CAR基因替换,然后使用对已知TCR或CAR基因具有特异性的抗体或四聚体排除其已知TCR或CAR基因未成功被外源TCR或CAR基因替换的细胞。

[0147] 如以上分步说明中所述,本申请还提供了一种制备包含外源TCR或CAR基因的细胞的方法,该方法包括以下步骤:(1)制备包含耐药基因盒的载体,所述载体从上游到下游依次包含:TCR基因座中的V区启动子,第一重组酶的靶序列(i),可在材料细胞中表达的启动子,被连接以在可在材料细胞中表达的该启动子下表达的第一耐药基因,不同于靶序列(i)的第一重组酶的靶序列(ii),第二耐药基因和第二重组酶的靶序列,

[0148] (2)将(1)的序列敲入材料细胞基因组上的TCR基因座中;

[0149] (3)在第一耐药基因具有耐性的药物存在下培养(2)中获得的细胞,以选择已成功敲入耐药基因盒的细胞;

[0150] (4)制备TCR或CAR基因盒式交换载体,其从上游到下游依次包含第一重组酶的靶序列(i),外源TCR或CAR基因,第二重组酶的靶序列,可在材料细胞中表达的启动子,以及第一重组酶的靶序列(ii);

[0151] (5)将TCR或CAR基因盒式交换载体引入步骤(3)中选择的已敲入耐药盒的材料细胞中,同时将第一重组酶应用到材料细胞上,从而用TCR或CAR基因盒式交换载体中第一重组酶的靶序列(i)和(ii)夹持的序列替换耐药基因盒中的序列;

[0152] (6)将第二耐药基因具有耐性的药物应用于细胞以选择已成功交换了盒的细胞;

[0153] (7)将第二重组酶应用于(6)中选择的细胞,以除去第二重组酶的靶序列夹持的第二耐药基因部分。

[0154] 作为有效产生用所需TCR或CAR基因转染的T细胞的方法的一个实例,本申请还提供了一种方法,该方法包括以下步骤:

[0155] (1)制备包含耐药基因盒的载体,所述载体从上游到下游依次包含TCR基因座中的V区启动子,第一重组酶的靶序列(i),可在材料细胞中表达的启动子,被连接以在可在材料细胞中表达的启动子下表达的第一耐药基因,不同于靶序列(i)的第一重组酶的靶序列(ii),第二耐药基因和第二重组酶的靶序列,

[0156] (2)将(1)的序列敲入材料细胞基因组上的TCR基因座中;

[0157] (3)在第一耐药基因具有耐性的药物存在下培养(2)中获得的细胞,以选择已成功敲入耐药基因盒的细胞;

[0158] (4)制备已知的TCR或CAR基因盒式交换载体,其从上游到下游依次包含第一重组酶的靶序列(i),已知外源TCR或CAR基因,第二重组酶的靶序列,可在材料细胞中表达的启动子,以及第一重组酶的靶序列(ii);

[0159] (5)将已知的TCR或CAR基因盒式交换载体引入步骤(3)中选择的已敲入耐药盒的材料细胞中,同时将第一重组酶应用于材料细胞,从而用已知的TCR或CAR基因盒式交换载体中的第一重组酶的靶序列(i)和(ii)夹持的序列替换耐药基因盒中的序列;

[0160] (6)将第二耐药基因具有耐性的药物应用于细胞以选择已成功交换了盒的细胞;

[0161] (7) 将选择的细胞分化为T细胞；

[0162] (8) 制备所需的TCR或CAR基因盒式交换载体,其从上游到下游依次包含第一重组酶的靶序列(i),所需的TCR或CAR基因,第二重组酶的靶序列,可在材料细胞中表达的启动子,以及第一重组酶的靶序列(ii);

[0163] (9) 将所需的TCR或CAR基因盒式交换载体引入步骤(7)中获得的T细胞中,同时应用第一重组酶以使所需的TCR或CAR载体中的靶序列(i)和(ii)夹持的所需TCR或CAR基因与T细胞中已知的TCR或CAR基因交换;

[0164] (10) 将第二重组酶应用于(9)中选择的细胞,以去除第二重组酶的靶序列夹持的第二耐药基因部分。

[0165] 实施例1

[0166] 将参考下面的实施例更详细地描述本申请。在本申请的实施例中,使用了T细胞系Jurkat细胞。Jurkat细胞既有尚未完全重排的TCR基因座(直到D-J重组),也有重排的TCR基因座(VDJ重组)。在这个实施例中,使用了重排的TCR基因座被破坏的Jurkat细胞。

[0167] 通过盒式交换法在T细胞受体(TCR)基因被破坏的Jurkat细胞中表达外源TCR

[0168] 1) 试剂,抗体等:

[0169] 使用了KOD-Plus-Neo(Toyobo,KOD-401),Amaya(注册商标)Cell Line Nucleofector(注册商标)Kit V(Lonza,VACA-1003),Gibson组装预混液(New England Biolabs(NEB,E2611S),Gateway(注册商标)LR ClonaseTMII酶混合物(Thermo Fisher Scientific,11791-020),潮霉素B金(InvivoGen,ant-hg-1),二盐酸嘌呤霉素(Wako,160-23151),更昔洛韦(Wako,078-04481),PE/Cy7抗人TCR α / β (BioLegend,306719)和APC小鼠抗人CD3(BD Pharmingen,557597)。

[0170] 另外,将pBRBII-AscI_FRTPGKpac Δ tkpA_AscI用作载体。

[0171] Jurkat细胞是源自人白血病细胞的T细胞系。使用了其中TCR基因被辐射(J.RT3-T3.5)破坏的株系(J.Exp.Med.160.1284-1299.1984)。

[0172] 2) 耐药基因盒载体的构建

[0173] 作为图3G所示的耐药基因盒载体,将以下各序列连接以构建质粒:1ox2272序列(5'-ATAACTTCGTATAAAGTATCCTATACGAAGTTAT-3'(SEQ ID NO:1))(其是Cre重组酶的靶序列),小鼠磷酸甘油酸激酶(PGK)基因启动子(pPGK),PGK基因下游的潮霉素耐性基因(Hygror),PGK基因的聚腺苷酸化序列(pA)和1oxP序列(5'-ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT-3'(SEQ ID NO:2))(其是不同于1ox2272的Cre重组酶的靶序列),嘌呤霉素耐性基因与疱疹病毒胸苷激酶(Δ TK)(Puror Δ TK)的激酶结构域之间的融合基因,pA序列和frt序列(其是酵母重组酶Flippase(FLP)的靶序列)。

[0174] 首先,设计如图3A所示的由“与载体相同的序列(约15bp)”-“1ox2272”-“PGK启动子5'侧序列”组成的引物1。将引物2设计为“与载体相同的序列”-“PGK启动子3'侧的序列”,并使用pBRBII-AscI_FRTPGKpac Δ tkpA_AscI载体作为模板通过PCR进行扩增(图3A)。然后如图3B所示用限制酶XbaI切割pBRMC1DTApA载体。引物1具有与被限制酶XbaI切割的载体的位点的5'侧序列-1相同的DNA序列,引物2具有与相同切割位点的约15bp的3'侧序列-2相同的DNA序列(图3A,B)。图3A和B所示的PCR产物和限制酶XbaI切割的载体分别通过Gibson装配预混液(E2611S,New England Biolabs(NEB))通过大约15bp的相同序列连接,从而获得

具有图3C所示的结构PGK载体。Gibson组装根据Gibson组装预混液手册进行。

[0175] 接下来,如图3E和F所示,设计了引物3(图3E)(其包含与PGK载体序列的一部分(图3D)相同的序列-3和潮霉素耐性基因的5'侧的一部分),以及引物6(图3F)(其包括与PGK载体的一部分相同的序列-4和frt序列的一部分)。引物4和引物5(图3E,F)被设计成具有彼此同源的序列,其中引物4具有loxP序列和部分pA序列,而引物-2具有嘌呤霉素耐性基因(无起始密码子)的部分序列。使用PB-flox(CAG-mCherry-IH;TRE3G-miR-155-LacZa)载体作为模板并使用引物3和引物4通过PCR进行扩增(图3E)。

[0176] 类似地,使用pBRB111-AscI_FRTPGKpac Δ tkpA_AscI载体作为模板,使用引物5和引物6进行PCR(图3F)。然后用限制酶XbaI切割图3C中的PGK载体(图3D),并将图3E和F中产生的PCR产物通过Gibson组装法连接以获得耐药基因盒载体(图3G)。

[0177] 引物的序列如下。

[0178] 引物1:

[0179] 5'-GCGGTGGCGGCCGCTATAACTTCGTATAAAGTATCCTATACGAAGTTATTACCGGGTAGGGGAGGCGCTT-3'(SEQ ID NO:3),,

[0180] 引物2:5'-GGGGATCCACTAGTTCTAGACGAAAGGCCCGGAGATGAGGA-3'(SEQ ID NO:4),

[0181] 引物3:5'-CTCCGGCCTTTCGTGCCACCATGAAAAAGCCTGAACTCACC-3'(SEQ ID NO:5),

[0182] 引物4:5'-ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCAACTATGAAACATTATCATA-3'(SEQ ID NO:6),

[0183] 引物5:5'-ATTATACGAAGTTATCCACCGAGTACAAGCCCACGGTG-3'(SEQ ID NO:7),

[0184] 引物6:5'-GGGGATCCACTAGTTGAAGTTCCTATACTTTCTAGA-3'(SEQ ID NO:8)。

[0185] 使用KOD-Plus-Neo(KOD-401,TOYOBO)在以下条件进行PCR:1)94℃下2分钟,2)98℃下10秒,3)50至60℃下30秒和4)68℃下2分钟,2)至4)进行30至35个循环。

[0186] 去除嘌呤霉素耐性基因中的起始密码子以避免在进行盒式交换之前表达(引物5)。在Frt的下游,整合了MC1启动子和白喉毒素基因(DTA)(图3G)。

[0187] 3) 构建耐药基因盒敲入靶向载体(1)

[0188] 获得5'臂和3'臂以及启动子DNA片段

[0189] 从人T细胞受体β(TCRβ)(TCRDB2)的DB2基因上游约110bp的位置到更上游约1.6kbp的位点的DNA片段被指定为5'臂,而从TCRDB2上游约50bp的位点到下游约1.6kbp的位点的DNA片段被指定为3'臂(图4A)。使用Jurkat细胞的基因组DNA作为模板,利用如下所示的引物,通过PCR扩增每个DNA片段。作为内源V基因启动子,在本实施例中使用了TCRβV20-1基因的启动子(Vβ20-1启动子)。对于Vβ20-1启动子,扩增了从上游的第一个外显子的翻译起始位点之前到大约1.6kbp的DNA片段(如图4B)。

[0190] 用于PCR的每种引物均添加了DNA序列,以便可以将所得PCR产物引入耐药盒载体中。使用上述Gibson组装方法通过添加的序列构建载体。使用的引物序列如下。

[0191] 用于获得5'臂(约1.6kbp)的引物

[0192] 引物5'-1:5'-CTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTTCAAAAGCTCCTTCTGTTGT-3'(SEQ ID NO:9)

[0193] 引物3'-1:5'-ATGATGCGGCCGCTAGCCTTGAAAAGACAAAGGCAGT-3'(SEQ ID NO:10)

[0194] 用于获得3'臂(约1.6kbp)的引物

[0195] 引物5'-2:5'-AGGAATTCGATATCATTTAAATGAGGGGGACTAGCAGGGAGGA-3' (SEQ ID NO: 11)

[0196] 引物3'-2:5'-TCGACGGTATCGATATTTAAATCCCCGAAAGTCAGGACGTTG-3' (SEQ ID NO: 12)

[0197] 用于获得Vβ20-1启动子(约1.6kbp)的引物

[0198] F:5'-GCTAGCGGCCGCATCATGAGACCATCTGTACCTG-3' (SEQ ID NO:13)

[0199] R:5'-ATACGAAGTTATAGCTAGTCTTCCGTGATGGCCTCACACCA-3' (SEQ ID NO:14)

[0200] 使用Jurkat细胞的基因组DNA作为模板,利用KOD-Plus-Neo进行PCR反应:1) 95°C, 3分钟→2) 98°C, 10秒→3) 50至60°C, 30秒→4) 68°C, 1至3分钟, 2) 至4) 进行30至35个循环。

[0201] 4) 构建耐药基因盒敲入靶向载体II

[0202] 构建用于敲入TCRβ基因座Dβ2区的耐药基因盒敲入(KI)靶向载体

[0203] 用限制酶HindIII在耐药基因盒的frt位点外侧(下游)的位点切割载体(图5,A), 并根据手册使用Gibson组装法将3'臂DNA片段置于其中(图5B)。接下来,用限制酶NotI切割载体中耐药基因盒中lox2272的外侧(上游)(图5,C),并同时使用Gibson组装方法引入5'臂DNA片段和Vβ20-1启动子DNA片段(图5D)。

[0204] 在以下步骤中使用所得的耐药基因盒敲入靶向载体(KI)(耐药基因盒KI靶向载体,7)。

[0205] 5) 通过同源重组将耐药基因盒敲入Jurkat细胞中TCRβ基因座的Dβ2区域。

[0206] 产生敲入(KI)耐药基因的Jurkat细胞

[0207] 在所有实施例中,将以下所示的培养基用于细胞培养。在通过试剂选择的情况下,将每种试剂添加至以下所示的组合物中并进行培养。

[0208] [表1]

细胞培养基	(终浓度)
RPMI1640	500mL
FCS	50mL (9%)
*青霉素/链霉素/L-谷氨酰胺溶液	5.55mL (1%)
2-巯基乙醇	2μL (50μM)
合计	555mL

[0210] *青霉素/链霉素/L-谷氨酰胺溶液的成分为10,000U/mL的青霉素,10,000μg/mL的链霉素和29.2mg/mL的L-谷氨酰胺,因此最终浓度分别为100U/mL,100μg/mL和292μg/mL。

[0211] 通过电穿孔将载体引入细胞。电穿孔根据Amaxa®CellLineNucleofector®Kit V的手册进行。将细胞和载体悬浮在试剂盒中提供的试剂中,将悬浮液转移到试剂盒中提供的试管中,并设置在AmaxaNucleofectorII (Lonza)中,然后使用内置程序X001将载体引入细胞。

[0212] 使用耐药基因KI靶向载体(图6,中图),将Vβ20-1启动子和耐药基因盒引入T细胞系Jurkat细胞的TCRβ基因座中Dβ2基因上游约50bp处(图6,上图)。在图6的下图中显示了引入载体的该实施例的示意图。

[0213] 为了提高通过同源重组敲入的效率,通过CRISPR/Cas9n系统在Dβ2基因上游约50bp处引入了两个单链断裂(切口)。将KI靶向载体与两个CRISPR/Cas9n载体(参见下文)一

起引入J.RT3-T3.5 Jurkat细胞,这是Jurkat细胞系的一种变体,其内源性TCR β 基因的表达受损(以下称为Jurkat β 突变体)(J.Exp.Med.160.1284-1299.1984)。

[0214] 在通过同源重组将耐药基因盒整合到其基因组DNA中的细胞中,潮霉素耐性基因(第一耐药基因)由PGK启动子表达。嘌呤霉素耐性基因(第二耐药基因)在此未表达。(图6,下图)。使用250 μ g/mL潮霉素/培养基选择将耐药基因盒整合到其基因组中的克隆(正向选择)。

[0215] 另一方面,由于在细胞中产生了白喉毒素(DTA),通过随机整合将耐药基因KI靶向载体的5'-臂和3'-臂序列的外侧部分整合到其基因组DNA中的细胞无法存活(图3),因此被去除(负选择)。然后,从如此选择的细胞(克隆)中,通过PCR鉴定出从耐药基因盒的V β 20-1启动子到frt的部分被整合到TCR β 2基因座中的克隆。因此,选择在DB2区域具有V β 20-1启动子和耐药基因盒的克隆(耐药基因KI-Jurkat细胞)。

[0216] 材料

[0217] [表2]

[0218]	细胞	Jurkat β 突变体	1x10 ⁶ 个细胞
		耐药基因 KI 靶向载体	1.2 μ g
[0219]	载体	CRISPR/Cas9n 载体 1	0.6 μ g
		CRISPR/Cas9n 载体 2	0.7 μ g
	试剂	Amaxa [®] CellLineNucleofector [®] KitV	100 μ L

[0220] 通过使用以下寡核苷酸制备CRISPR/Cas9n载体:

[0221] A: 5' -CACCGAGGTTAGTCTGACTGTGTG-3' (SEQ ID NO:15),

[0222] B: 5' -AAACCACACAGTCAGACTAACCTC-3' (SEQ ID NO:16)

[0223] C: 5' -CACCTGCCGCTGCCAGTGGTTG-3' (SEQ ID NO:17)

[0224] D: 5' -AAACCAACCACTGGGCAGCGGCAG-3' (SEQ ID NO:18)

[0225] 分别对寡核苷酸A和B(载体1)以及寡核苷酸C和D进行退火,然后将其引入用限制酶Bbs1切割的质粒pX460中。

[0226] 6) 耐药基因KI-Jurkat细胞中TCR α 基因的破坏(TCR α -KO耐药基因KI-Jurkat细胞的产生)

[0227] TCR通过单个T细胞中的 α 和 β 链的独特组合特异性识别特定的抗原/HLA复合物。在该实施例中,内源TCR α -链基因被CRISPR/Cas9系统破坏,以维持随后被引入细胞的TCR的 α -链和 β -链的严格结合。

[0228] 材料

[0229] [表3]

[0230]	细胞	耐药基因 KI-Jurkat 细胞	1x10 ⁶ 个细胞
	载体	TCR α _KO 的 CRISPR/Cas9 载体	2.5 μ g
	试剂	Amaya [®] CellLineNucleofector [®] KitV	100 μ L

[0231] 通过使用以下寡核苷酸制备CRISPR/Cas9载体

[0232] E: 5'-CACCGAGAATCAAAATCGGTGAAT-3' (SEQ ID NO:19)

[0233] F: 5'-AAACATTCACCGATTTTGATTCTC-3' (SEQ ID NO:20)

[0234] 对寡核苷酸E和F进行退火,然后将其引入用限制酶Bbs1切割的质粒pX330中。

[0235] 如步骤5)中所述,将载体引入细胞。然后,将载体转染的细胞以每孔约0.5个细胞的密度接种在96孔板上,在该板上以每孔1x10⁵个细胞的密度接种有B6小鼠胸腺细胞。3至4周后,分离克隆,提取基因组DNA,并通过PCR扩增包含CRISPR/Cas9靶位点的DNA区域并解读其序列来分析TCR α 基因。结果,鉴定了在两个等位基因上显示TCR α 基因破坏的克隆(引起移码的突变)。

[0236] 所用的PCR引物如下。用正向引物进行PCR产物的序列分析。

[0237] 正向引物: 5'-CCTTGTCATCACTGGCATC-3' (SEQ ID NO:21)

[0238] 反向引物: 5'-AAAGTCAGATTTGTTGCTCCA-3' (SEQ ID NO:22)

[0239] 7) 构建TCR β -p2A-TCR α 载体 (TCR供体载体)

