



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201934754 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：107138453

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 10 月 30 日

(51)Int. Cl.：

*C12N15/63 (2006.01)*

*C07H21/04 (2006.01)*

*A61K31/713 (2006.01)*

*A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2017/10/30 美國

62/579,113

2017/10/30 美國

62/579,114

(71)申請人：美商 P A C T 製藥公司 (美國) PACT PHARMA, INC. (US)

美國

(72)發明人：賈可比 凱爾 馬汀 JACOBY, KYLE MARTIN (US)；法蘭蘇索夫 艾利西斯 FRANZUSOFF, ALEXIS (US)；曼德爾 凱須曼 史戴芬尼 MANDL-CASHMAN, STEFANIE (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：332 項 圖式數：34 共 251 頁

(54)名稱

初代細胞基因編輯

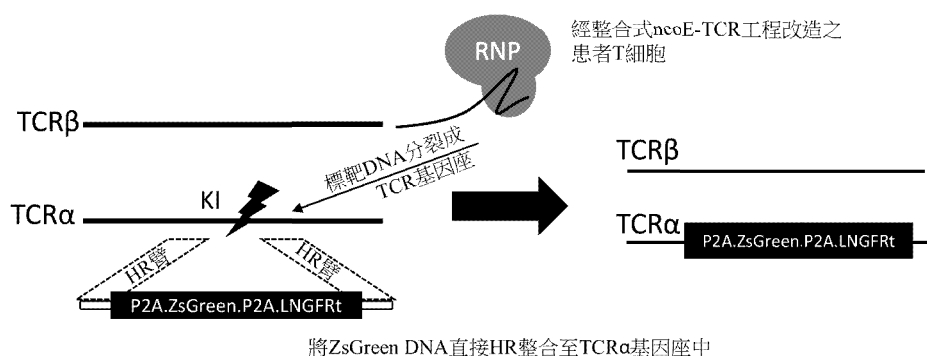
PRIMARY CELL GENE EDITING

(57)摘要

本發明提供在不使用經病毒介導的傳遞之情況下初代細胞的經核酸酶介導之基因編輯之方法及組合物。亦提供使用經編輯初代細胞治療之方法。

Methods and compositions are provided for nuclease-mediated gene editing of primary cells without the use of viral mediated delivery. Methods of treatments using edited primary cells are also provided.

指定代表圖：



【圖1】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

初代細胞基因編輯

【英文發明名稱】

PRIMARY CELL GENE EDITING

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 基因靶向為可直接編輯基因組之方法，該方法提供用於經工程改造細胞產物、修復造成基因疾病之突變或產生突變以研究基因之途徑。基因靶向依賴於在傳遞支撐所需改變序列之同源性修復模板DNA以及靶向所關注基因座之定點核酸酶後之同源重組。

【0002】 基因靶向已用於初代人類T細胞中以產生具有新穎特異性之T細胞。在此等個例中，AAV已用於傳遞同源性修復模板DNA。DNA含有用於對新抗原決定基具有特異性之嵌合抗原受體(CAR)或T細胞受體(TCR)之編碼序列。當此等序列靶向TCR $\alpha$  (通常)或TCR $\beta$ 基因座時，調查員可同步的實現內源性TCR之敲除(及對應特異性之移除)及新蛋白質(及對應特異性)之敲入。此過程大規模用於產生用於醫療用途之CAR T細胞及TCR T細胞。然而，AAV產生花費大量時間，其昂貴、困難且經高度調節，限制其應用。

【0003】 先前已描述藉由裸露質體DNA編輯之基因，但僅在不朽化細胞株的情況下，引用具有含毒性之初代細胞之問題。此等問題可源於研究者使用mRNA傳遞展現某種毒性之核酸酶以及進一步減小細胞生存力之DNA。此等問題亦可源於DNA傳遞效率依賴於DNA大小且載體可能未經

適當優化之事實。另外，已知常見於大多數研究實驗室使用之基於試劑盒之質粒製劑的DNA雜質促成細胞毒性，其可能已阻礙使用質體DNA作為同源性修復模板之發展。僅最近已改良DNA純化及傳遞技術(例如，出現質體疫苗，及經優化電穿孔法協議及諸如核轉染之設備)。