[0240] TCR是由 α 和 β 链组成的异二聚体,要表达功能性TCR,需要同时表达 α 和 β 链。通常,在这种情况下,引入 α 和 β 链的基因并在基因组中的不同位置表达。在该系统中,外来基因仅被引入TCR DB2区,因此这两个基因必须从单个位点表达。通常使用的两种主要方法是使用内部核糖体进入位点(IRES)的方法和使用自切割2A肽的方法。IRES可以从一种mRNA产生两种多肽,但是两种多肽的表达水平可能会有偏差。另一方面,在使用2A肽的方法的情况下,从一个mRNA产生一个多肽,该多肽被切割形成两个分子,因此这两个肽的比例将是一比一的。在该实施例中,通过使用由约22个氨基酸组成的2A肽,从TCRDB2区域同时表达 α 链和 β 链基因。在几种类型的2A肽(p2A,T2A,E2A,F2A等)中,使用了p2A肽。由p2A肽连接的 α 和 β 链被描述为TCR α -p2A-TCR β 或TCR β -p2A-TCR α 。

[0241] TCR β -p2A-TCR α 被如下构建。pENTR载体是进入载体(Thermo Fisher Scientific的Gateway系统),其中包含attL序列, λ 噬菌体的重组序列,并且attL和attR之间的重组由LR克隆酶重组酶介导(图10)。如图7A所示,用限制酶(Sa1I和EcoRI)切割诸如pENTR1A或pENTR3C(Thermo Fisher Scientific)的Gateway载体。另一方面,将具有TCR β (图7B)或TCR α (图7C)的质粒用作模板,以通过PCR制备相应的DNA片段。引物1(图7B)具有TCR β 序列的一部分和在载体的限制酶切割位点5'侧与序列1的15bp相同的序列(图7A),而引物2则具有TCR β 序列的一部分和p2A肽的大约66bp的DNA序列的54bp。引物3(图7C)具有TCR α 序列的一部分和p2A序列的28bp,而引物4具有TCR α 序列的一部分和在载体的限制酶切割位点3'侧15bp的相同序列(序列2)。通过限制酶Sa1I和EcoRI切割的pENTR1A载体以及TCR β 和TCR α 的PCR产物分别通过Gibson装配法(图7D)通过彼此重叠的部分连接(图7E)。

[0242] 当pENTR1A或pENTR3C用作载体并用Sa1I和EcoRI切割时,引物2和引物4可用于将所有人TCR β 和TCR α 克隆到载体中。

[0243] 引物的序列如下,PCR在KOD-Plus-Neo中在以下条件进行:1) 94°C,2分钟→2) 98°C,10秒→3) 50至60°C,30秒→4) 68°C,2分钟,2) 至4) 进行30到35个循环。

[0244] 引物1:5'-AAGGAACCAATTCAGTCGACCACCATGCTGCTGCTTCTGCTGCTT-3' (SEQ ID NO:23)

[0245] 引物2:5'-CTCCTCCACGTCTCCAGCCTGCTTCAGCAGGCTGAAGTTAGTAGCTCCGCTTCCGCCTCTGGAATCCTTTCTCTT-3' (SEQ ID NO:24)

[0246] 引物3:5'-TGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGATGATATCCTTGAGAGTT-3' (SEQ ID NO:25)

[0247] 引物4:5'-TCGAGTGC GGCCGCGAATTCTCAGCTGGACCACAGCCGAG-3' (SEQ ID NO:26)

[0248] 8) 盒式交换载体I的构建:载体框架的制备

[0249] Frt和PGK启动子在其中彼此靠近的质粒(pBRBII-AscI_FRTPGKpac ΔtkpA_AscI)被用作模板,以通过PCR扩增frt-PGK启动子DNA片段(图8A)。引物1具有Frt序列的一部分,加上限制酶NheI和XhoI的靶序列,lox2272序列以及与pBluescriptSK(-)载体的序列-1相同的序列(图8B),引物2具有PGK启动子的一部分加上loxP序列,以及与pBluescriptSK(-)载体的序列-2相同的序列(图8A,B)。pBluescriptSK(-)载体的序列1和序列2(图8B)在限制酶(KpnI和SacI)靶序列的外侧。通过Gibson装配法,将使用引物1和引物2获得的PCR产物与用限制酶KpnI和SacI切割的载体连接,以制备Frt-PGK载体(图8C)。

[0250] 将Frt-PGK载体(图8C)用在引物1中设计的限制酶识别位点(NheI和XhoI)处进行切割,并使用DNA连接酶将具有与限制酶互补的切割末端的DNA 1与之连接(图8E)。再次将该载体用在引物1中设计的限制酶识别位点(NheI或XhoI)处进行切割,并以与DNA 1相同的方式将其与DNA 2连接。通过重复该过程,可在lox2272和frt之间引入多个所需的DNA片段。可以通过DNA连接反应或Gibson组装法进行引入。使用该方法,制备了前盒式交换载体(图9)。

[0251] 9) 盒式交换载体的构建II:前盒式交换载体的构建

[0252] 通过限制酶NheI和XhoI从CSIV-TRE-RfA-CMV-KT载体中切出由attR1序列、氯霉素抗性基因、ccdb基因和attR2序列组成的基因盒(RfA盒)。通过DNA连接酶将RfA盒与用限制酶NheI和XhoI(图8D至8G)切割的Frt-PGK载体(图9A)连接,以构建前盒式交换载体1(图9B)。用XhoI切割载体(pCAG-EGxxFP)以分离兔β-珠蛋白基因的聚A-添加序列(图9C),并将该基因引入XhoI切割的前盒式交换载体1中以构建前体盒式交换载体2(图9D)。此外,用NheI切割前盒式交换载体2,并且通过PCR扩增的人多肽链延长因子α(EF1α)的第一内含子或鸡β-肌动蛋白(CAG)基因启动子的内含子(图9E)通过Gibson组装法连接(图9F)。具有紧接在lox2272之后的内含子的前盒式交换载体被指定为前盒式交换载体3。

[0253] 使用人基因组DNA和pCAG-Cre-IP载体为模板以及下面的引物,通过PCR分别分离出EF1α基因的内含子和CAG启动子的内含子。

[0254] EF1α基因中的内含子:

[0255] F:5'-TATACGAAGTTATCGCTAGCGGTTTGCCGCCAGAACACAG-3' (SEQ ID NO:27)

[0256] R:5'-TACAACTTGTGATGCTAGCGTAGTTTTTCACGACACCTGA-3' (SEQ ID NO:28)

[0257] CAG启动子中的内含子:

[0258] F:5'-TATACGAAGTTATCGCTAGCGCCCCGGCTCTGACTGACCG-3' (SEQ ID NO:29)

[0259] R:5'-TACAACTTGTGATGCTAGCGACAGCACAATAACCAGCAC-3' (SEQ ID NO:30)

[0260] PCR在KOD-Plus-Neo中在以下条件下进行:1) 95°C下3分钟,2) 98°C下10秒,3) 50至60°C下30秒,以及4) 68°C下1-3分钟,然后将2)至4)进行30至35个循环。

[0261] 10) 盒式交换载体III的构建:TCR盒式交换载体的创建

[0262] 根据GatewayRL®ClonaseTMII酶混合物(Thermo Fisher Scientific,11791-020)的手册,将前盒式交换载体3(图9F,图10的上部)和TCR供载体(图7E,图10的中部)混合并反应。。在该反应中,在attR和attL之间发生重组,并且attR1和attR2夹持的部分被attL1和attL2夹持的部分替换(图10)。结果,获得了TCR盒式交换载体(图10的下部)。在该实施例中,使用了具有来自CAG启动子的内含子的前盒式交换载体3。

[0263] 11) TCR α -KO耐药基因KI-Jurkat细胞中的TCR盒式交换(TCR盒式交换Jurkat细胞的产生)

[0264] 材料

[0265] [表4]

[0266]	细胞	TCR α -KO 耐药基因 KI-Jurkat 细胞	2x10 ⁶ 个细胞
	载体	TCR 盒交换载体 Cre 重组酶表达载体(pCAG-nls-Cre)	1 μ g 4 μ g
	试剂	Amaxa [®] CellLineNucleofector [®] KitV	100 μ L

[0267] 图11示意性地示出了同源重组后的人TCRB基因座的DB2区(空盒平台:1ox2272和1oxP夹持的区域)(上图),TCR盒式交换载体(中图)和盒式交换后的TCRB基因座(下图)。为了诱导盒式交换,通过电穿孔将TCR盒式交换载体和Cre表达载体(pCAG-nls-Cre)引入TCR α -KO耐药基因KI-Jurkat细胞。在该实施例中,引入了对WT1抗原特异的TCR(KM#3-3)。随着Cre和盒式交换载体的引入,1ox2272和1oxP之间的部分,潮霉素耐性基因和TCR基因-frt-PGK启动子通过Cre重组酶的作用被替换(盒式交换)。在盒式交换之前,嘌呤霉素耐性基因没有表达,因为它缺少启动子和起始密码子。相反,在盒式交换后,PGK启动子紧接在嘌呤霉素耐性基因的前面,而设置在紧接1oxP之前的起始密码子被连接到同一翻译阅读框中的嘌呤霉素耐性基因。由此,嘌呤霉素耐性基因的表达仅在成功进行了盒式交换的细胞中开始。使用0.25 μ g/mL嘌呤霉素/培养基选择细胞,约一周后,获得了嘌呤霉素耐性细胞(TCR盒式交换的Jurkat细胞)。

[0268] 12) 将FLP载体引入TCR盒式交换的Jurkat细胞(产生表达外源TCR的Jurkat细胞)

[0269] 材料

[0270] [表5]

[0271]	细胞	TCR 盒交换的 Jurkat 细胞	2x10 ⁶ 个细胞
	载体	FLP 重组酶表达载体 (pCAGGS-FLPe)	5 μ g
	试剂	Amaxa [®] CellLineNucleofector [®] KitV	100 μ L

[0272] 通过电穿孔将FLP重组酶表达载体(pCAGGS-FLPe)引入TCR盒式交换的Jurkat细胞。FLP识别frt序列并缺失它们夹持的区域。图12显示了盒式交换后的TCR β 基因座的DB β 2区域(上图)和缺失了frt序列夹持的部分的TCR β 基因座(下图)。

[0273] 引入FLP几天后,将细胞用荧光标记的针对TCR或CD3的抗体(PE/Cy7抗人TCR α/β (306719, BioLegend)和APC-小鼠抗人CD3 (557597, BDPharmingen))染色,并通过FACS进行分析以评估外源TCR的表达水平。在体内T细胞中,TCRV β 基因的启动子由TCR β 区的增强子调控。因此,可以预期在该实施例中使用TCRV β 基因的启动子将导致类似于生理条件下的调控。在引入FLP之后,确实观察到了外源TCR的表达(图13)。认为发生了Frt序列之间的缺失,并且增强子(Enh)可以有效地作用于启动子(prom),从而导致TCR的表达。

[0274] 13) 利用更昔洛韦去除非FLP重组细胞

[0275] 在图13所示的结果中,有两个群体,一个表达TCR,一个不表达。存在通过FLP的作用缺失了frt夹持区域的细胞与没有发生缺失的细胞混合的可能性。因此,使用更昔洛韦去除了未能缺失该区域的细胞(未能通过FLP重组的细胞)。通常,更昔洛韦不作用于诸如Jurkat细胞的人类细胞(图14A)。相反,在具有Puro Δ TK的细胞中,更昔洛韦在被 Δ TK磷酸化时变成核酸的类似物,导致DNA复制受到抑制,从而导致细胞增殖停滞或细胞死亡(图14B)。在用12 μ M更昔洛韦/培养基温育5天后,通过FACS分析TCR和CD3在细胞膜上的表达。结果,几乎没有发现不表达TCR的细胞(图15)。不表达TCR的细胞群体被认为没有通过FLP重组。

[0276] 实施例2

[0277] 将耐药基因盒敲入人iPS细胞中TCR β 基因座的DB β 2区

[0278] 1) 试剂,抗体等:

[0279] 使用了**StemFit**[®]AK02N (TAKARA, AJ100), Y-27632 (Wako, 257-00511), 玻连蛋白(Vitronectin) (Thermo Fisher, A14700), 潮霉素(Invivogen, ant-hg-1), **lipofectamine**[®] (Thermo Fisher, 11668027), Opti-**MEM**[®] (Thermo Fisher, 31985070) 和KOD-FX (TOYOBO, KFX-101)。

[0280] 作为人iPS细胞,使用了253G1 (RIKEN, 源自人皮肤细胞)。

[0281] 2) 通过同源重组将耐药基因盒敲入人iPS细胞中TCR β 基因座的DB β 2区

[0282] 耐药基因敲入(KI) iPS细胞的分离

[0283] 在所有实验中,将**StemFit**[®]AK02N (TAKARA, AJ100) (一种用于人iPS细胞的培养基)用于iPS细胞培养。将Y-27632 (Wako, 257-00511) 以10 μ M的最终浓度添加到**StemFit**[®]中。将细胞接种在包被有玻连蛋白(Thermo Fisher, A14700)的6孔板中。用潮霉素选择时,将50 μ g/mL潮霉素(Invivogen, ant-hg-1)添加到培养物中。

[0284] 以与实施例1相同的方式设计耐药基因盒敲入靶向载体,并以与实施例1相同的方式引入iPS细胞。

[0285] 使用脂质转染法将载体引入细胞。根据**lipofectamine**[®] (Thermo Fisher, 11668027)的手册进行脂质转染。将载体和**lipofectamine**[®]悬浮在Opti-**MEM**[®] (Thermo Fisher, 31985070)培养基中,并与细胞混合,以将载体引入细胞。

[0286] 使用耐药基因KI靶向载体(图6,中图)将V β 20-1启动子和耐药基因盒引入人iPS细胞的TCR β 基因座(图6,上图)中DB β 2基因上游约50bp处。图6下图示出了成功引入的示意图。

[0287] 为了提高通过同源重组敲入的效率,通过CRISPR/Cas9系统在DB2基因上游约50bp的位点引入了一个单链断裂。将KI靶向载体与CRISPR/Cas9载体一起引入人iPS细胞中,以引入双链断裂(请参见以下材料)。

[0288] 在已经通过同源重组将耐药基因盒整合到其基因组DNA中的细胞中,潮霉素抗性基因(第一耐药基因)通过PGK启动子的作用表达(嘌呤霉素抗性基因(第二耐药基因)在此处未表达)(图6,下图)。为了这个目的,使用50 μ g/mL潮霉素/培养基选择将耐药基因盒整合到其基因组中的克隆(正向选择)。

[0289] 另一方面,由于细胞内产生了白喉毒素(DTA)(图3),通过随机整合而整合了耐药基因KI靶向载体的5'臂和3'臂的外部部分的细胞不能存活(负选择)。然后,从如此选择的细胞(克隆)中,通过PCR鉴定出从耐药基因盒的V β 20-1启动子到frt的部分被整合到TCR β 2基因座中的克隆。因此,选择了在DB2区域具有V β 20-1启动子和耐药基因盒的克隆(耐药基因KI-iPS细胞)。

[0290] 材料

[0291] [表6]

	人 iPS 细胞	1x10 ⁵ 个细胞
[0292]	载体	耐药基因 KI 靶向载体 CRISPR/Cas9n 载体
		1.4 μ g 0.7 μ g
	试剂	Lipofectamine® Opti-MEM®
		2 μ L 50 μ L

[0293] 通过使用以下寡核苷酸A和B制备CRISPR/Cas9载体:

[0294] A:5'-CACCTGCCGCTGCCAGTGGTTG-3'(SEQ ID NO:31)

[0295] B:5'-AAACCAACCACTGGGCAGCGGCAG-3'(SEQ ID NO:32)

[0296] 将寡核苷酸A和B退火,并引入质粒pX330中,该质粒用限制酶BbsI切割。

[0297] 使用基因组DNA作为模板,对潮霉素抗性克隆进行PCR,以检查敲入是否成功。使用KOD-FX(TOYOBO,KFX-101)在以下条件下进行PCR:1)94 $^{\circ}$ C下2分钟,→2)98 $^{\circ}$ C下10秒,→3)60 $^{\circ}$ C下30秒,→4)68 $^{\circ}$ C下5分钟,将2)至4)进行35个循环。PCR中使用的引物如下所示。

[0298] 引物正向(1)5'-ACGGCTGAAATCTCCCTAACCC-3'(SEQ ID NO:33)

[0299] 反向引物(2)5'-TACTTCCATTTGTACGTCCTG-3'(SEQ ID NO:34)

[0300] 引物正向(3)5'-CCTGCTGCAACTTACCTCC-3'(SEQ ID NO:35)

[0301] 反向引物(4)5'-GGGGACCGAGGGGCTGGAAG-3'(SEQ ID NO:36)

[0302] 每个引物的序列位点示于图16A和(B)。PCR产物的电泳结果示于图16C。在图16C中,1、2和3表示克隆编号。确认克隆2和3是成功正确敲入的克隆。来自KI-Jurkat细胞和敲入前iPS细胞的基因组DNA分别用作阳性对照(PC)WTiPS。

[0303] 实施例3

[0304] 这是图2-1中所示方法的一个实例,即,引入用于引入包含外源TCR或CAR基因的基因的盒,从而缩短材料细胞中TCR的C区增强子与TCR中V区启动子之间的距离。

[0305] 在实施例3中,建立了从没有发生重大基因重排的TCR β 基因座的V区中的VB20-1基因到C区中的CB2基因的180kbp区域被缺失的细胞系。用于建立克隆的方法的示意图如图20所示。作为材料细胞,使用了Jurkat细胞系的变体克隆,即J.RT3-T3.5 Jurkat细胞系(以下称为Jurkat β 突变体),其中由于引入的突变而不再表达重排的TCR β 基因(Ohashi等人, Science 316.606-609.1985)。

[0306] (1) 在TCR β 基因座的VB20-1和CB2区的基因组DNA截短。

[0307] 通过分别在TCRVB20-1基因的翻译起点下游30bp至80bp的区域和TCRCB2基因的外显子1处引入两个单链断裂(切口)来切割Jurkat β 突变体细胞的基因组DNA(图20中的垂直线,上图)。为了进行基因组DNA切割,通过电穿孔将四个CRISPR/Cas9n载体(参见下文材料)和EGFP表达载体都引入Jurkat β 突变体中。

[0308] 材料

[0309] [表7]

[0310]	细胞	Jurkat β 突变体	1 x 10 ⁶ 个细胞
[0311]	载体	1. CRISPR/Cas9n 载体 1	0.625 μ g
		2. CRISPR/Cas9n 载体 2	0.625 μ g
		3. CRISPR/Cas9n 载体 3	0.625 μ g
		4. CRISPR/Cas9n 载体 4	0.625 μ g
		5. pmax-GFP	0.25 μ g
	试剂	Amaya [®] CellLineNucleofector [®] KitV	100 μ L

[0312] CRISPR/Cas9n的载体如下:

[0313] VB20-1侧

[0314] A: 5'-CACCGGTAGAAGGAGGCTTATACC-3' (SEQ ID NO:37)

[0315] B: 5'-AAACGGTATAAGCCTCCTTCTACC-3' (SEQ ID NO:38)

[0316] C: 5'-CACCGGGTGGGCATGTGCGTGTGT-3' (SEQ ID NO:39)

[0317] D: 5'-AAACACACACGCACATGCCACCC-3' (SEQ ID NO:40)

[0318] CB2侧

[0319] E: 5'-CACCGCAAACACAGCGACCTCGGGT-3' (SEQ ID NO:41)

[0320] F: 5'-AAACACCCGAGGTCGCTGTGTTTGC-3' (SEQ ID NO:42)

[0321] G: 5'-CACCAGAGATCTCCACACCCAAA-3' (SEQ ID NO:43)

[0322] H: 5'-AACTTTGGGTGTGGGAGATCTCT-3' (SEQ ID NO:44)

[0323] 将寡核苷酸A和B(载体1),C和D(载体2),E和F(载体3)以及G和H(载体4)退火,并引入质粒pX460中,该质粒用限制酶BbsI切割。

[0324] (2) 分离缺少从VB20-1基因到CB2基因的180kbp区域的细胞。

[0325] 在整合了更多CRISPR/Cas9n载体的细胞中,基因组切割有望以更高的效率发生。因此,通过分选选择和克隆了整合了大量载体的一组细胞。基因转移后两天,使用细胞分选

仪分离出一组具有特别高表达水平的EGFP (基因转移效率的指标) 的细胞, 并将其以每孔一个细胞直接接种到96孔板中, 并进行培养(克隆)(图21A)。为了维持Jurkat β 突变体细胞的存活, 将96孔板预接种 1×10^5 个B6小鼠胸腺细胞。培养开始四到五周后, 从每个克隆中提取基因组DNA, 并通过PCR进行分析, 以查看V β 20-1和CB2区是否相连。用于PCR的引物如下所示。正向引物在V β 20-1基因翻译起始位点上游约140bp处, 反向引物对应于紧随CB2基因的外显子1之后的序列(图21B)。如果连接发生在引入CRISPR/Cas9n载体时预期发生切割的位点附近, 则可以通过PCR扩增约500bp的DNA片段。PCR反应产物的电泳分析表明了克隆#10, #11, #16和#17中V β 20-1和CB2区域的连接(图21C)。对于克隆#10, 对通过PCR扩增获得的DNA片段的序列分析证实了V β 20-1和CB2区通过6bp的DNA连接(图21D)。这导致建立了Jurkat β 突变株, 其中缺失了大约180kbp的区域, 并且V β 20-1和CB2区相连。在其他克隆中, 也通过DNA序列分析证实了V β 20-1区与CB2区的连接。

[0326] PCR引物

[0327] 正向引物: 5'-GTCATGGGCAAAGATTACCAC-3' (SEQ ID NO:45)

[0328] 反向引物: 5'-GGTAGCTGGTCTCACCTAATC-3' (SEQ ID NO:46)

[0329] 通过在本实施例中获得的细胞中的TCR中的C区增强子和V区启动子之间引入单链断裂(这些细胞经过修饰以减小C区增强子和V区启动子之间的距离), 然后将外源TCR或CAR基因引入细胞, 有可能制备其中已引入抗原受体基因的细胞。

[0330] 实施例4

[0331] 1) 将耐药基因盒平台敲入人iPS细胞中TCR β 基因座的D β 2区

[0332] 通过脂质转染将盒式平台序列敲入人iPS细胞(源自非T细胞, 未进行基因重排)。基于耐药性选择获得的细胞, 并通过集落挑选进行克隆, 以获得敲入了盒式平台的iPS细胞(cKI-iPSC)。

[0333] 材料

[0334] [表8]

[0335]	细胞	iPS 细胞系 I14s03 (从京都大学 iPS 细胞研究和应用中心获得)	3.6 $\times 10^5$ 个细胞
[0335]	载体	1. pX330-hTCRD β 2-gRNA #1 (Crispr/CAS9 和向导 RNA 表达载体) 2. 靶向耐药基因盒平台 KI 靶向载体的 HygroPuroD β 2-5' & V20-1 (图 22)	0.7 μ g 1.4 μ g
[0336]	试剂	FuGENE HD (Promega) Opti-MEM® (Thermo Fisher)	8 μ l 100 μ l
[0336]		iMatrix-511 (Nippi) 潮霉素 B 溶液 (Nakarai)	9.6 μ l
[0337]	培养基	AK03N (Ajinomoto CO.,INC)	

[0337] 在所有实验中, 使用AK03N培养iPS细胞。培养iPS细胞的单细胞悬液时, 加入Y-

27632 (Wako) 至终浓度为10 μ M。将包被有iMatrix (nippi) 的6孔板用于培养细胞。

[0338] 1-1) 将靶向载体敲入iPS细胞

[0339] 在进行脂质转染的前一天, 将iPS细胞接种在板上。通过脂质转染将上述比例的Crispr/CAS9和向导RNA表达载体与敲入靶向载体的混合物转移至iPS细胞。将载体和试剂悬浮在Opti-MEM[®]中后, 将它们添加到iPS细胞上, 并在4-6小时后更换培养基。

[0340] 1-2) 潮霉素选择

[0341] 从两天后开始, 使用潮霉素以如下所示的终浓度进行药物选择。在通过同源重组将耐药基因盒整合到其基因组DNA中的细胞中, 第一耐药基因(潮霉素耐性基因) 通过PGK启动子的作用表达, 而第二耐药基因(嘌呤霉素耐性基因) 在该阶段没有表达。因此, 首先使用含有潮霉素的培养基来选择将耐药基因盒整合到基因组中的克隆(正向选择)。

[0342] 第0天: 脂质转染

[0343] 第1天: 培养基更换

[0344] 第2天: 潮霉素25 μ g/ml

[0345] 第3天: 潮霉素40 μ g/ml

[0346] 第4-6天: 潮霉素50 μ g/ml

[0347] 第7天: 收集iPS集落

[0348] 1-3) 敲入盒的iPS细胞(cKI)的建立

[0349] 收集药物选择后残留的iPS细胞集落后, 建立了5个克隆。从每个克隆收集DNA, 并进行PCR以确认目的克隆。因为细胞中会产生白喉毒素(DTA), 通过随机整合将耐药基因KI靶向载体的5'臂和3'臂的外部部分整合到基因组DNA中的细胞无法存活, 并将其去除(负选择)。接下来, 从以这种方式选择的细胞(克隆)中, 通过PCR鉴定出从耐药基因盒的VB20-1启动子到frt的部分被整合到TCRDB2基因座中的克隆。基于以上, 选择了VB20-1启动子和耐药基因盒被引入DB2区的克隆(cKI-iPSC)。

[0350] 2) iPS单元上的“盒式磁带交换”

[0351] 在步骤1)中建立的cKI-iPSC的基因组上, 使用第一重组酶以盒式交换的方式引入外源TCR。

[0352] 材料

[0353] [表9]

	源自株 I14s03 的 cKI-iPS 细胞	1×10 ⁶ 个细胞
[0354]	细胞	
	载体	1. pCAGGS-NLS-Cre (Cre 重组酶表达载体) 7.9 μg 2. CAGint-WT1W3-3-EF1a (盒交换载体) 2.4 μg
	试剂	Opti-MEM (Thermo Fisher) 100 μl iMatrix-511 (nippi) 9.6 μl 嘌呤霉素 (Gibco)
	装置	NEPA21 (Nepa Gene Co., Ltd.)
	培养基	AK03N (Ajinomoto CO., INC)

[0355] 在所有实验中,使用AK03N培养iPS细胞。培养iPS细胞的单细胞悬液时,加入Y-27632 (Wako) 至终浓度为10μM。将包被有iMatrix (nippi) 的6孔板用于培养细胞。

[0356] 2-1) 通过电穿孔用上述比例的Cre表达载体和盒式交换载体的混合物转染cKI-iPS细胞。收集cKI-iPS细胞并将其转化为单细胞悬液,并将上述数目的细胞与载体一起悬浮于Opti-MEM®中以得到100μl悬浮液,然后进行电穿孔。电穿孔后,立即将细胞接种在6孔板上并进行培养。

[0357] 2-2) 嘌呤霉素药物选择

[0358] 在步骤1) 中引入的盒下游有第二个启动子,当盒成功交换后,该启动子下游的嘌呤霉素耐性基因将在iPS细胞中起作用。通过这种机制,成功进行了TCR/CAR盒式交换的iPS细胞对嘌呤霉素具有耐性。因此,该药物用于以下所示的最终浓度选择细胞。电穿孔2天后收获细胞,并再接种以得到具有相同数量细胞的培养物,然后进行嘌呤霉素的选择。这是因为在iPS细胞的情况下,嘌呤霉素的选择效率根据细胞密度而显著变化。

[0359] 第0天:电穿孔

[0360] 第1天:培养基更换

[0361] 第2天:以5×10⁴个细胞/孔再接种细胞

[0362] 第3天:嘌呤霉素180ng/ml

[0363] 第4天:嘌呤霉素150ng/ml

[0364] 第5-9天:培养基更换

[0365] 第10天:收集iPSC集落

[0366] 2-3) 盒式磁带交换的iPS细胞的建立 (exTCR-KI-iPSC)

[0367] 收集在药物选择中存活的iPS细胞集落后,建立了四个克隆。从每个克隆收集DNA,并进行PCR以确认目的克隆。使用了夹住5'臂的上游和盒载体的CAG内含子的5'侧确认引物和夹住3'臂的下游和载体中的EF1α启动子的3'侧确认引物。建立了可以检测到两个条带的株系,作为盒式交换TCR敲入iPS细胞 (exTCR-KI-iPSC)。

[0368] 3) 缺失Puror Δ TK

[0369] 在步骤2) 中建立的exTCR-KI-iPSC的基因组上,使用第二种重组酶缺失了Puror Δ TK位点,并且最终完成了制备T细胞的iPS细胞的制备。

[0370] 材料

[0371] [表10]

[0372]	细胞	exTCR-KI-iPS 细胞, 源自株 I14s03	1×10^6 个细胞
	载体	pCAGGS-FLP	10 μ g
[0372]	试剂	Opti-MEM (Thermo Fisher)	100 μ l
		iMatrix-511 (nippi) 更昔洛韦 (Wako)	9.6 μ l
	装置	NEPA21 (Nepa Gene Co., Ltd.)	
	培养基	AK03N (Ajinomoto CO.,INC)	

[0373] 在所有实验中,使用AK03N培养iPS细胞。培养iPS细胞的单细胞悬液时,加入Y-27632 (Wako) 至终浓度为 $10 \mu\text{M}$ 。将包被有iMatrix (nippi) 的6孔板用于培养细胞。

[0374] 3-1) 将FLP质粒转染到exTCR-KI-iPS细胞中,并去除被frt夹在中间的区域

[0375] 制备细胞的单细胞悬浮液,并将上述数目的细胞与质粒载体悬浮于Opti-MEM[®]中以得到 $100 \mu\text{l}$ 悬浮液,然后进行电穿孔。电穿孔后,立即将细胞接种并在6孔板中培养。

[0376] 3-2) 更昔洛韦药物选择

[0377] 由于在步骤2) 中建立的盒式载体下游的胸苷激酶的作用,更昔洛韦 (GCV) 在细胞中变得有毒,因此,当与GCV共培养时,细胞会死亡。利用这种机制,将如下所示最终浓度的GCV试剂用于选择细胞。在电穿孔2天后收获细胞后的第二天开始用药物进行选择,并用相同数量的细胞再接种。这是因为在iPS细胞的情况下,GCV的选择效率会根据细胞密度而显著变化。

[0378] 第0天:电穿孔

[0379] 第1天:培养基更换

[0380] 第2天:以 1×10^5 个细胞/孔再接种细胞

[0381] 第3-13天:GCV $5 \mu\text{g}/\text{ml}$

[0382] 第14天:收集iPSC集落

[0383] 3-3) 经盒式磁带交换的,缺失Puror Δ TK的iPS细胞(最终产品)

[0384] 收集在药物选择后存活的iPS细胞集落后,建立了两个克隆。从每个克隆收集DNA,并进行PCR以确认目的克隆。图24显示了使用夹住要去除的位点处的EF1 α 启动子位点和3'臂下游的引物进行PCR的结果。成功交换了盒的TCR-KI-iPS细胞无法确定Puror Δ TK的条带。(图24,底部,B泳道)

[0385] 实施例5

[0386] 通过将NY-ES01特异性TCR-KI-iPS细胞(最终产物)分化为T细胞而制备的再生CTL的细胞毒活性

[0387] 通过实施例4的方法获得敲入了NY-ES01特异性TCR的iPS细胞。将获得的iPS细胞分化为T细胞,并评估了所获得的再生CTL对癌细胞系的细胞毒活性。

[0388] 源自NY-ES01-TCR-KI-iPS细胞的再生CTL是通过实施例4的方法将NY-EOS1特异性

TCR敲入到细胞中而源自iPS细胞的CTL细胞。通过WO 2017/179720 (US20190161727) (该文献通过引用导入本文) 中描述的方法从NY-ES01-KI--iPS细胞诱导CTL。将iPS细胞诱导为T细胞前体,其是CD4CD8双阳性细胞,并分离出所述CD4CD8双阳性细胞。将分离的CD4CD8双阳性细胞进一步诱导成CD8单阳性细胞。结果,获得了CD8单阳性T细胞,其中CD8抗原是CD8 α 和CD8 β 链的杂合型(图25)。

[0389] 作为参考细胞,使用从WT1-TiPS细胞分化的再生CTL细胞。重排的CTL细胞T-iPS细胞分化而来,T-iPS细胞是从具有WT1特异性TCR的T细胞诱导的。基于WO 2016/010155 (US20170267972) 中描述的方法由具有抗原特异性TCR的T细胞诱导iPS细胞。以与上述相同的方式从具有抗原特异性TCR的iPS细胞诱导保持抗原特异性的CTL。

[0390] (2) 对针对A0201呈阳性并表达NY-ES01的多发性骨髓瘤细胞系U266的细胞毒活性评估

[0391] 使用引入了荧光素酶的U266(多发性骨髓瘤细胞系,NY-ES01+,HLA-A02+),Bright-Glo(Promega)和Glomax(Promega)。

[0392] 评估了从NY-ES01特异性TCR KI iPS细胞再生的CTL对多发性骨髓瘤细胞系U266的细胞毒活性。作为比较,同时检查了从WT1-TiPS细胞再生的CTL对同一细胞系的细胞毒活性。将再生的CTL和U266细胞以0:1、1:3、1:1、3:1、9:1的比例混合,然后在37°C和5%CO₂的环境中培养6小时。培养后,基于膜联蛋白V阳性细胞的比例评价细胞毒活性。结果显示在图26中。源自NY-ES01-TCR-KI-iPS细胞的再生CTL以细胞数依赖性方式表现出针对U266细胞的细胞毒活性。由WT1-TiPS细胞再生的CTL几乎没有细胞毒活性。

[0393] 实施例6

[0394] T细胞中外源引入的T细胞受体(TCR)基因与另一个TCR基因的交换

[0395] 通过与实施例1相同的方法(图11),将耐药基因盒敲入载体敲入Jurkat细胞的TCR β 2区域,然后将TCR 1基因与耐药基因盒进行交换,得到引入了耐药基因的Jurkat细胞。作为TCR 1基因,使用了合成基因,其中识别WT1抗原的TCR(KM#3-3)的 α 和 β 链通过p2A肽基因连接的。图27示出了该实施例的Jurkat-TCR 1细胞的TCR β 基因座DJ区的示意图。

[0396] 然后,通过以下所示的方法将Jurkat-TCR 1细胞中的TCR 1基因替换为TCR 2基因。TCR 2基因是合成基因,其中识别NYES01抗原的TCR的 α 和 β 链通过p2A肽基因连接。

[0397] 将TCR 2盒式交换载体和Cre重组酶表达载体共同引入Jurkat-TCR 1细胞,并通过PCR确认Jurkat细胞中TCR 1与TCR 2的交换

[0398] 材料

[0399] [表11]

	Jurkat-TCR 1 细胞	2 x 10 ⁶ 个细胞
细胞		
载体	1. TCR 2 盒交换载体	1 μ g
	2. Cre 重组酶表达载体(pCAG-nls-Cre)	4 μ g
试剂	Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V	100 μ L

[0401] 图28提供了其中整合了TCR 1的TCR β 基因座DJ区(上部),TCR 2盒式交换载体(中

间)和盒式交换后的TCRB基因座(下部)的示意图。为了诱导盒式交换,通过电穿孔将TCR 2盒式交换载体和Cre重组酶表达载体(pCAG-nls-Cre)引入Jurkat-TCR 1细胞。随着Cre重组酶和盒式交换载体的引入,在Cre重组酶的作用下,预期夹在lox2272和loxP之间的部分,即TCR 1-frt-PGK启动子,被TCR 2基因-frt-PGK启动子替换(盒式交换,图28)。

[0402] 转染5天后从细胞中提取基因组DNA,并通过PCR进行分析,以查看是否发生了TCR1与TCR 2的交换(图29)。另外,作为PCR反应的对照实验,将通过与耐药基因的盒式交换引入了NYES01-TCR(TCR 2)或KM#3-3-TCR(TCR 1)的Jurkat细胞的基因组DNA用于PCR反应。(图29B,PCR 1和PCR 2)。引物1对应于TCR 2,引物2和引物3对应于DJ区,而引物4对应于TCR 1(图29A)。使用KOD-FX(Toyobo,KFX-101)在以下条件下进行30至35个循环来进行PCR:94℃,2分钟→98℃,10秒,61℃,30秒,68℃,3min。PCR中使用的引物如下所示。

[0403] 使用引物1和引物2进行PCR,然后使用引物1和引物3将反应产物的10倍稀释液进行PCR。如果发生了TCR 1与TCR 2的交换反应,则预期大约4kb的DNA片段将被扩增。电泳的结果是观察到了显示从TCR 1到TCR 2的交换的条带(图3B,PCR3)。另一方面,当使用引物4和引物2进行PCR时,可预期TCR1基因的扩增。在PCR2中观察到了TCR1基因的扩增,在PCR3中也观察到(图3B)。根据PCR3的结果,认为在某些细胞中发生了从TCR 1到TCR 2的交换,而在其他细胞中则没有。

[0404] 由以上可知,可以将外源引入T细胞系Jurkat细胞的TCR基因与其他TCR基因交换。

[0405] PCR引物:

[0406] 引物1,5'-GGCAGC T ACATCCCTACCTT-3'(SEQ ID NO:47)

[0407] 引物2,5'-CCACTTTGCTGTCTTGGCCTT-3'(SEQ ID NO:48)

[0408] 引物3,5'-AATCATCGTGCCCTCCCGCTA-3'(SEQ ID NO:49)

[0409] 引物4,5'-TCAGCCACCTACCTCTGTGT-3'(SEQ ID NO:50)

序列表

	<110> 国立大学法人京都大学 国立大学法人滋贺医科大学	
	<120> 制备引入外源抗原受体的细胞的方法	
	<130> 675044	
	<150> JP2018-140523	
	<151> 2018-07-26	
	<160> 51	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> Cre重组酶靶序列lox2272	
	<400> 1	
	ataacttcgt ataaagtatc ctatacgaag ttat	34
[0001]	<210> 2	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> Cre重组酶靶序列loxP	
	<400> 2	
	ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat	34
	<210> 3	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 3	
	gcggtggcgg ccgctataac ttcgtataaa gtatcctata cgaagttatt accgggtagg	60
	ggaggcgctt	70
	<210> 4	
	<211> 41	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 4	
	ggggatccac tagttctaga cgaaaggccc ggagatgagg a	41
	<210> 5	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 5	
	ctccgggect ttcgtgccac catgaaaaag cctgaactca cc	42
	<210> 6	
	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0002]	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 6	
	ataacttctg ataatgtatg ctatacgaag ttatcaacta tgaacatta tcata	55
	<210> 7	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 7	
	attatacga gttatccacc gagtacaagc ccacggtg	38
	<210> 8	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 8	
	ggggatccac tagttgaagt tcctatactt tctaga	36