**【0004】** 轉座子亦已用於將DNA插入至初代人類T細胞中，但以非特異性方式(更類似於逆轉錄病毒傳遞)。在此情況下，待無規插入至基因組中裸露DNA經傳遞作為裸露的質體DNA。然而，較高毒性及較低效率為此方法之侷限性。先前亦已描述經由同源重組之初代人類T細胞中之基因編輯(例如Schumann等人，Proc Natl Acad Sci U S A .2015年8月18日;112(33):10437-42)；然而，僅在極小編輯或修復的情況下，例如20個核苷酸或更小。先前亦已描述經由同源重組之藉由核糖核蛋白(ribonucleoprotein；RNP)複合物之電穿孔法的基因編輯，例如在Kim等人，(Genome Res.2014年6月;24(6):1012-9)中及在國際公開案第WO2016/123578號中，然而，僅12個核苷酸之相對較小插入(或基因組序列之替代物)證實於使用線性模板之每一者中。亦未針對除T細胞以外之初代細胞，諸如造血幹細胞及天然殺手(NK)細胞良好描述用於較大編輯之組合物及方法。本領域缺少在初代細胞中進行較大編輯之有效方法，進而潛在地限制基因編輯之治療應用。

**【0005】** 因此，本領域極需要用於調節細胞，諸如人類初代細胞及人類初代T細胞中之基因編輯的改良的組合物及方法。

#### **【發明內容】**

**【0006】** 本文提供經修飾細胞，其包含：包含外源性核苷酸序列之環狀聚核苷酸，外源性核苷酸序列包含：a)編碼基因之至少一部分的核苷

酸序列；b)與內源性基因組標靶基因座之第一區域一致的核苷酸序列；以及c)與內源性基因組標靶基因座之第二區域一致的核苷酸序列，與內源性基因組標靶基因座之第一及第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於在內源性基因組標靶基因座處同源重組，且其中經修飾細胞實質上不含病毒介導的傳遞組分。在一些實施例中，經修飾細胞進一步包含整合式核苷酸序列，其中整合式核苷酸序列包含與編碼基因之至少一部分之核苷酸序列一致的序列，整合式核苷酸序列整合於內源性基因組標靶基因座處，且整合式核苷酸序列之取向可以使得基因之至少一部分能夠經表現。在一些實施例中，經修飾細胞進一步包含能夠在內源性基因組標靶基因座內裂解限定核苷酸序列之核酸酶組合物。

**【0007】** 本文亦提供經修飾細胞，其包含T細胞，該T細胞包含：a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；c)編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列；d)編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列；其中編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列及編碼第一及第二連接子多肽序列之核苷酸序列經整合至內源性TCR- $\alpha$ 基因座中，編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列及編碼第一及第二連接子多肽序列之核苷酸序列之取向可以使得多肽序列中之每一者能夠經表現為單一多肽，其中第二連接子多肽序列經安置於TCR- $\alpha$ 多肽序列與TCR- $\beta$ 多肽序列之間，第一及第二連接子多肽為能夠經裂解於T細胞中使得TCR- $\alpha$ 多肽序列及TCR- $\beta$ 多肽序列各自形成單獨多肽之可裂解連接子多肽，其中單獨多肽能夠締合在一起以形成功能性TCR，其中經修飾細胞實質上不含病毒介導的傳遞組分，且其中內源性TCR- $\beta$ 基因座斷裂。

【0008】 本文亦提供經修飾細胞，其包含T細胞，該T細胞包含：a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；c)編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列；d)編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列；其中編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列及編碼第一及第二連接子多肽序列之核苷酸序列經整合至內源性TCR基因座中，編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列及編碼第一及第二連接子多肽序列之核苷酸序列之取向可以使得多肽序列中之每一者能夠經表現為單一多肽，其中第二連接子多肽序列經安置於TCR- $\alpha$ 多肽序列與TCR- $\beta$ 多肽序列之間，且第一及第二連接子多肽為能夠經裂解於T細胞中之可裂解連接子多肽使得TCR- $\alpha$ 多肽序列及TCR- $\beta$ 多肽序列各自形成單獨多肽，其中單獨多肽能夠締合在一起以形成功能性TCR。在一些實施例中，經修飾細胞進一步包含環狀聚核苷酸，該環狀聚核苷酸包含外源性核苷酸序列，外源性核苷酸序列包含：a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列及編碼第一及第二連接子多肽序列之核苷酸序列；b)與內源性TCR基因座一致之第一區域的核苷酸序列；以及c)與內源性TCR基因座之第二區域一致的核苷酸序列，且與內源性TCR基因座之第一及第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於內源性TCR基因座處之同源重組。在一些實施例中，經修飾細胞實質上不含病毒介導的傳遞組分。在一些實施例中，經修飾細胞進一步包含能夠在內源性TCR基因座內裂解限定核苷酸序列之核酸酶組合物。