	<210> 9	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 9	
	ctccaccgcg gtggcggccg cttcaaaag ctccttctgt tgt	43
	<210> 10	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 10	
	atgatgcggc cgctagcctt ggaaaagaca aaggcagt	38
	<210> 11	
	<211> 43	
	<212> DNA	
[0003]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 11	
	aggaattcga tatcatttaa atgaggggga ctagcaggga gga	43
	<210> 12	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 12	
	tcgacggtat cgatatttaa atccccgaaa gtcaggacgt tg	42
	<210> 13	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 13	

	gctagcggcc gcatcatgag accatctgta cctg	34
	<210> 14	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 14	
	atacgaagtt atagctagtc ttccgtgatg gcctcacacc a	41
	<210> 15	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> Crispr/Cas9的序列	
	<400> 15	
	caccgaggtt agtctgactg tgtg	24
[0004]	<210> 16	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> Crispr/Cas9的序列	
	<400> 16	
	aaaccacaca gtcagactaa cctc	24
	<210> 17	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> Crispr/Cas9的序列	
	<400> 17	
	caccctgceg ctgcccagtg gttg	24
	<210> 18	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	

	<223> Crispr/Cas9的序列	
	<400> 18 aaaccaacca ctgggcagcg gcag	24
	<210> 19 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220> <223> Crispr/Cas9的序列	
	<400> 19 caccgagaat caaaatcggg gaat	24
	<210> 20 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220> <223> Sequence for Crispr/Cas9	
	<400> 20 aaacattcac cgattttgat tctc	24
[0005]	<210> 21 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220> <223> 引物	
	<400> 21 ccttgatccat cactggcatc	20
	<210> 22 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220> <223> 引物	
	<400> 22 aaagtcagat ttgttgctcc a	21
	<210> 23 <211> 45 <212> DNA	

	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 23	
	aaggaaccaa ttcagtcgac caccatgctg ctgcttctgc tgctt	45
	<210> 24	
	<211> 75	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 24	
	ctctccacg tctccagcct gcttcagcag gctgaagtta gtagctccgc ttccgctct	60
	ggaatccttt ctctt	75
	<210> 25	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0006]	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 25	
	tggagacgtg gaggagaacc ctggacctat gatgatatcc ttgagagtt	49
	<210> 26	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 26	
	tcgagtgcgg ccgcaattc tcagctggac cacagccgca g	41
	<210> 27	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 27	
	tatacgaagt tategctage ggtttgccgc cagaacacag	40

	<210> 28	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 28	
	tacaaacttg tgatgctagc gtagttttca cgacacctga	40
	<210> 29	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 29	
	tatacgaagt tategctagc gccccgctc tgactgaccg	40
	<210> 30	
	<211> 40	
	<212> DNA	
[0007]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 30	
	tacaaacttg tgatgctagc gacagcacia taaccagcac	40
	<210> 31	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> Sequence for Crispr/Cas9	
	<400> 31	
	caccctgccg ctgccagtg gttg	24
	<210> 32	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> Crispr/Cas9的序列	

	<400> 32 aaaccaacca ctgggcagcg gcag	24
	<210> 33 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220> <223> 引物	
	<400> 33 acggctgaaa tctccctaac cc	22
	<210> 34 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220> <223> 引物	
	<400> 34 tacttcatt tgtcacgtcc tg	22
[0008]	<210> 35 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220> <223> 引物	
	<400> 35 cctgctgcaa cttacctcc	19
	<210> 36 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220> <223> 引物	
	<400> 36 ggggaccgag gggctggaag	20
	<210> 37 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence)	

	<220>		
	<223>	Sequence for Crispr/Cas9n	
	<400>	37	
		caccggtaga aggaggetta tacc	24
	<210>	38	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	Crispr/Cas9n的序列	
	<400>	38	
		aaacggtata agcctccttc tacc	24
	<210>	39	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	Crispr/Cas9n的序列	
[0009]	<400>	39	
		caccgggtgg gcatgtgcgt gtgt	24
	<210>	40	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	Crispr/Cas9n的序列	
	<400>	40	
		aaacacacac gcacatgecc accc	24
	<210>	41	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	Crispr/Cas9n的序列	
	<400>	41	
		caccgcaaac acagegacct cgggt	25
	<210>	42	

	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> Crispr/Cas9n的序列	
	<400> 42	
	aaacacccga ggtcgctgtg ttgc	25
	<210> 43	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> Crispr/Cas9n的序列	
	<400> 43	
	caccagagat ctccacacc caaa	24
	<210> 44	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0010]	<220>	
	<223> Crispr/Cas9n的序列	
	<400> 44	
	aaactttggg tgtgggagat ctct	24
	<210> 45	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 45	
	gtcatgggca aagattacca c	21
	<210> 46	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 46	
	ggtagctggg ctcacctaata c	21

	<210> 47	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 47	
	ggcagctaca tccctacctt	20
	<210> 48	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 48	
	ccactttgct gtcttggcct t	21
	<210> 49	
	<211> 21	
	<212> DNA	
[0011]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 49	
	aatcatcgtg ccctcccgt a	21
	<210> 50	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 50	
	tcagccacct acctctgtgt	20
	<210> 51	
	<211> 65	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>	
	<223> 克隆#10的Vbeta20-1和Cbeta2区	
	<400> 51	
[0012]	atgctgctgc ttctgctgct tctggggcca ggtataagcc tccttcgggt gggcctggcc	60
	acagg	65

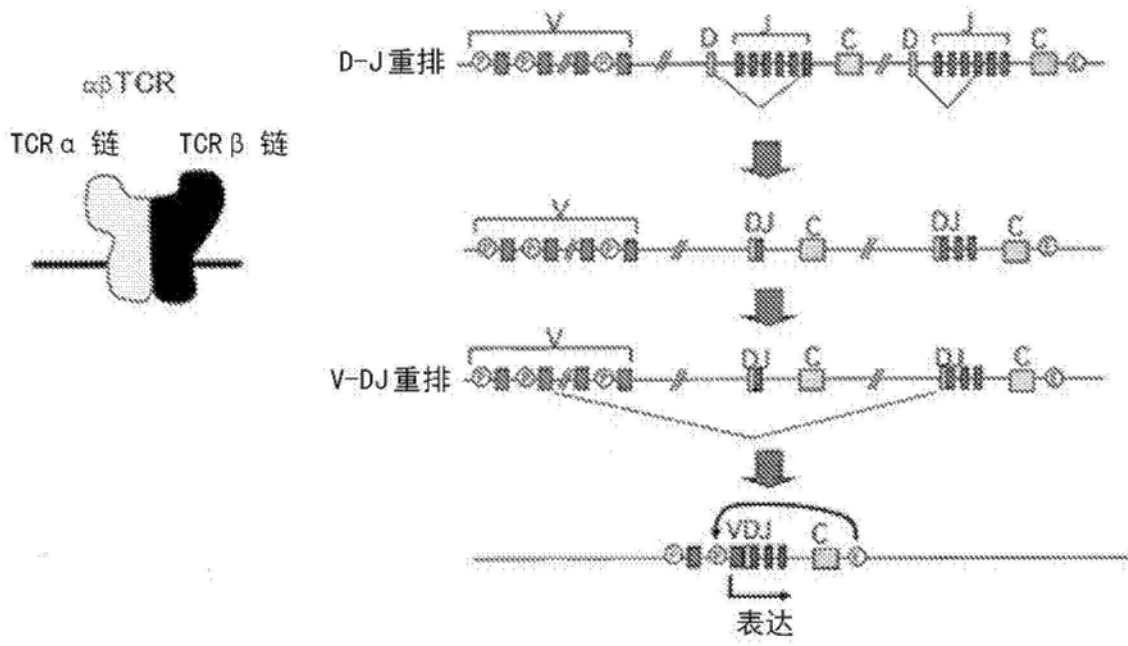
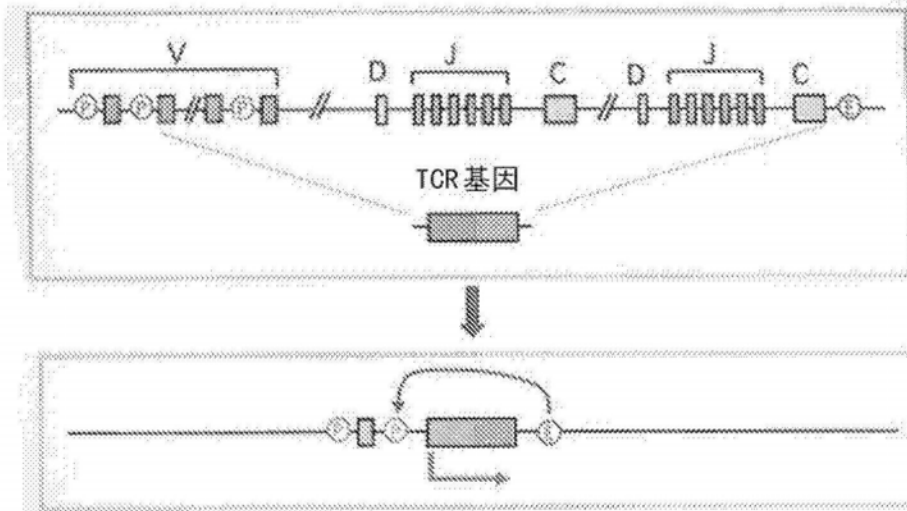
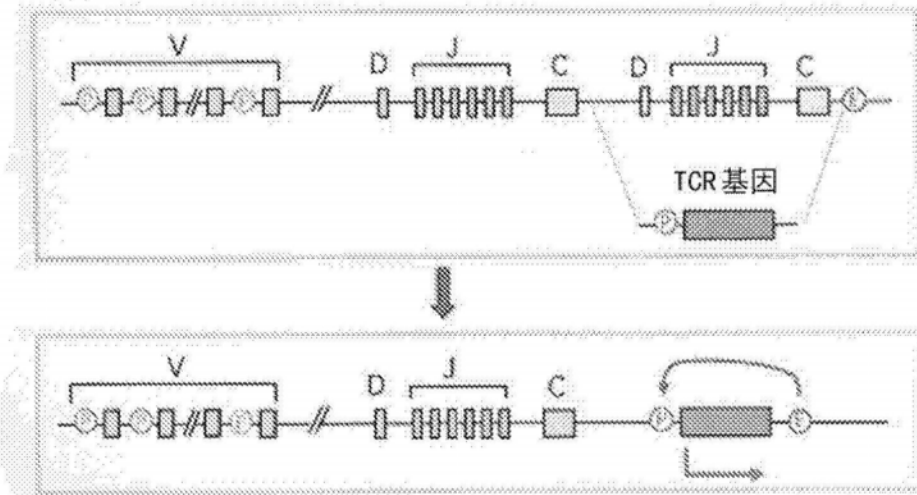


图1

(图 2-1)



(图 2-2)



(图 2-3)

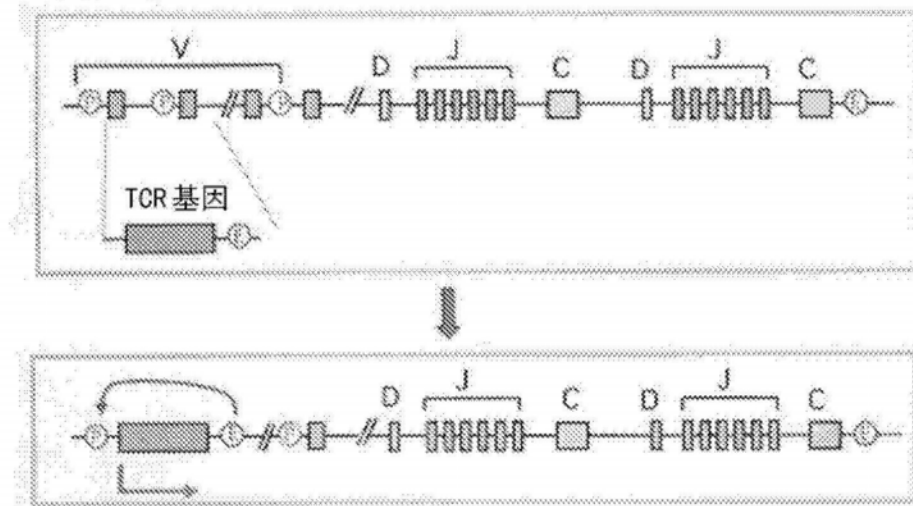


图2

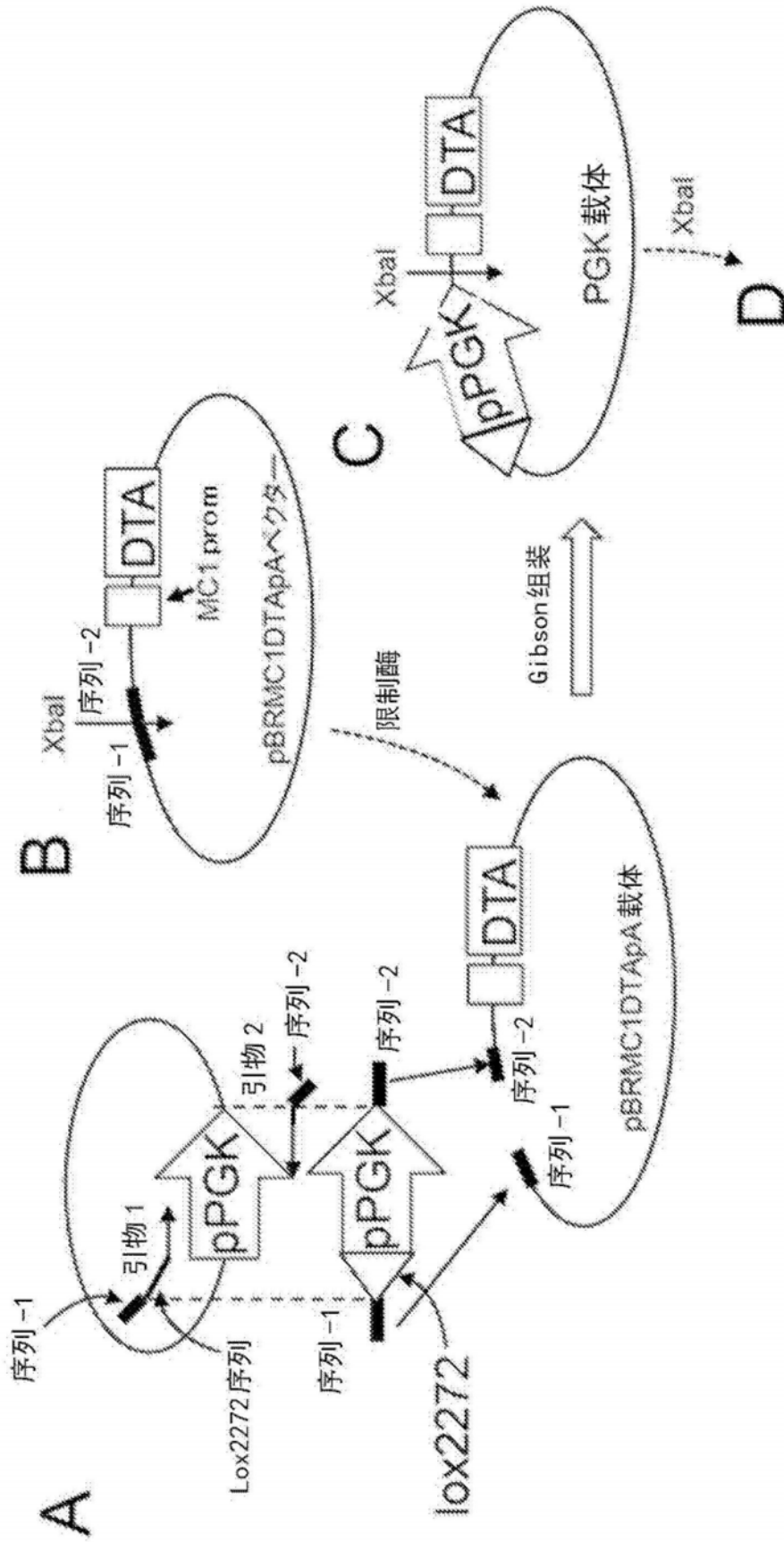


图3-1

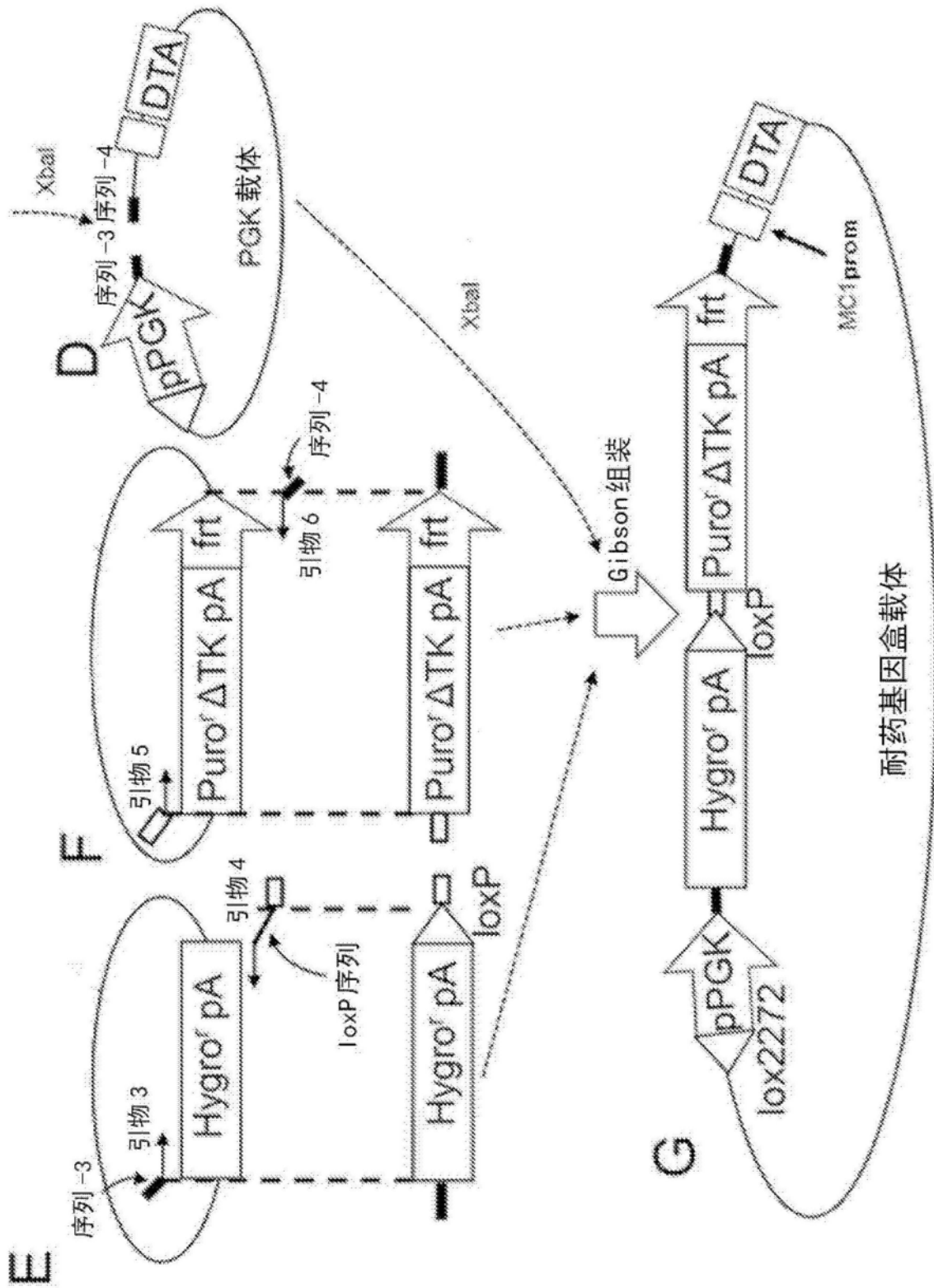


图3-2

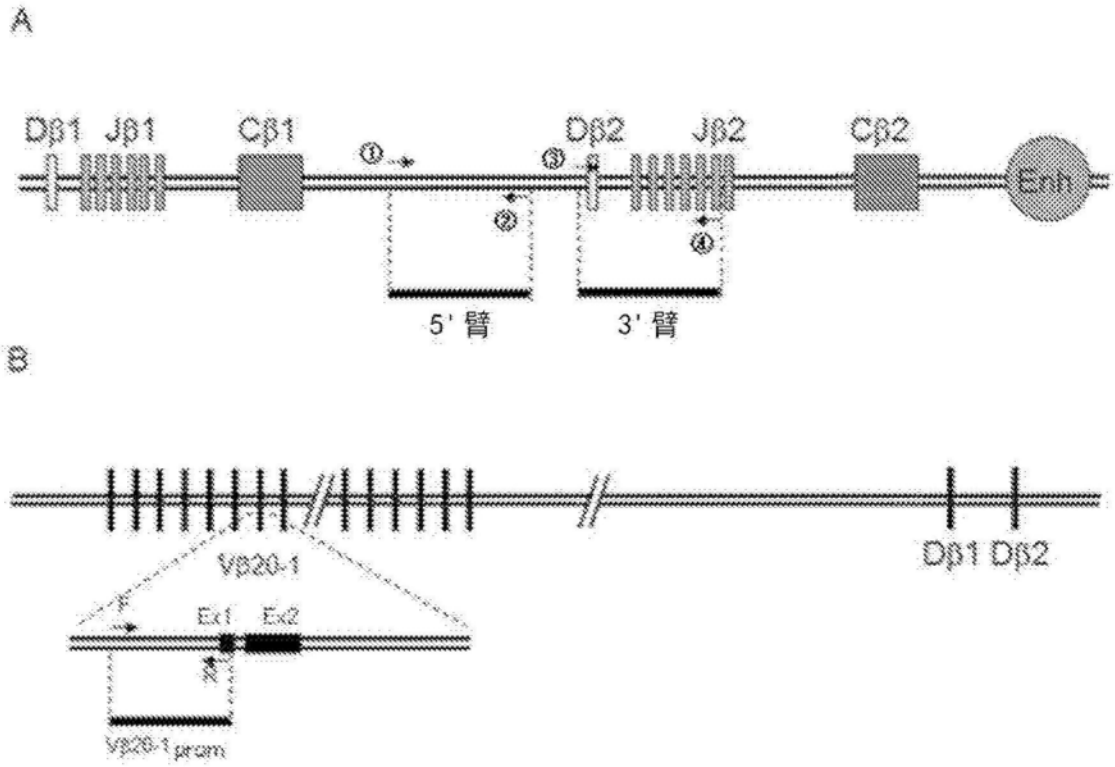


图4

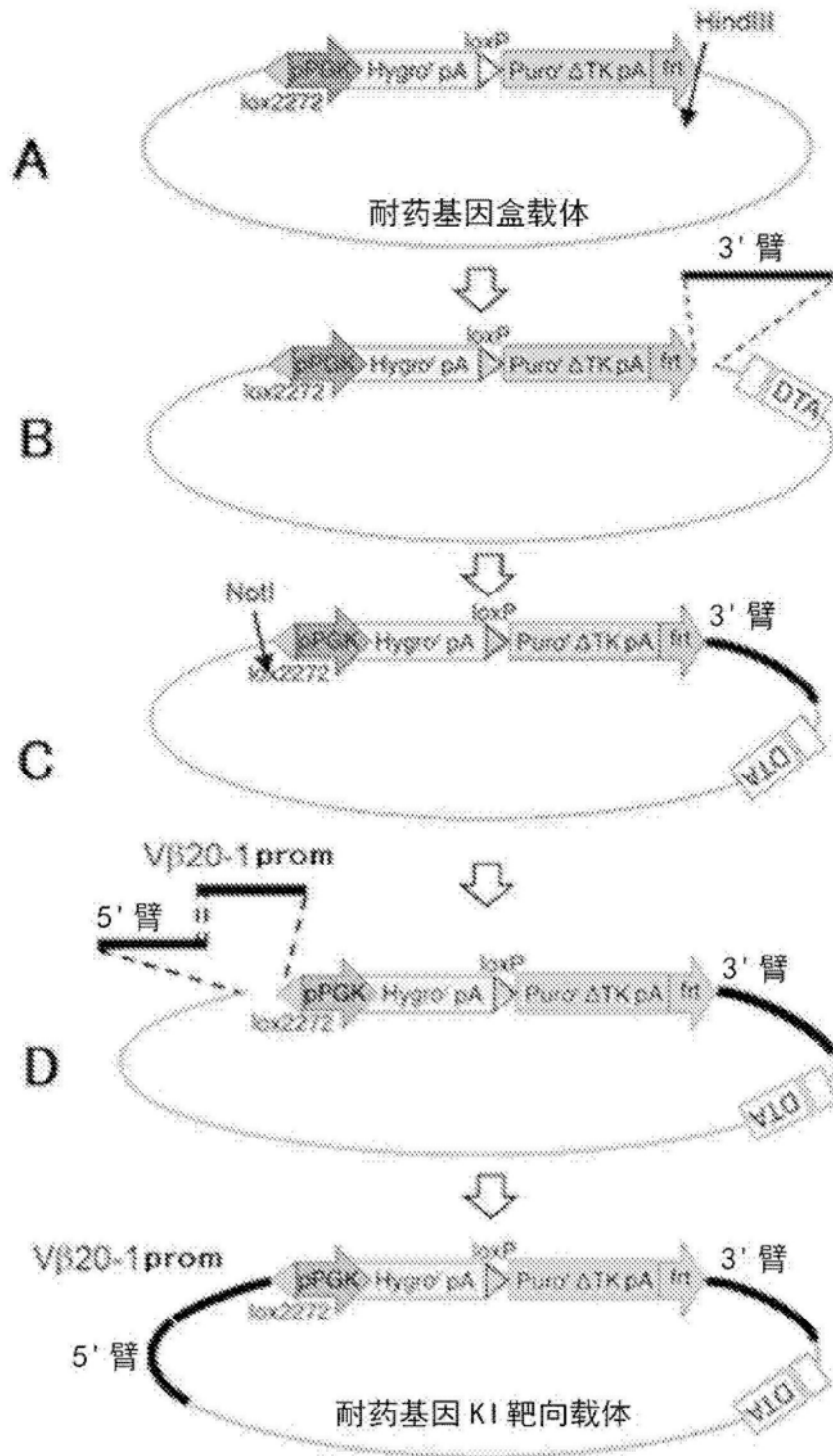


图5

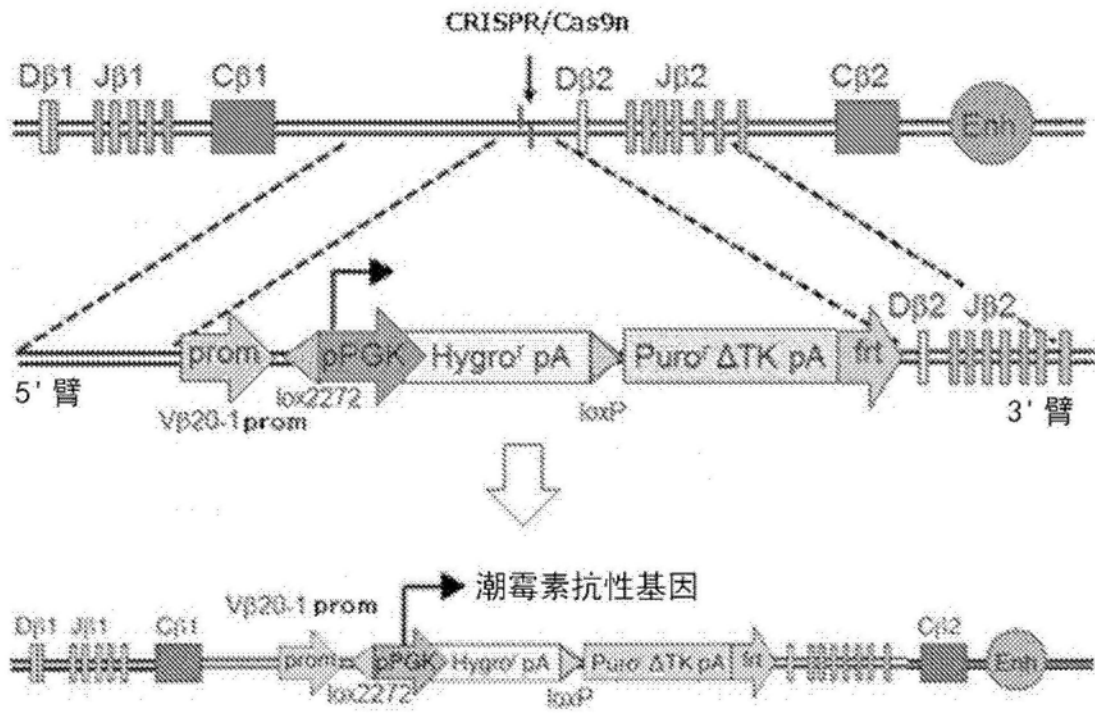


图6

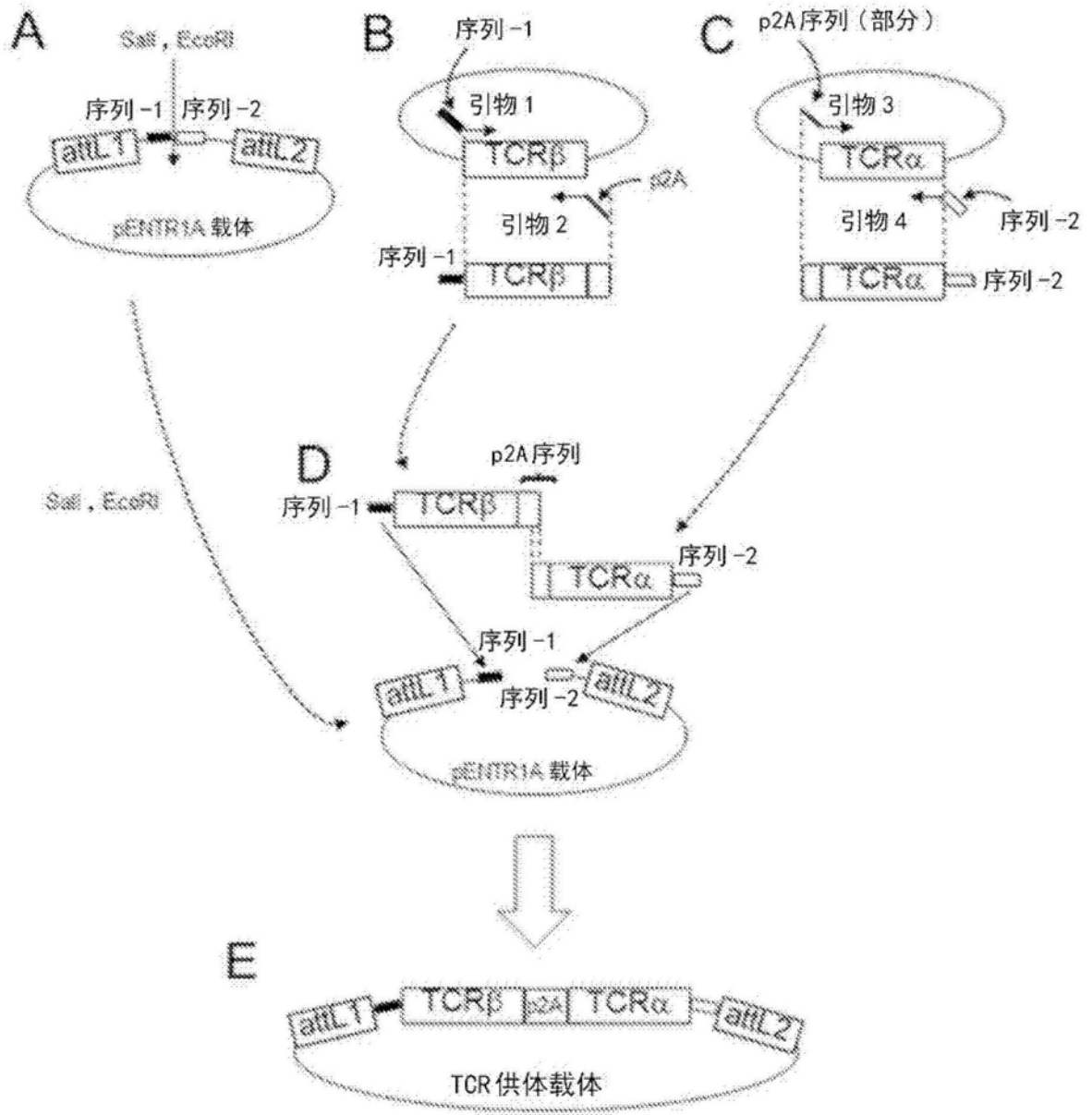


图7

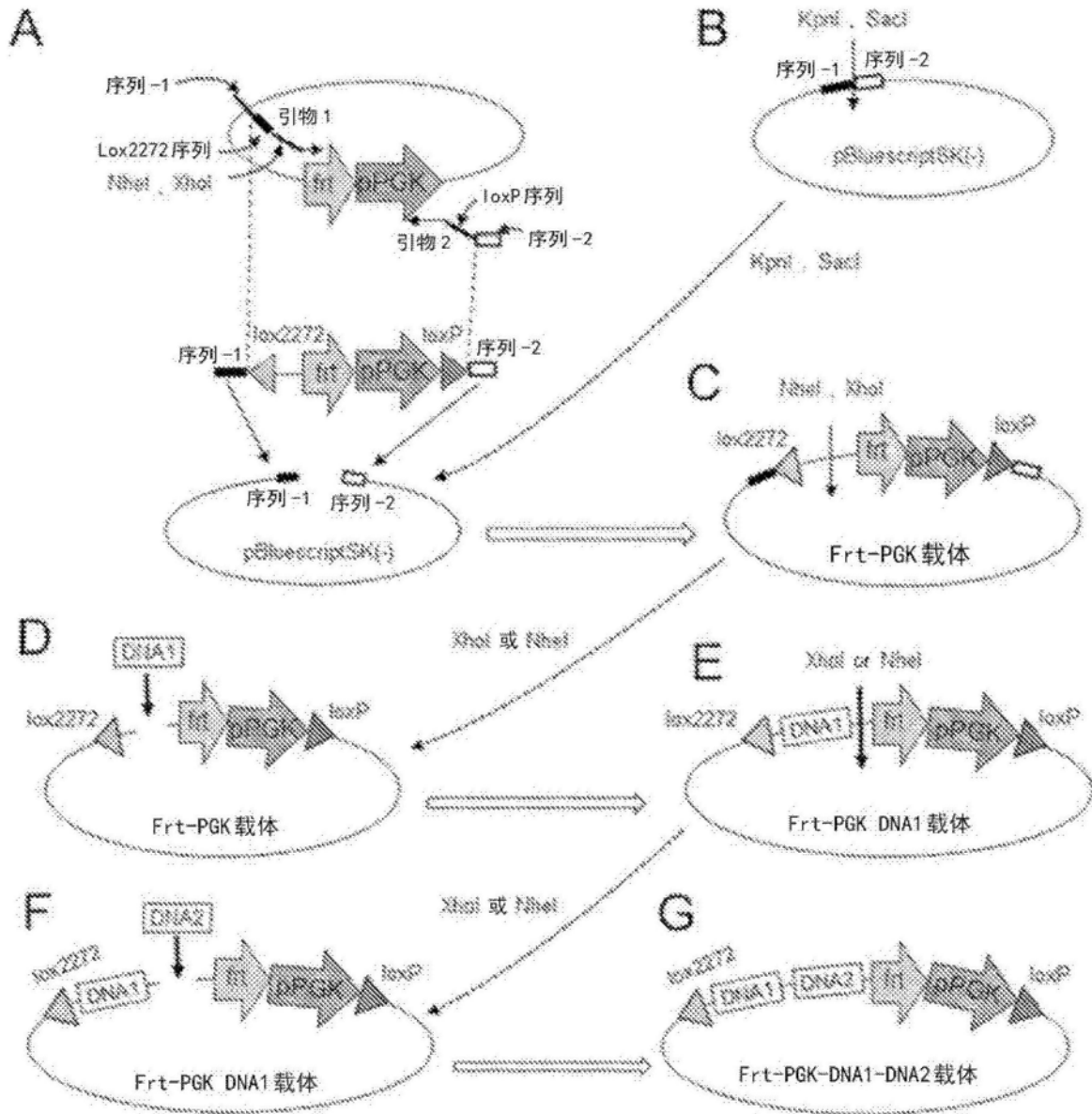


图8

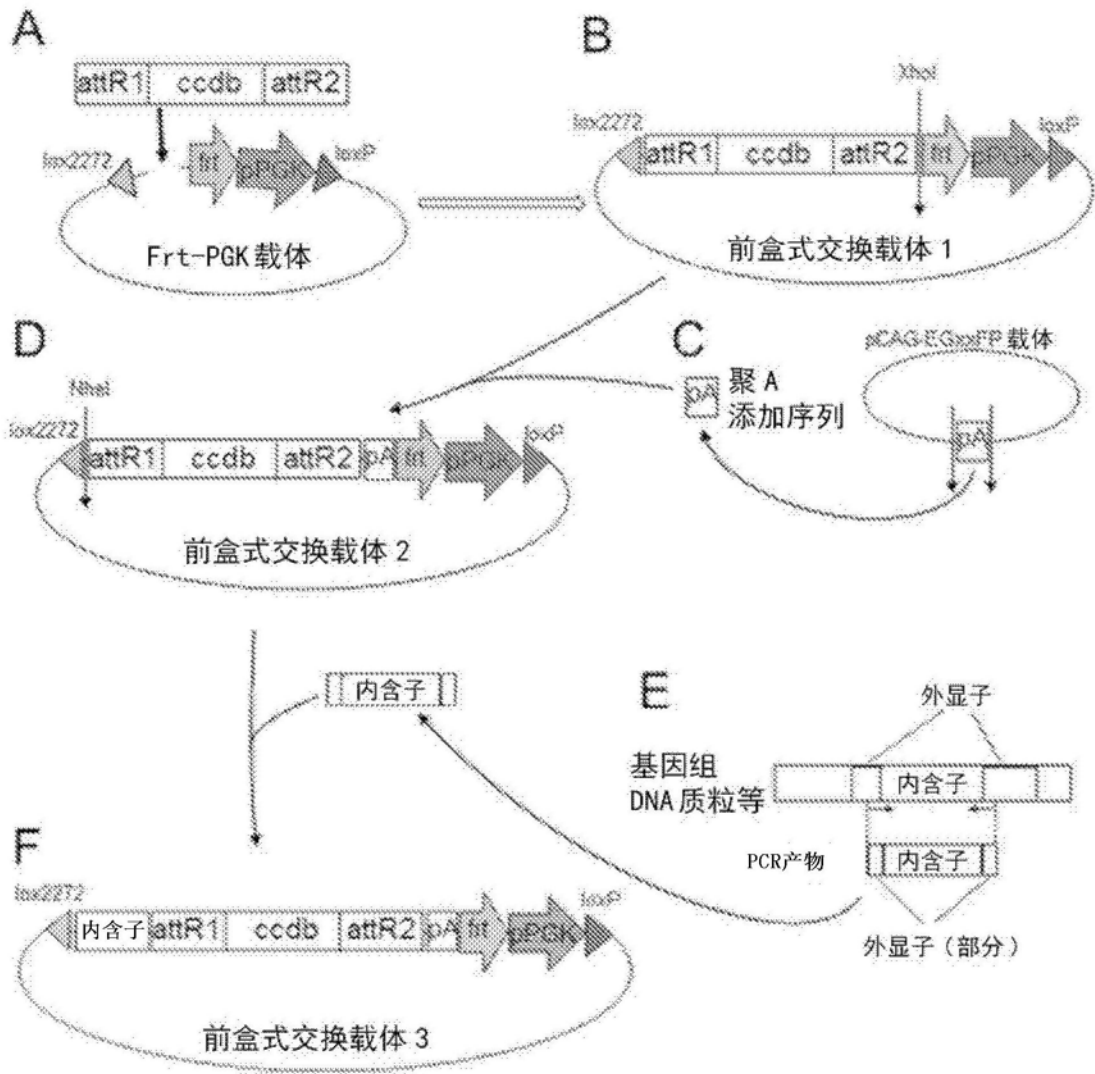
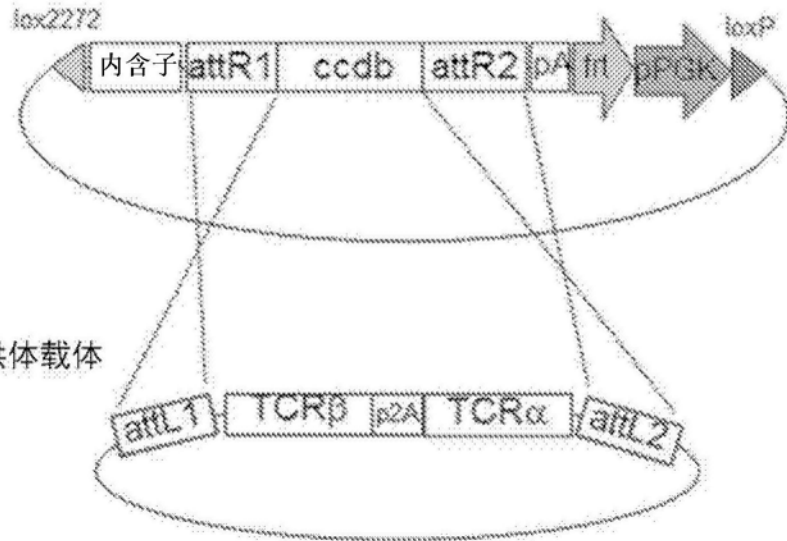
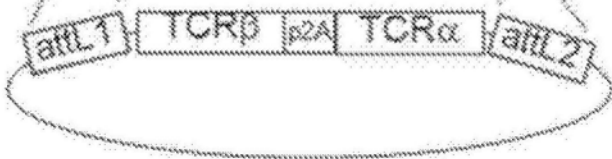