【0009】 在一些實施例中，經修飾細胞進一步包含產生由第二限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。在一些實施例中，產生非功能性

基因之突變包含選自由以下各者組成的群中之基因之編碼區中的突變：造成所轉譯蛋白質讀框變化的讀框轉移突變、導致胺基酸被終止密碼子取代之無意義突變及造成一個胺基酸被另一胺基酸取代的誤義突變。在一些實施例中，產生非功能性基因之突變包含選自由以下各者組成的群中之基因的非編碼區中之突變：改變由基因編碼之mRNA產物之表現的突變及改變由基因編碼之mRNA產物之穩定性的突變。在一些實施例中，經修飾細胞進一步包含能夠在經修飾細胞內裂解第二限定核苷酸序列之第二核酸酶組合物。

**【0010】** 在一些實施例中，核酸酶組合物包含選自由以下各者組成的群中之核酸酶：成簇規律間隔短回文重複序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats；CRISPR)家族核酸酶或其衍生物、類轉錄活化因子效應子核酸酶(Transcription activator - like effector nuclease；TALEN)或其衍生物、鋅指核酸酶(zinc-finger nuclease；ZFN)或其衍生物及復位核酸內切酶(homing endonuclease；HE)或其衍生物。在一些實施例中，CRISPR家族核酸酶為Cas9核酸酶。在一些實施例中，核酸酶組合物包含預成蛋白質複合物。在一些實施例中，核酸酶組合物包含能夠在經修飾細胞內表現核酸酶的核苷酸載體。在一些實施例中，核酸酶組合物包含CRISPR RNA (crRNA)及反式活化CRISPR RNA (tracrRNA)。在一些實施例中，crRNA包含前導RNA(gRNA)，其中gRNA與限定核苷酸序列互補。在一些實施例中，crRNA及tracrRNA在單一聚核苷酸上。在一些實施例中，crRNA及tracrRNA在各別聚核苷酸上。

**【0011】** 在一些實施例中，編碼基因之至少一部分之核苷酸序列或

經編碼多肽序列之表現經內源性基因組標靶基因座或內源性TCR基因座中之內源性啟動子定向。在一些實施例中，編碼基因之至少一部分的核苷酸序列或經編碼多肽序列之表現經外源性啟動子定向。在一些實施例中，外源性啟動子選自由以下各者組成之群：哺乳動物啟動子、人類啟動子、病毒啟動子、來自逆轉錄病毒或慢病毒之長端重複序列(long-terminal repeat；LTR)衍生啟動子、兩個啟動子之融合體、啟動子之兩個部分之融合體、MMLV LTR啟動子、HIV LTR啟動子、MCMV LTR啟動子、EF1a、MND、CMV、SV40、PGK1、Ubc、 $\beta$ -肌動蛋白、CAG、小分子誘導性啟動子、四環素誘導性啟動子、小分子條件性啟動子、Cre-LoxP條件性啟動子系統、Flp-FRT條件性啟動子系統及他莫昔芬(tamoxifen)條件性啟動子系統。

**【0012】** 在一些實施例中，編碼基因之至少一部分的核苷酸序列、編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列或編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列長度大於或等於100個鹼基。在一些實施例中，編碼基因之至少一部分的核苷酸序列、編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列或編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於400個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於800個鹼基、長度大於或等於1500個鹼基、長度大於或等於2000個鹼基、或長度大於或等於4000個鹼基。

**【0013】** 在一些實施例中，與內源性基因組標靶基因座或內源性TCR基因座之第一區域一致的核苷酸序列長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於100個鹼基、長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於300個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基、或長

度大於或等於2000個鹼基。

【0014】 在一些實施例中，與內源性基因組標靶基因座或內源性TCR基因座之第二區域一致的核苷酸序列長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於100個鹼基、長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於300個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基、或長度大於或等於2000個鹼基。

【0015】 在一些實施例中，與內源性基因組標靶基因座或內源性TCR基因座之第一區域一致的核苷酸序列及與內源性基因組標靶基因座或內源性TCR基因座之第二區域一致的核苷酸序列各自長度大於或等於600個鹼基。