图9

前盒式交换载体 3



TCR 供体载体



TCR 盒式交换载体

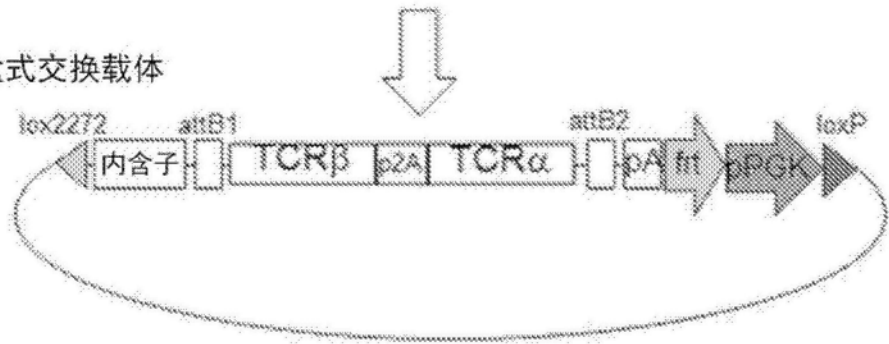


图10

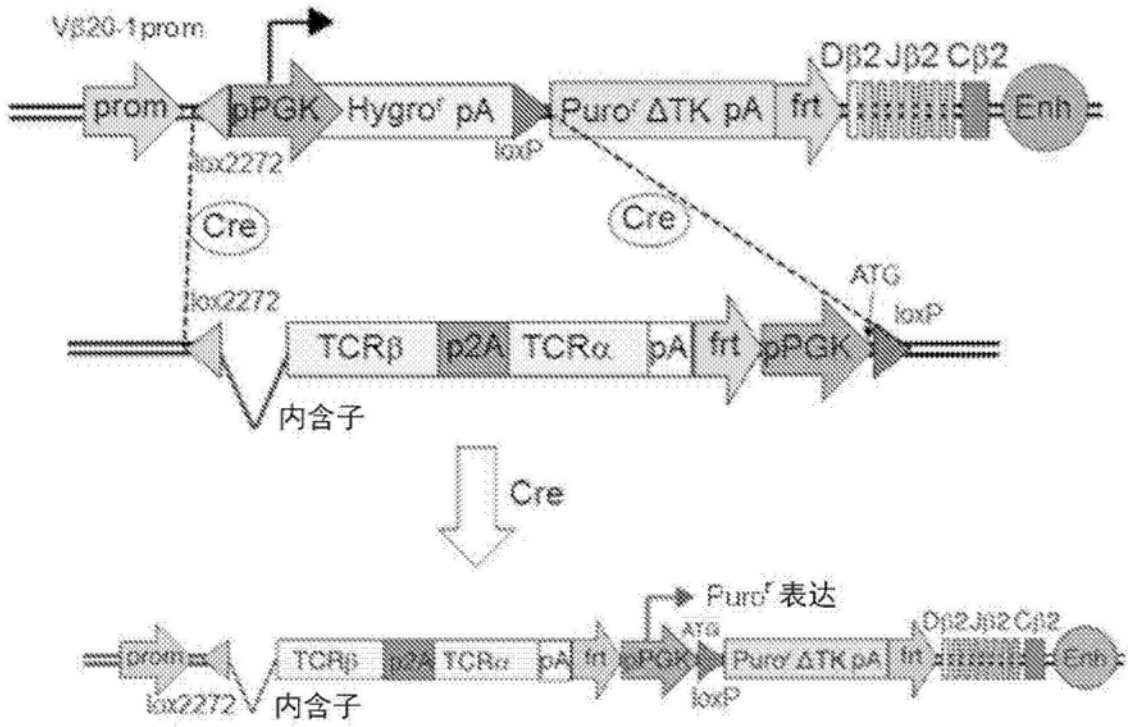


图11

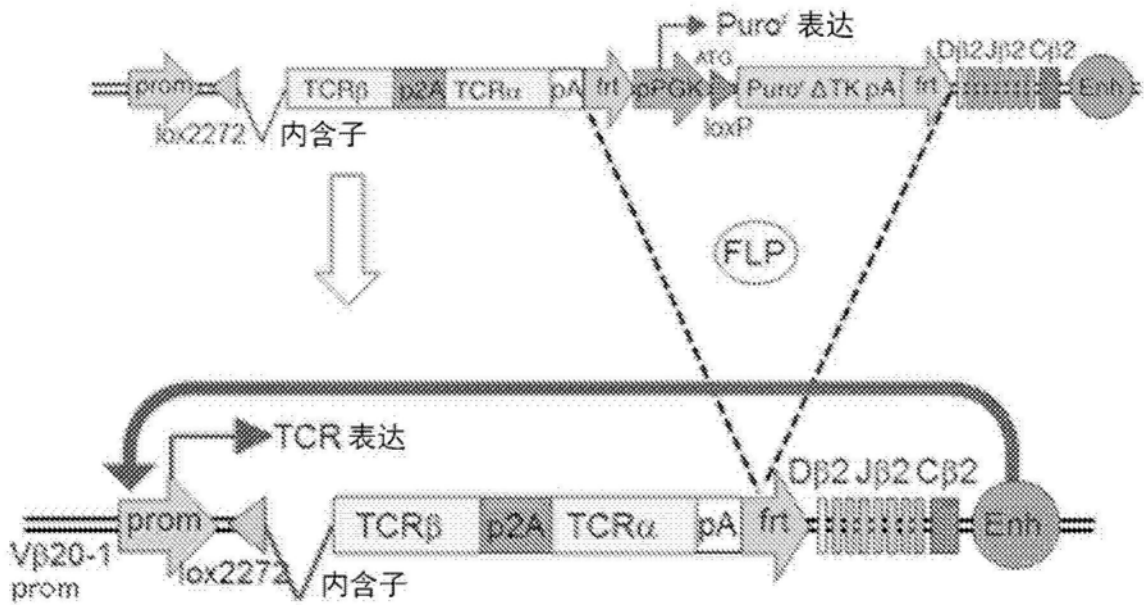


图12

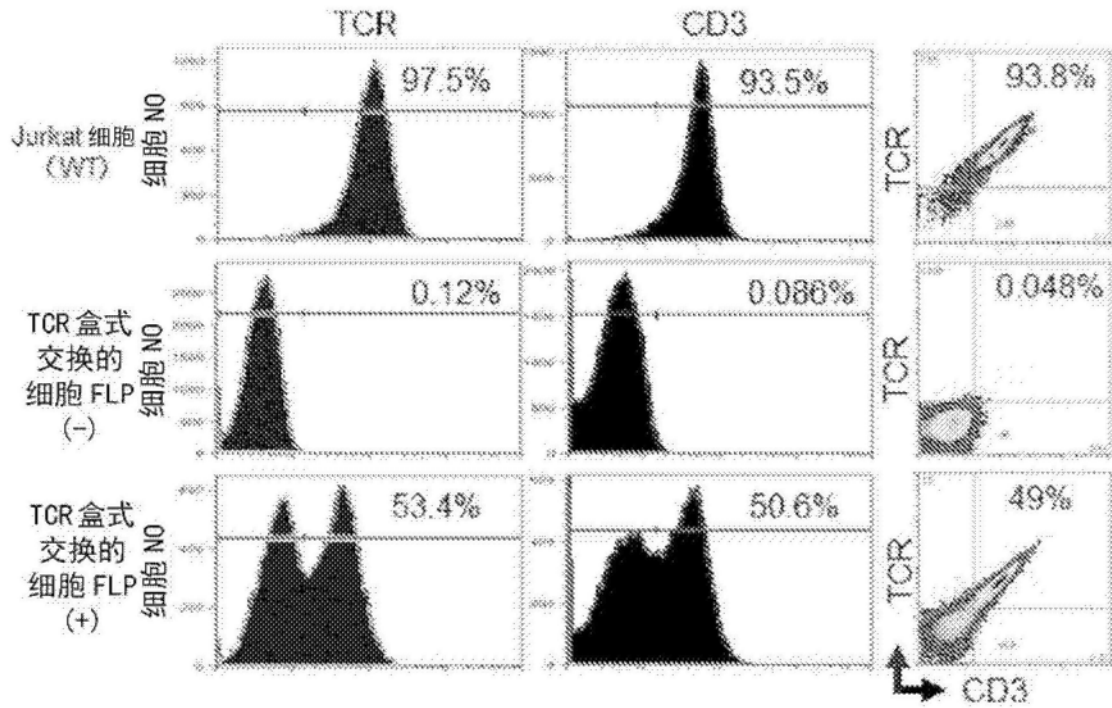


图13

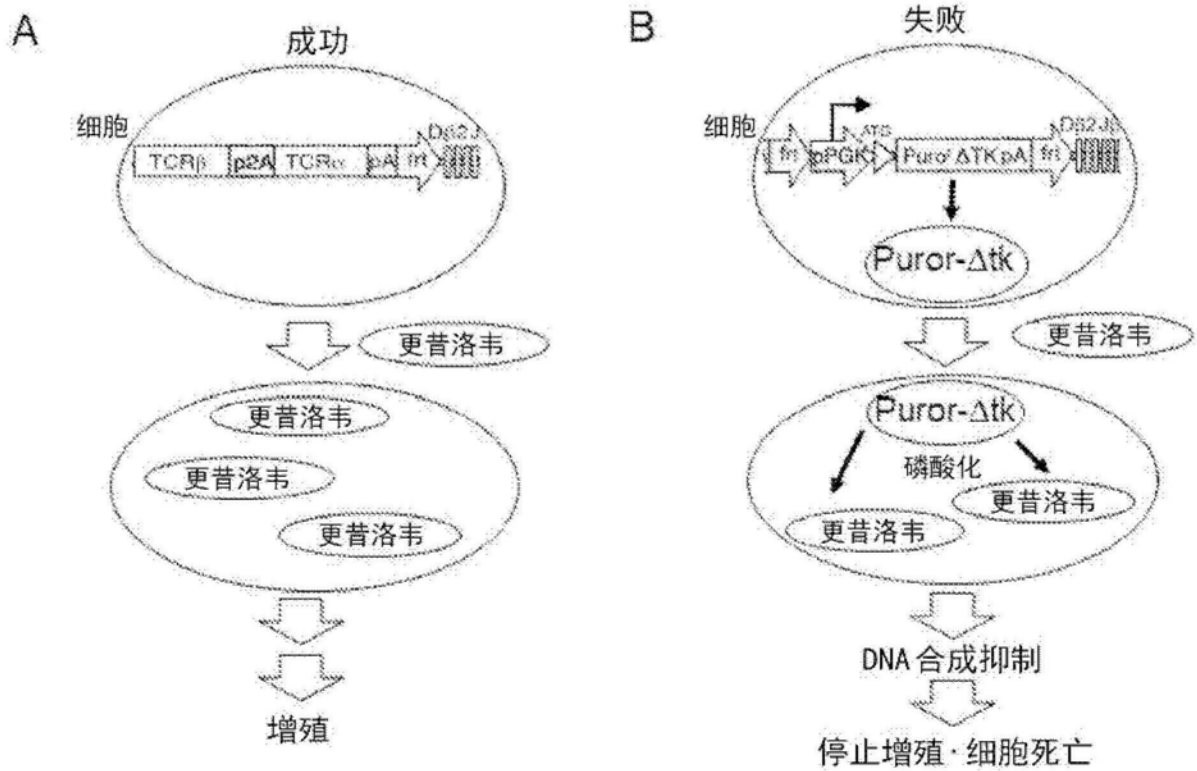


图14

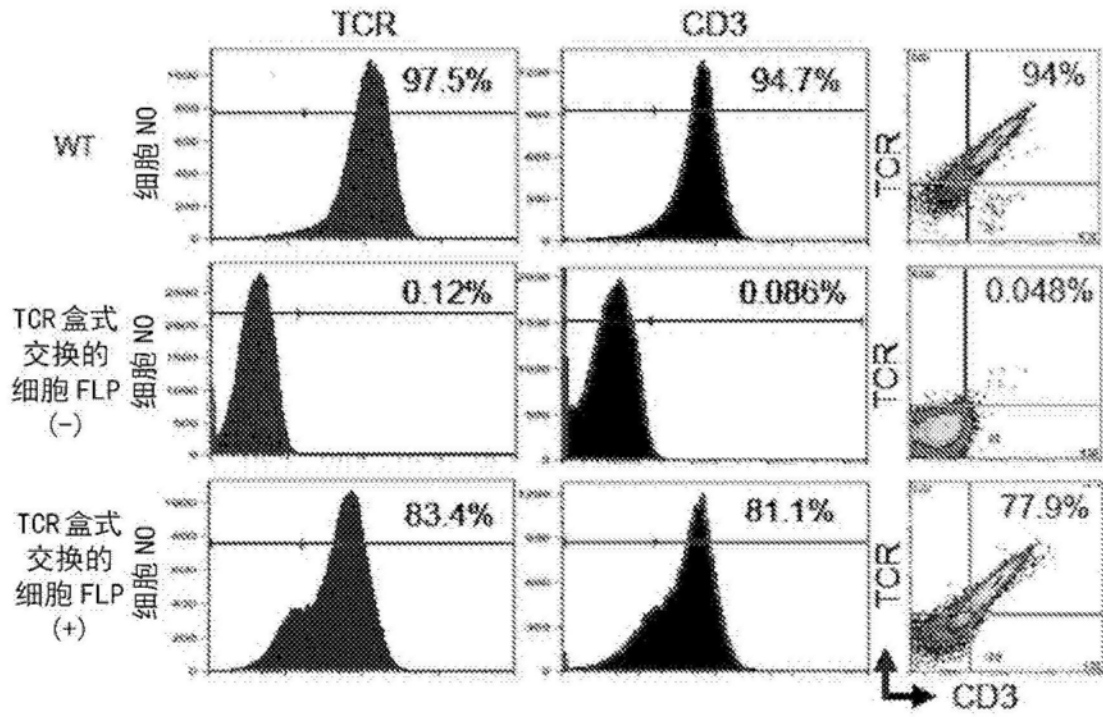


图15

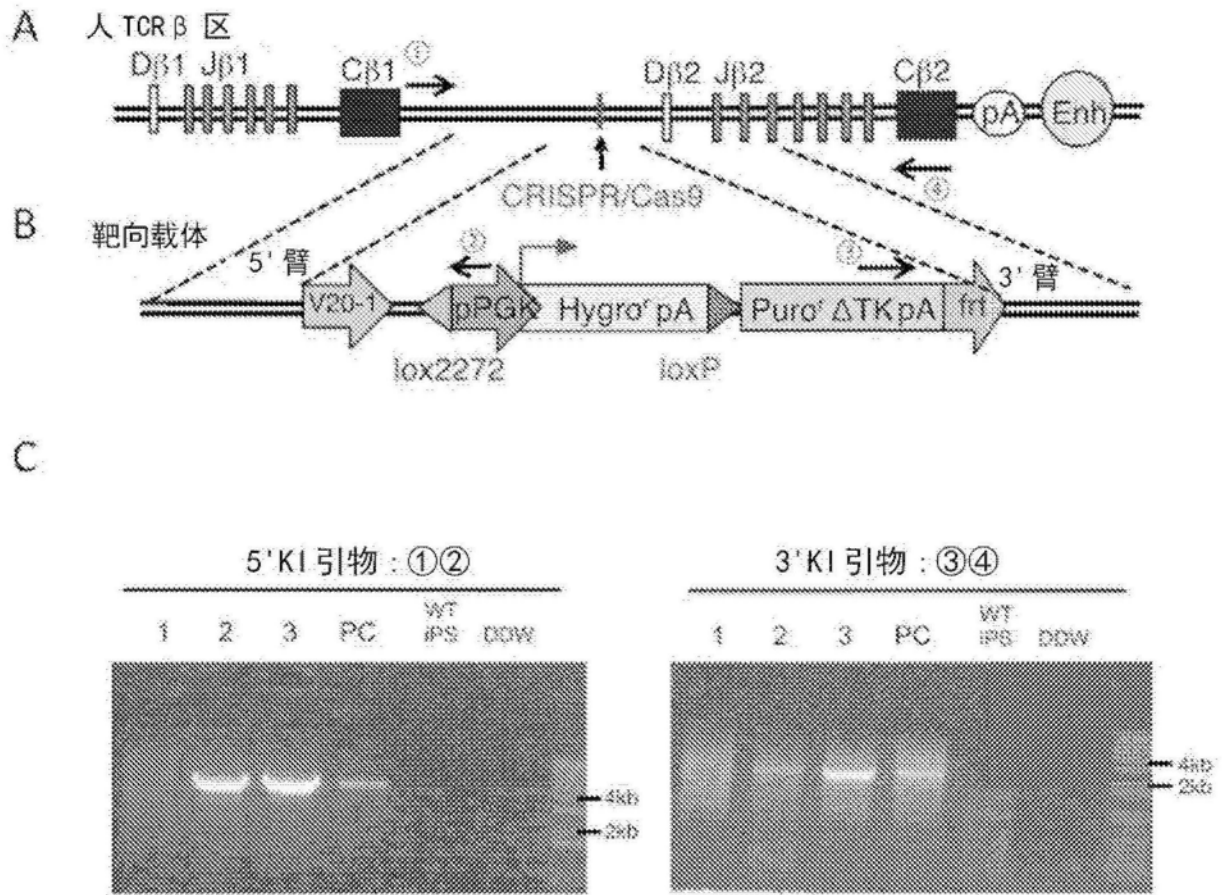


图16

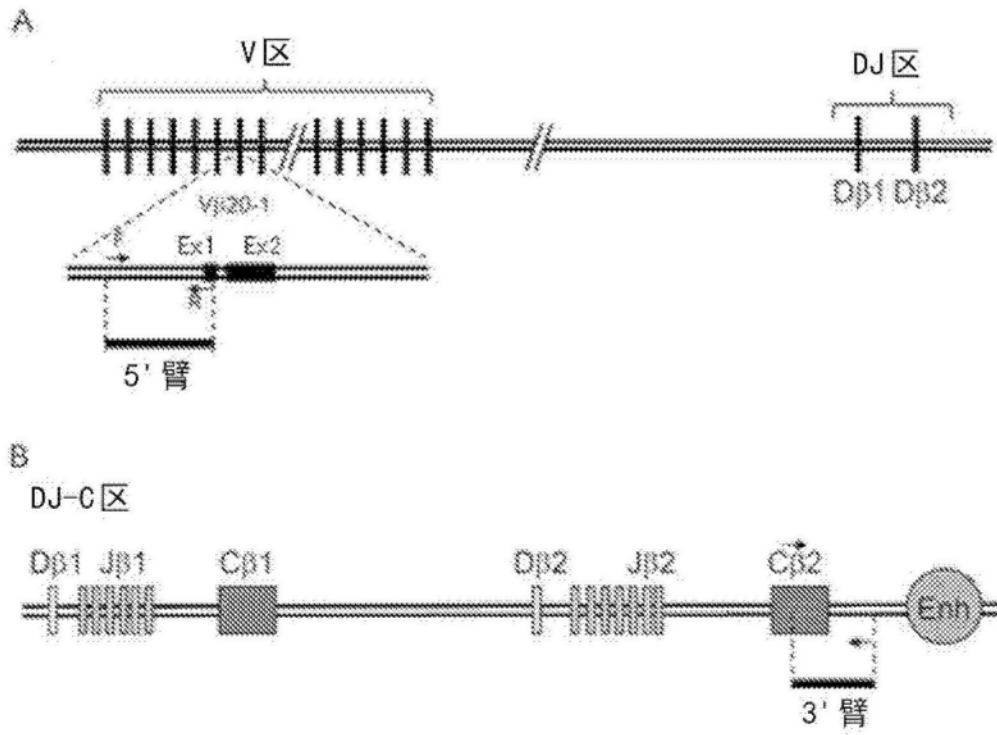


图17

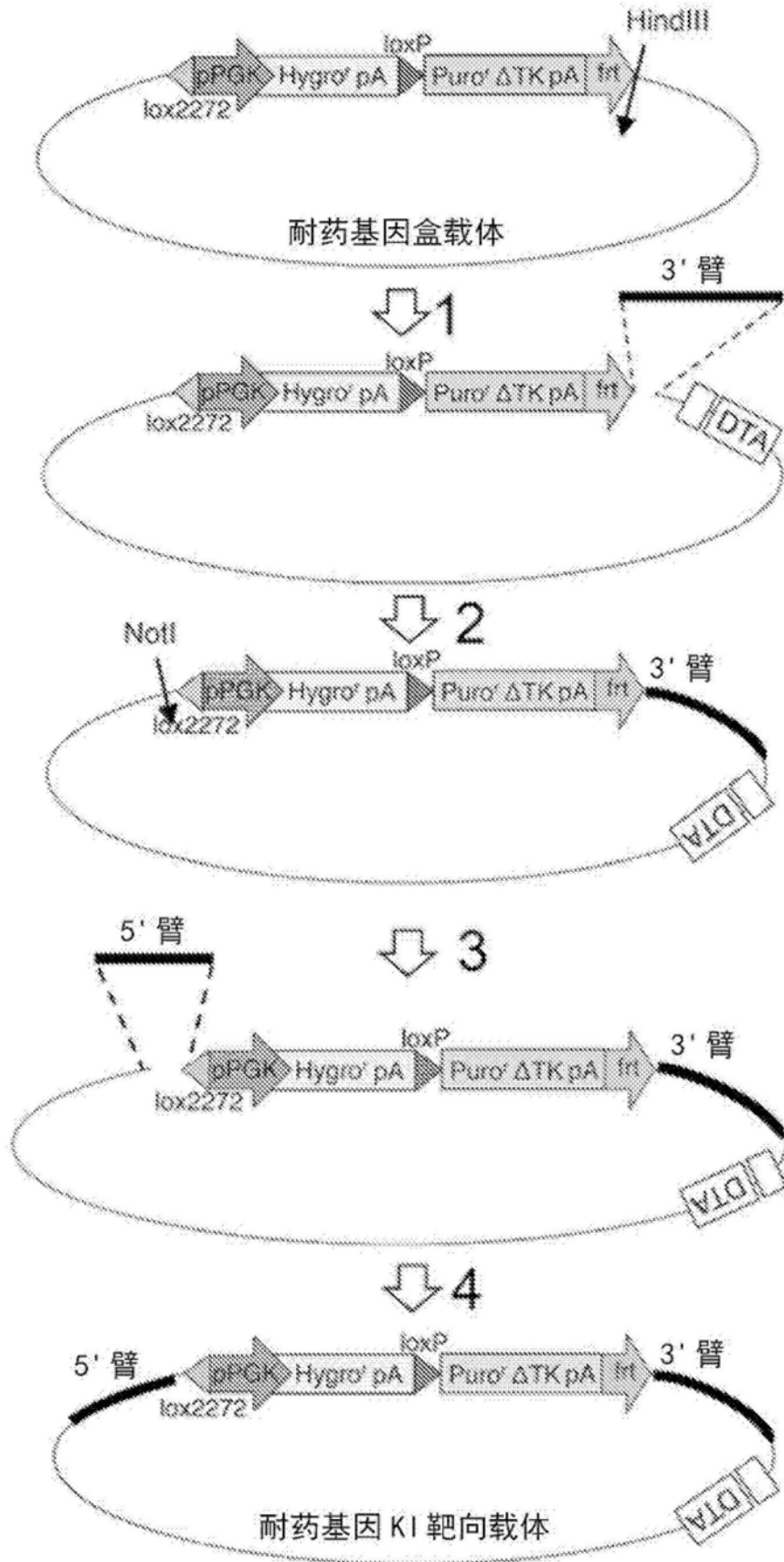


图18

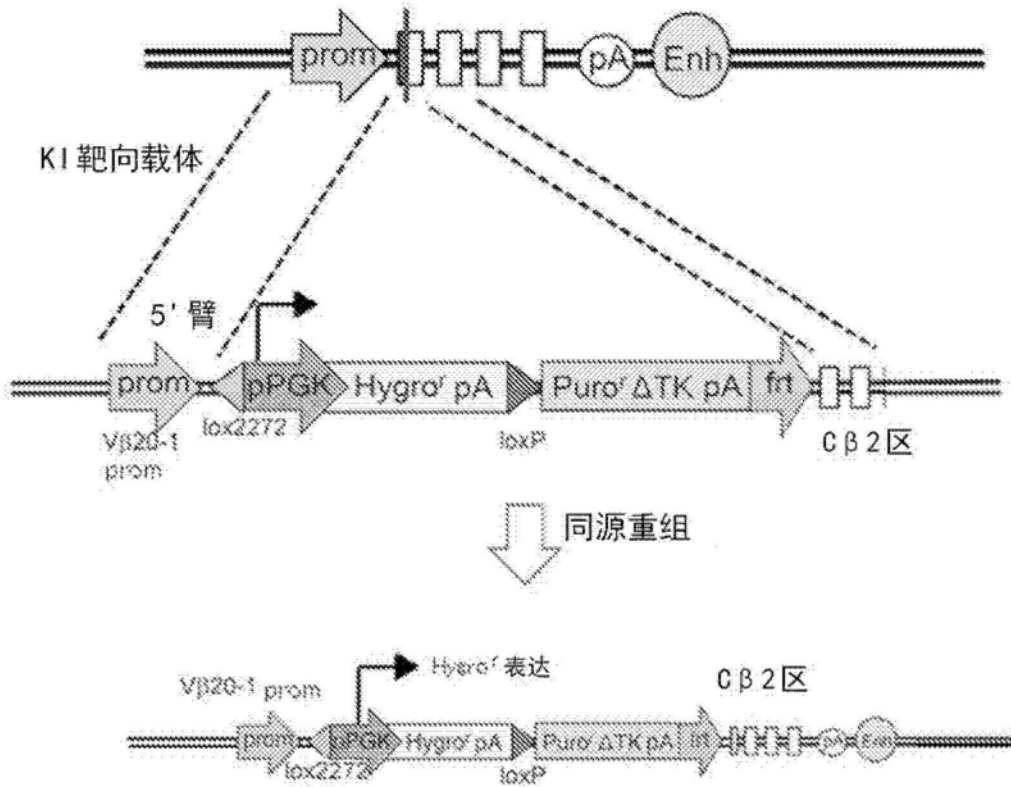


图19

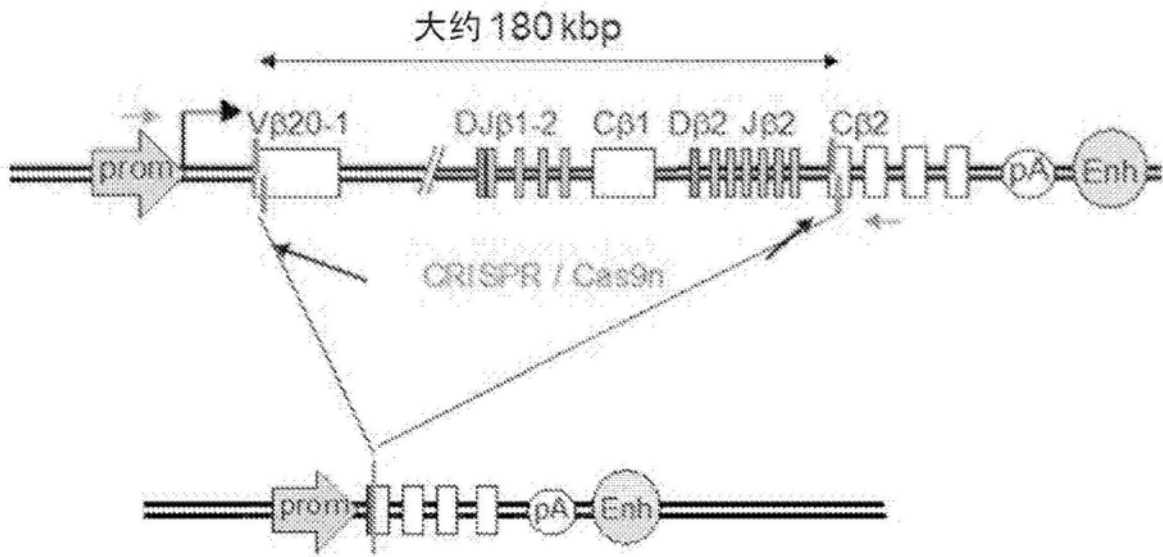


图20

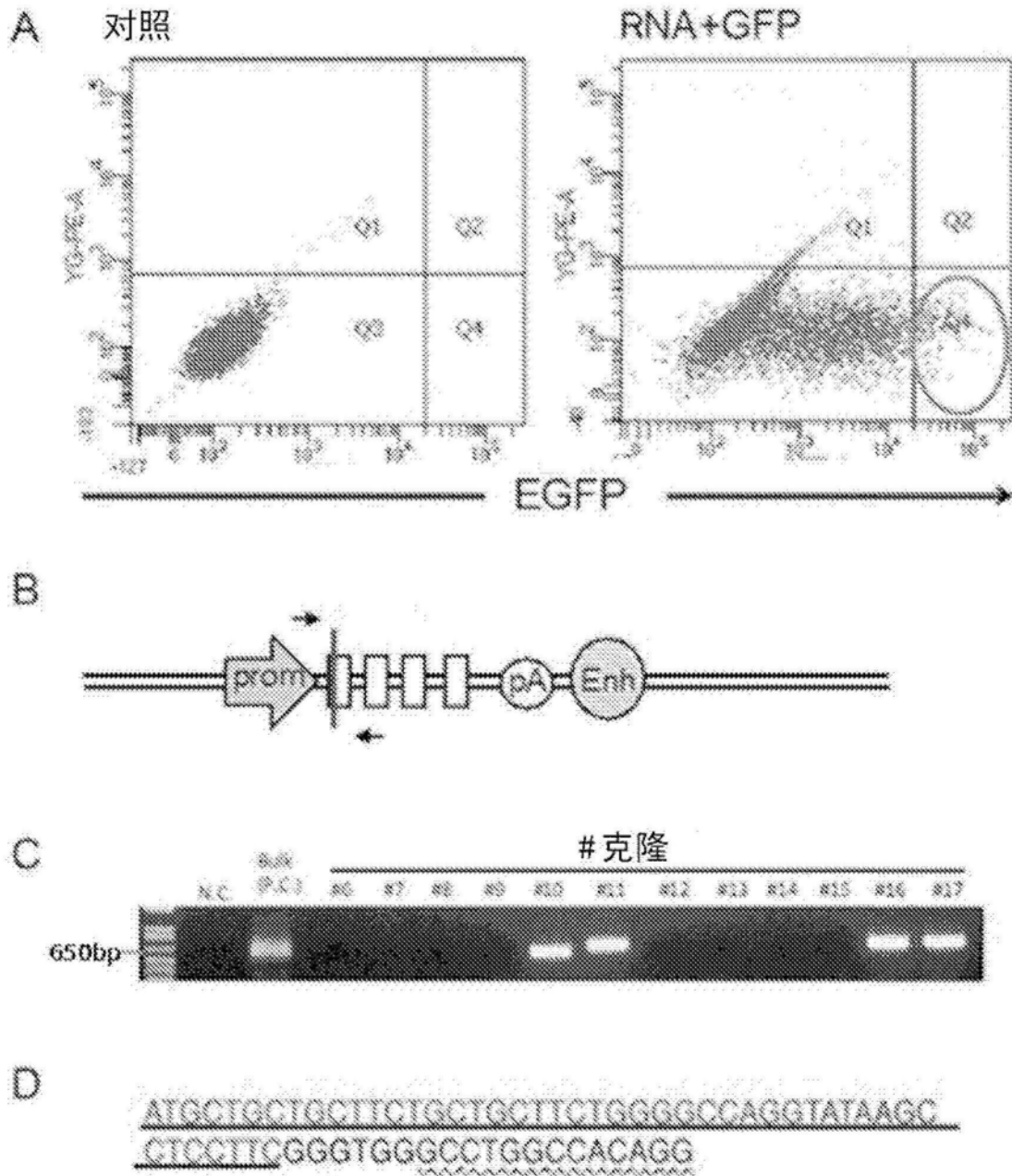


图21

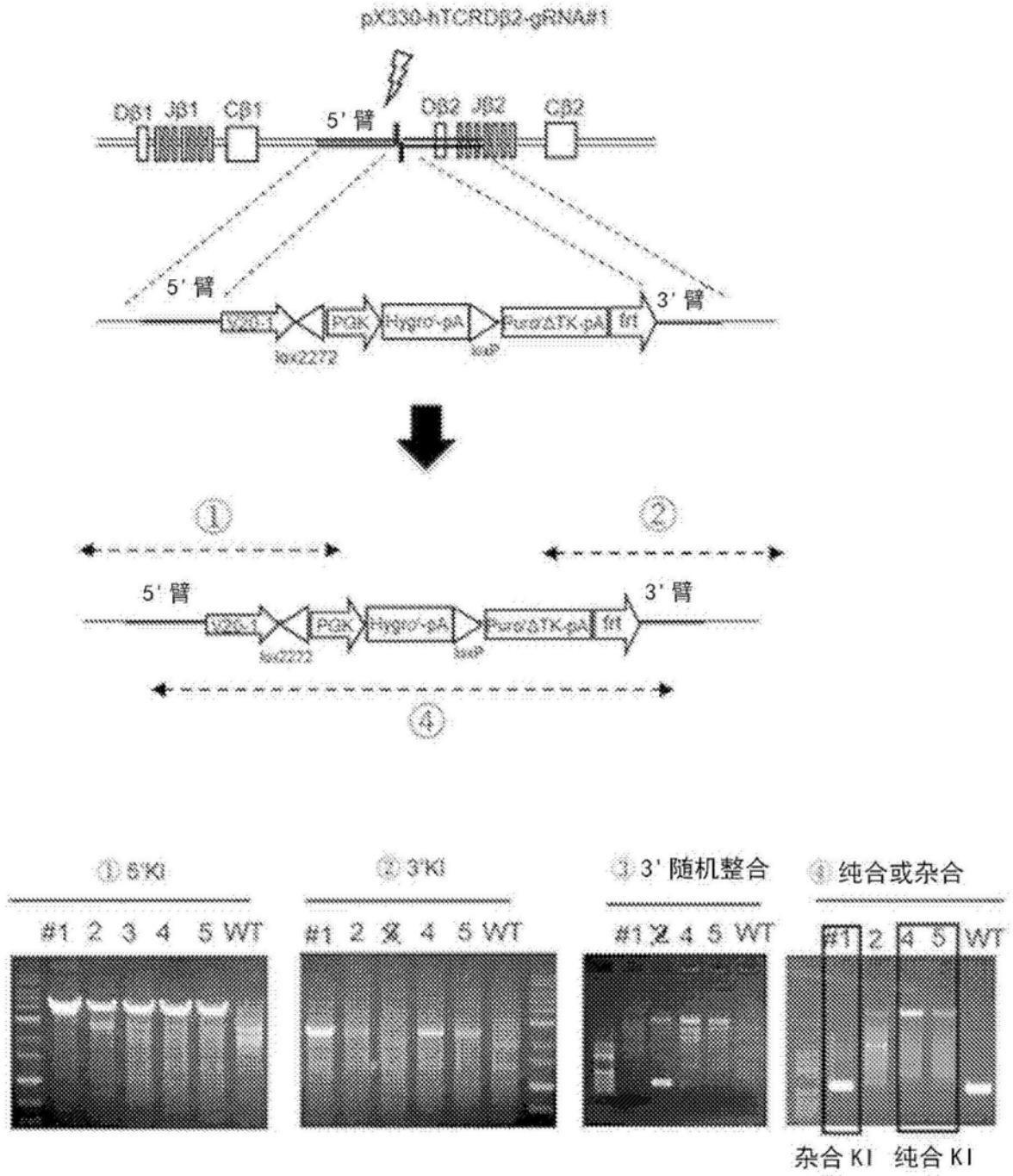


图22

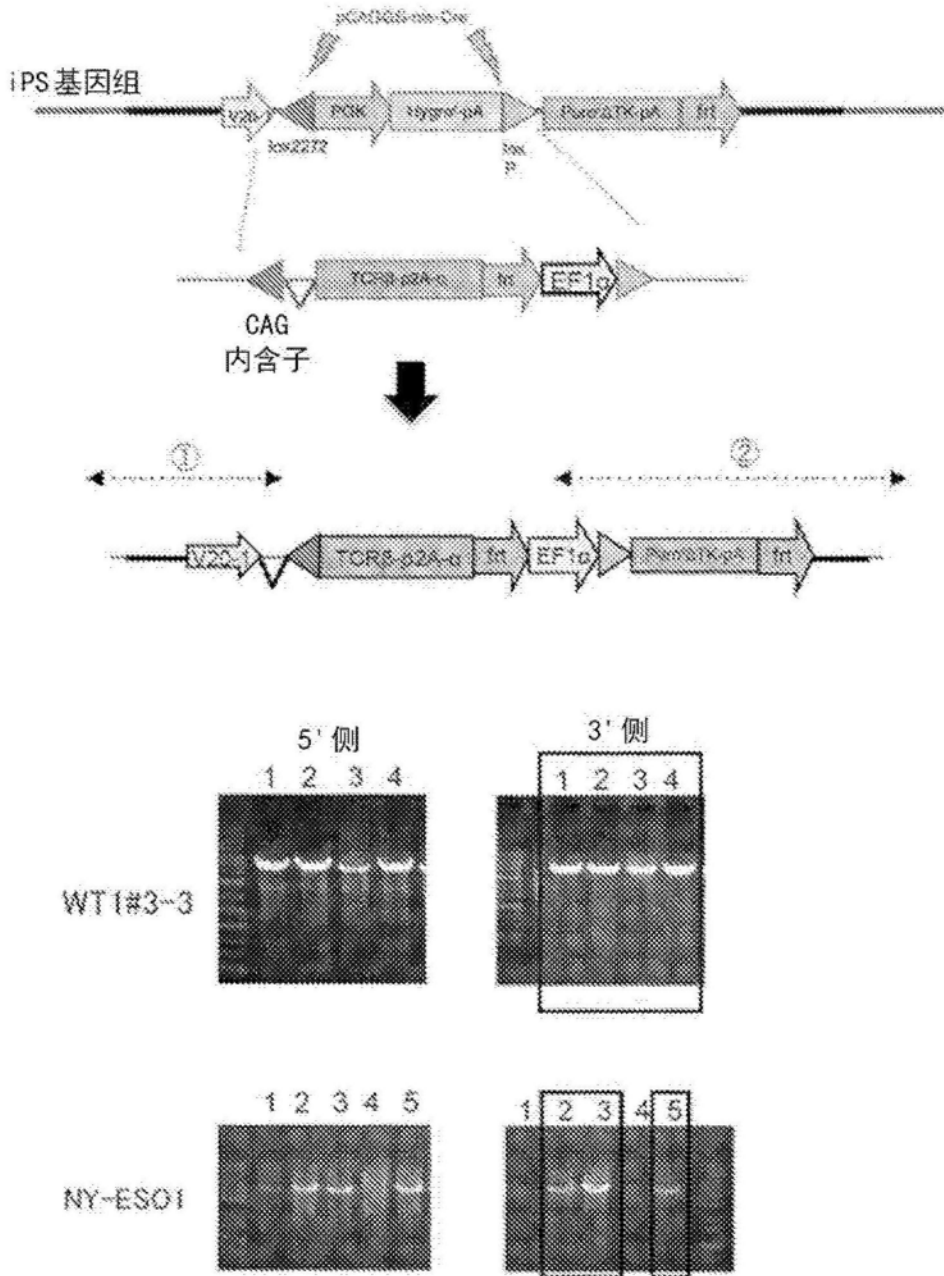