【0016】 在一些實施例中，限定核苷酸序列在核苷酸序列整合之後斷裂。

【0017】 在一些實施例中，以可操作方式與內源性基因組標靶基因座或內源性TCR基因座相聯之內源性基因之表現斷裂。

【0018】 在一些實施例中，經修飾細胞進一步包含能夠增大同源重組率之額外反應劑。在一些實施例中，能夠增大同源重組率之額外反應劑包含同源重組修復路徑之活化因子、非同源末端連接(non-homologous end joining；NHEJ)修復路徑之抑制劑或其組合。

【0019】 在一些實施例中，經修飾細胞進一步包含能夠增大經修飾細胞之生存力的額外反應劑。在一些實施例中，能夠增大經修飾細胞之生存力的額外反應劑包含核酸感測途徑之抑制劑。在一些實施例中，核酸感測途徑包含選自以下各者之群：TLR9核酸感測途徑、AIM2核酸感測途徑、IFI16核酸感測途徑、cGAS核酸感測途徑及胞漿核酸感測途徑。在一

些實施例中，核酸感測途徑之抑制劑包含寡核苷酸拮抗劑。在一些實施例中，寡核苷酸拮抗劑包含序列TTAGGG或其串疊型重複序列。

**【0020】** 在一些實施例中，環狀聚核苷酸包含質體或奈米質體。在一些實施例中，質體具有小於500個鹼基之載體主鏈，且其中載體主鏈為一種核苷酸序列，該核苷酸序列不為編碼基因之至少一部分的核苷酸序列、不為編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、不為編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列、不為編碼第一及第二連接子多肽之核苷酸序列、不為與第一內源性標靶基因組基因座或內源性TCR基因座一致之核苷酸序列且不為與第二內源性標靶基因組基因座或內源性TCR基因座一致之核苷酸序列。

**【0021】** 在一些實施例中，環狀聚核苷酸不為聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction ; PCR)擴大之聚核苷酸。

**【0022】** 在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座或內源性TCR基因座包含編碼區。在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座或內源性TCR基因座包含內含子。

**【0023】** 在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座或內源性TCR基因座包含T細胞受體(TCR)- $\alpha$ 基因座。在一些實施例中，由第二限定核苷酸序列編碼之非功能性基因為斷裂TCR- $\beta$ 基因。

**【0024】** 在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座或內源性TCR基因座包含TCR- $\beta$ 基因座。在一些實施例中，由第二限定核苷酸序列編碼之非功能性基因為斷裂TCR- $\alpha$ 基因。

**【0025】** 在一些實施例中，內源性基因組標靶包含免疫檢查點基因座。在一些實施例中，免疫檢查點基因座選自由以下各者組成之群：PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM3、LAG3及VISTA。

【0026】 在一些實施例中，基因之至少一部分包含連接子序列。在一些實施例中，連接子序列編碼可裂解連接子多肽序列，其中在表現之後，可裂解連接子多肽經裂解使得產生僅經基因之至少一部分編碼的多肽。在一些實施例中，可裂解連接子多肽中之任一者包含弗林裂解位點(furin cleavage site)。在一些實施例中，連接子序列中之任一者包含選自由以下各者組成的群中之2A核糖體跳躍元素：T2A、E2A、P2A及F2A。在一些實施例中，可裂解連接子多肽中之任一者包含Gly-Ser-Gly連接子，視需要其中Gly-Ser-Gly連接子為2A核糖體跳躍元素之N端，且視需要其中Gly-Ser-Gly連接子自N端至C端之方向為弗林裂解位點：Gly-Ser-Gly連接子：2A核糖體跳躍元素。

【0027】 在一些實施例中，連接子序列、編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列或編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列包含內部核糖體入口位點(internal ribosome entry site；IRES)。

【0028】 在一些實施例中，連接子序列、編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列或編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列包含外源性啟動子。

【0029】 在一些實施例中，其中連接子序列、編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列或編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列包含剪接受體序列。

【0030】 在一些實施例中，基因之至少一部分、編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列或編碼TCR基因之至少一部分的核苷酸序列包含編碼信號肽之核苷酸序列，其中信號肽以操作方式連接至由基因之至少一部分編碼的多肽、TCR- $\alpha$ 多肽序列、TCR- $\beta$ 多

肽序列或由TCR基因之至少一部分編碼的多肽。在一些實施例中，信號肽為外源性信號肽，視需要其中外源性信號肽為人類生長激素信號肽。

**【0031】** 在一些實施例中，第一連接子多肽序列及第二連接子多肽序列包含相同連接子多肽序列。在一些實施例中，編碼相同連接子多肽序列之編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列及編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列包含密碼子編碼分歧核苷酸序列，且其中編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列及編碼第二連接子多肽之核苷酸序列具有彼此相對編碼分歧之密碼子。

**【0032】** 在一些實施例中，基因之至少一部分編碼編碼區。在一些實施例中，編碼區選自由以下各者組成之群：調變免疫系統之因子、細胞介素、調變T細胞功能之因子、提高T細胞存活之因子、提昇T細胞功能之因子及免疫檢查點抑制劑。

**【0033】** 在一些實施例中，基因之至少一部分編碼非編碼區。在一些實施例中，非編碼區選自由各者以下組成之群：shRNA、siRNA、miRNA、調變免疫系統之因子、細胞介素、調變T細胞功能之因子、提高T細胞存活之因子及提昇T細胞功能之因子。在一些實施例中，基因之至少一部分包含TCR基因之至少一部分。在一些實施例中，TCR基因之至少一部分包含：a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；以及c)編碼第二連接子序列之核苷酸序列。

**【0034】** 在一些實施例中，編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列或TCR基因之至少一部分選自由以下各者組成之群：鼠化TCR、人類化TCR、結構域調換TCR、點突變TCR、具有能夠形成二硫鍵聯之經工程改造半胱胺酸的經工程改造TCR、優化人體內

表現之密碼子優化TCR、優化密碼子使用度且移除RNA不穩定性元素之序列優化TCR、TCR基因之可變區序列、嵌合抗原受體(CAR)及單鏈TCR之至少一部分。

【0035】 在一些實施例中，TCR- $\alpha$ 多肽序列、TCR- $\beta$ 多肽序列或由TCR基因之至少一部分編碼的多肽經工程改造以展現相對於內源性TCR多肽序列之與第二外源性TCR多肽序列之更大相聯性，視需要其中TCR- $\alpha$ 多肽序列及TCR- $\beta$ 多肽序列經工程改造以展現相對於內源性TCR多肽序列之彼此的更大相聯性。

【0036】 在一些實施例中，經編碼多肽序列在自N端至C端之方向為連接子：TCR- $\alpha$ ：第二連接子：TCR- $\beta$ 。在一些實施例中，經編碼多肽序列在N端至C端之方向為連接子：TCR- $\beta$ ：第二連接子：TCR- $\alpha$ 。

【0037】 在一些實施例中，基因之至少一部分、編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列或編碼TCR基因之至少一部分的核苷酸序列包含密碼子編碼分歧核苷酸序列，且其中該密碼子編碼分歧核苷酸序列為具有相對於內源性核苷酸序列編碼分歧之密碼子。

【0038】 在一些實施例中，經修飾細胞包含免疫細胞。在一些實施例中，免疫細胞包含T細胞。在一些實施例中，T細胞選自由以下各者組成之群：細胞毒素T淋巴球(CTL)、CD8<sup>+</sup> T細胞、CD4<sup>+</sup> T細胞、初代T細胞、腫瘤浸潤性T細胞、經工程改造T細胞、調節T細胞(Treg)、輔助T細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞、 $\alpha$ - $\beta$  T細胞及 $\gamma$ - $\delta$  T細胞。在一些實施例中，其中免疫細胞包含天然殺手細胞。在一些實施例中，免疫細胞選自由以下各者組成之群：B細胞、單核球、巨噬細胞、樹突狀細胞及天然殺手T細胞。

【0039】 在一些實施例中，經修飾細胞包含幹細胞。在一些實施例中，幹細胞包含造血幹細胞。在一些實施例中，幹細胞包含胚胎幹細胞。

【0040】 在一些實施例中，經修飾細胞為初代細胞。

【0041】 在一些實施例中，經修飾細胞為經分離細胞，其中經分離細胞與個體分離。在一些實施例中，個體已知或懷疑患有癌症。

【0042】 在一些實施例中，經修飾細胞包含人類細胞或人類衍生細胞。

【0043】 在一些實施例中，經修飾細胞為活體外培養的細胞。在一些實施例中，活體外培養的細胞包含受刺激細胞。在一些實施例中，受刺激細胞包含經細胞介素刺激T細胞，視需要其中經細胞介素刺激T細胞包含經CD3刺激T細胞、經CD28刺激T細胞或經CD3及CD28刺激T細胞。在一些實施例中，經細胞介素刺激T細胞係在存在IL7、IL15或其組合的情況下經培養的。在一些實施例中，經細胞介素刺激T細胞係在存在IL2的情況下經培養的。在一些實施例中，經細胞介素刺激T細胞係在實質上不含IL2之培養基中經培養的。