图23

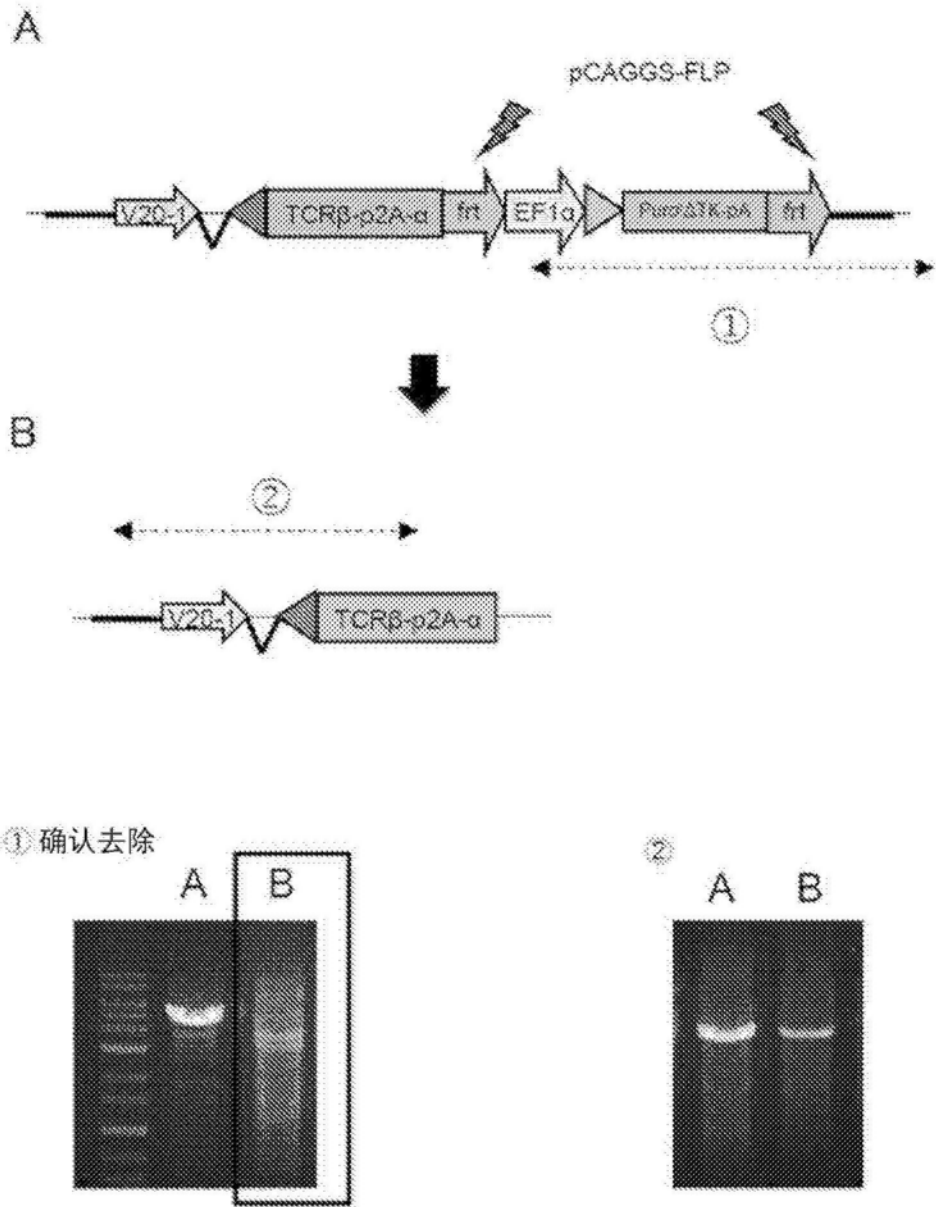


图24

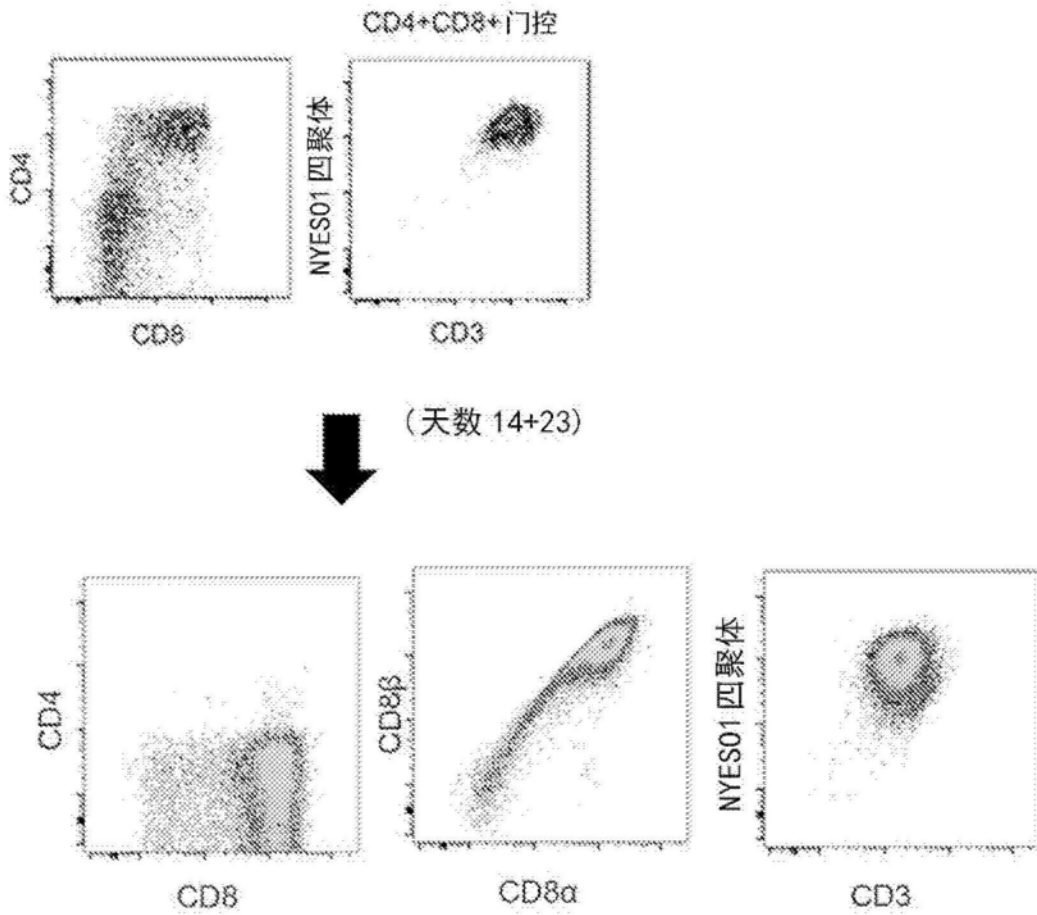


图25

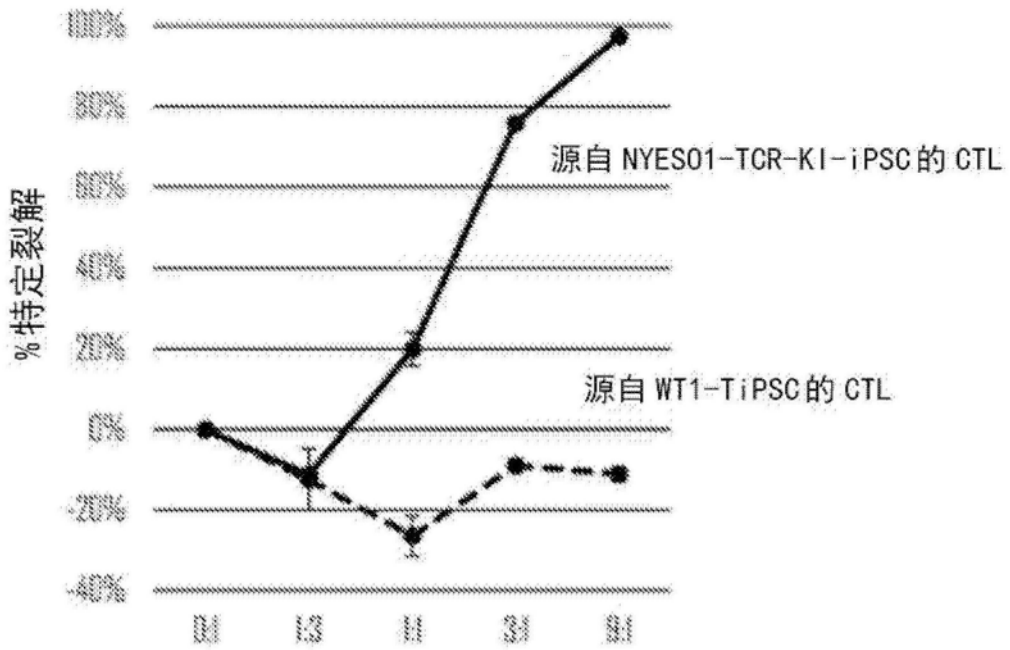


图26

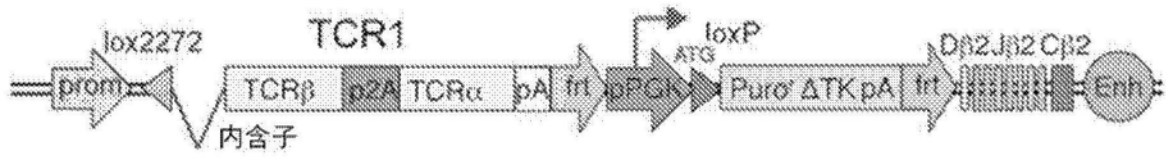


图27

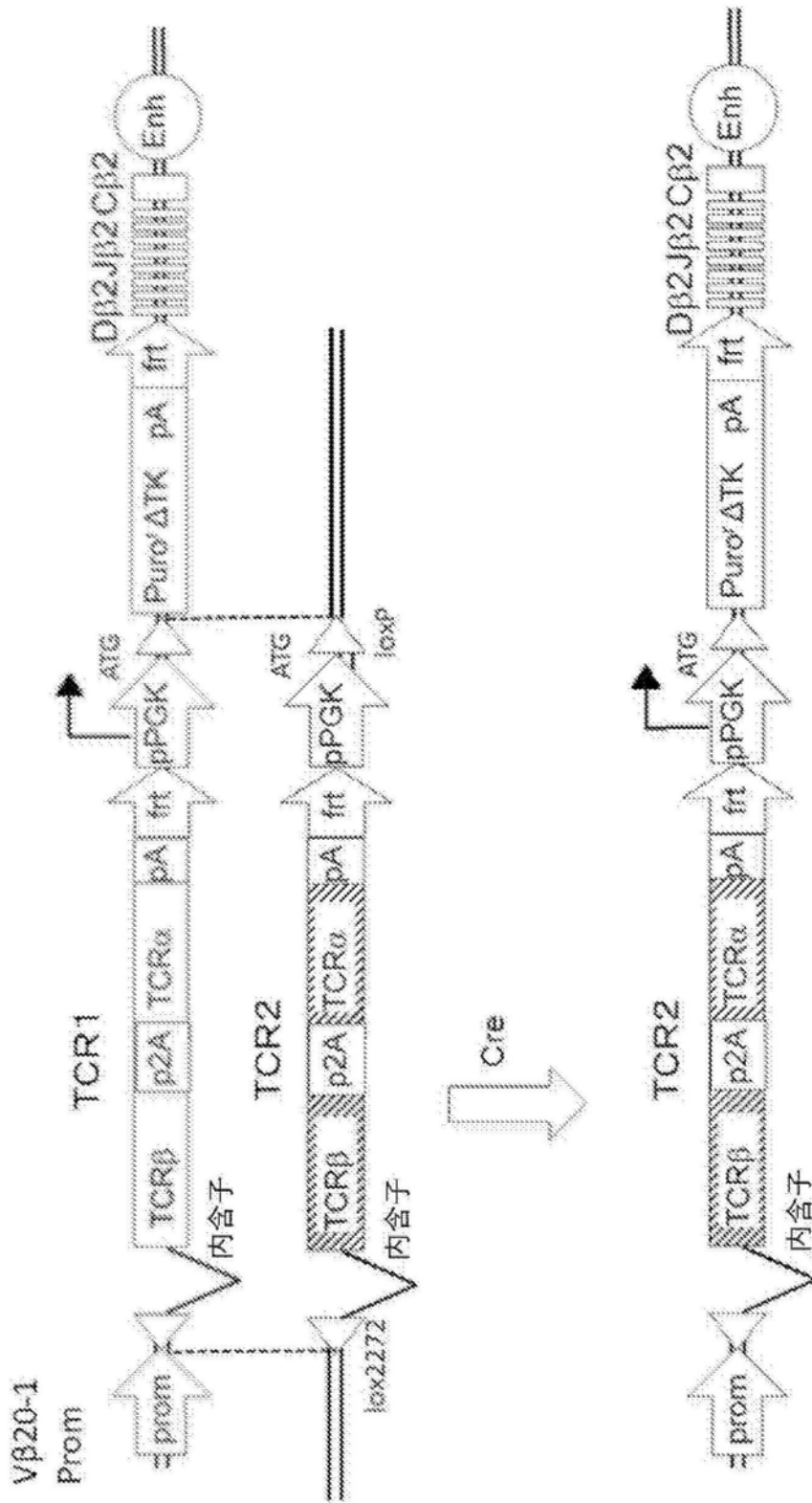


图28

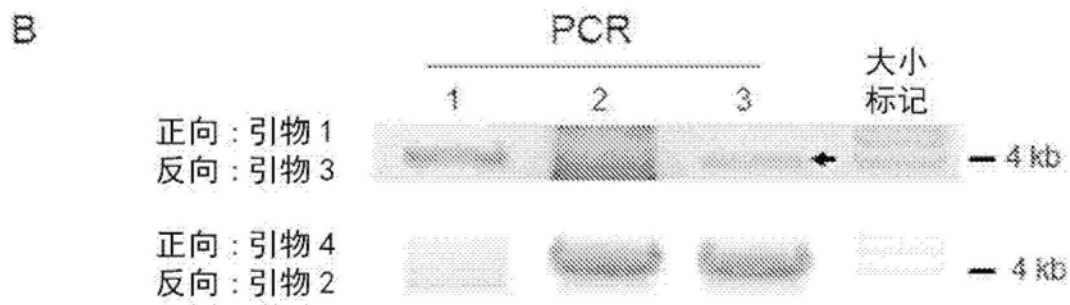
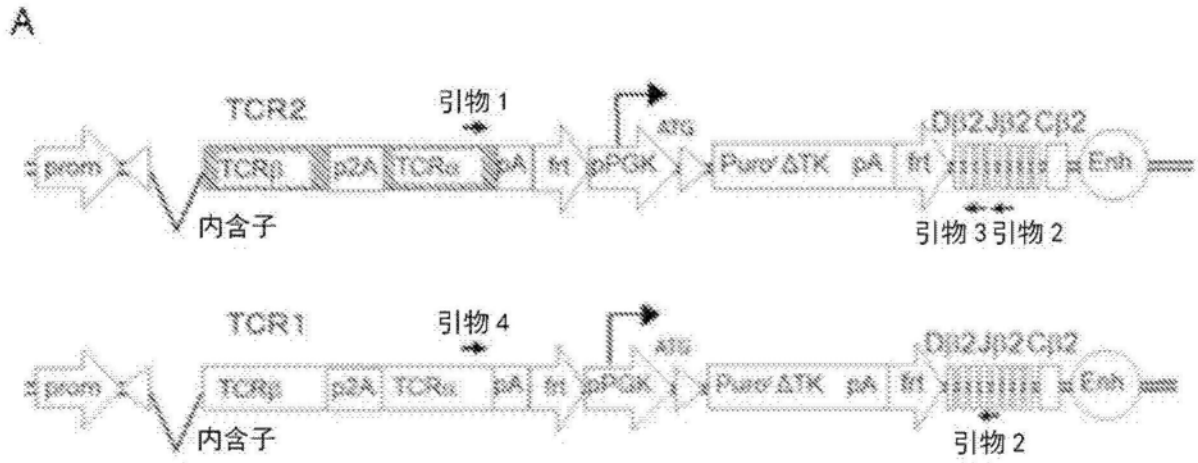


图29