【0044】 在一些實施例中，經修飾細胞不含整合式病毒，其中整合式病毒以可操作方式與病毒介導的傳遞組分相聯。在一些實施例中，經修飾細胞之表面上之MHC I類不含衍生自病毒介導的傳遞組分或整合式病毒之肽，其中整合式病毒以可操作方式與病毒介導的傳遞組分相聯。

【0045】 在一些實施例中，經修飾細胞進一步包含第二環狀聚核苷酸，該第二環狀聚核苷酸包含第二外源性核苷酸組合物，第二外源性核苷酸組合物包含：a)編碼第二基因之至少一部分的核苷酸序列；b)與第二內源性基因組標靶基因座一致之第一區域的核苷酸序列；以及c)與第二內源

性基因組標靶基因座之第二區域一致的核苷酸序列，且與第二內源性基因組標靶基因座之第一及第二區域一致之核苷酸序列之取向可以便於在第二內源性基因組標靶基因座處同源重組。在一些實施例中，經修飾細胞進一步包含第二整合式核苷酸序列，其中第二整合式核苷酸序列包含與編碼第二基因之至少該部分的核苷酸序列一致之序列，第二整合式核苷酸序列在第二內源性基因組標靶基因座處整合，且第二整合式核苷酸序列之取向可以使得第二基因之至少一部分能夠經表現。

**【0046】** 本文亦提供包含本文中所描述經修飾細胞中之任一者的細胞群，其中大於10%、大於20%、大於30%、大於40%、大於50%、大於60%、或大於70%之群體包含整合式核苷酸序列。在一些實施例中，經修飾細胞在整合式核苷酸序列之整合之後尚未進行分類、選拔或分離。

**【0047】** 本文中亦提供包含整合式核苷酸序列之細胞群，其中整合式核苷酸序列包含基因之至少一部分，整合式核苷酸序列整合於內源性基因組標靶基因座處，且整合式核苷酸序列之取向可以使得基因之至少一部分能夠經表現，其中細胞群實質上不含病毒介導的傳遞組分，且其中群體中之大於10%、大於20%、大於30%、大於40%、大於50%、大於60%、或大於70%之T細胞包含整合式核苷酸序列。在一些實施例中，T細胞在整合式核苷酸序列之整合之後尚未進行分類、選拔或分離。

**【0048】** 在一些實施例中，細胞群進一步包含能夠在內源性TCR基因座內裂解限定核苷酸序列之核酸酶組合物。

**【0049】** 在一些實施例中，細胞群進一步包含環狀聚核苷酸，該環狀聚核苷酸包含外源性核苷酸序列，外源性核苷酸序列包含：a)編碼基因之至少一部分的核苷酸序列；b)與內源性基因座之第一區域一致的核苷酸

序列；以及c)與內源性基因座之第二區域一致的核苷酸序列，且與內源性基因座之第一及第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於在內源性基因座處同源重組。

**【0050】** 在一些實施例中，細胞群為至少 $1 \times 10^6$ 個T細胞、至少 $2 \times 10^6$ 個T細胞、至少 $5 \times 10^6$ 個T細胞、至少 $1 \times 10^7$ 個T細胞或至少 $5 \times 10^7$ 個T細胞。

**【0051】** 在一些實施例中，細胞群進一步包含產生由第二限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。在一些實施例中，產生非功能性基因之突變包含選自由以下各者組成的群中之基因之編碼區中的突變：造成所轉譯蛋白質讀框變化的讀框轉移突變、導致胺基酸被終止密碼子取代之無意義突變及造成一個胺基酸被另一胺基酸取代的誤義突變。在一些實施例中，產生非功能性基因之突變包含選自由以下各者組成的群中之基因的非編碼區中之突變：改變由基因編碼之mRNA產物之表現的突變及改變由基因編碼之mRNA產物之穩定性的突變。

**【0052】** 在一些實施例中，核酸酶組合物包含選自由以下各者組成的群中之核酸酶：成簇規律間隔短回文重複序列(CRISPR)家族核酸酶、類轉錄活化因子效應子核酸酶(TALEN)或其衍生物、鋅指核酸酶(ZFN)或其衍生物及復位核酸內切酶(HE)或其衍生物。在一些實施例中，CRISPR家族核酸酶為Cas9核酸酶。在一些實施例中，核酸酶組合物包含預成蛋白質複合物。在一些實施例中，核酸酶組合物包含能夠在細胞群內表現核酸酶的核苷酸載體。在一些實施例中，核酸酶組合物包含引導限定核苷酸序列處之核酸酶介導的裂解的前導RNA。在一些實施例中，前導RNA包含CRISPR RNA (crRNA)及反式活化CRISPR RNA (tracrRNA)。在一些實

施例中，crRNA及tracrRNA在單一聚核苷酸上。在一些實施例中，crRNA及tracrRNA在各別聚核苷酸上。

**【0053】** 在一些實施例中，細胞群進一步包含能夠在細胞群內裂解第二限定核苷酸序列之第二核酸酶組合物。

**【0054】** 在一些實施例中，經編碼多肽序列之表現係藉由內源性基因組標靶基因座內之內源性啟動子定向。在一些實施例中，經編碼多肽序列之表現係藉由外源性啟動子定向。在一些實施例中，外源性啟動子選自由以下各者組成之群：哺乳動物啟動子、人類啟動子、病毒啟動子、來自逆轉錄病毒或慢病毒之長端重複序列(LTR)衍生啟動子、兩個啟動子之融合體、啟動子之兩個部分之融合體、MMLV LTR啟動子、HIV LTR啟動子、MCMV LTR啟動子、EF1a、MND、CMV、SV40、PGK1、Ubc、 $\beta$ -肌動蛋白、CAG、小分子誘導性啟動子、四環素誘導性啟動子、小分子條件性啟動子、Cre-LoxP條件性啟動子系統、Flp-FRT條件性啟動子系統及他莫昔芬條件性啟動子系統。

**【0055】** 在一些實施例中，編碼基因之至少一部分的核苷酸序列長度大於或等於100個鹼基。在一些實施例中，編碼基因之至少一部分的核苷酸序列長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於400個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於800個鹼基、長度大於或等於1500個鹼基、長度大於或等於2000個鹼基、或長度大於或等於4000個鹼基。

**【0056】** 在一些實施例中，與內源性基因組標靶基因座之第一區域一致的核苷酸序列長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於100個鹼基、長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於300個鹼基、長度大於

或等於600個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基、或大於或等於2000個鹼基。

【0057】 在一些實施例中，與內源性基因組標靶基因座之第二區域一致的核苷酸序列長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於100個鹼基、長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於300個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基、或長度大於或等於2000個鹼基。

【0058】 在一些實施例中，與內源性基因組標靶基因座之第一區域一致的核苷酸序列及與內源性基因組標靶基因座之第二區域一致的核苷酸序列各自長度大於或等於600個鹼基。

【0059】 在一些實施例中，限定核苷酸序列在核苷酸序列整合之後斷裂。

【0060】 在一些實施例中，以可操作方式與內源性基因組標靶基因座或內源性TCR基因座相聯之內源性基因之表現斷裂。

【0061】 在一些實施例中，細胞群進一步包含能夠增大同源重組率之額外反應劑。

【0062】 在一些實施例中，細胞群進一步包含能夠增大細胞群之生存力的額外反應劑。

【0063】 在一些實施例中，環狀聚核苷酸包含質體或奈米質體。在一些實施例中，質體具有小於500個鹼基之載體主鏈，且其中載體主鏈為一種核苷酸序列，該核苷酸序列不為編碼基因之至少一部分的核苷酸序列、不為編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、不為編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列、不為編碼第一及第二連接子多肽之核苷酸序列、不為與第一

內源性標靶基因組基因座或內源性TCR基因座一致之核苷酸序列且不為與第二內源性標靶基因組基因座或內源性TCR基因座一致之核苷酸序列。

【0064】 在一些實施例中，環狀聚核苷酸不為聚合酶鏈反應(PCR)擴大之聚核苷酸。

【0065】 在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座包含編碼區。在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座包含內含子。

【0066】 在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座包含T細胞受體(TCR)- $\alpha$ 基因座。在一些實施例中，由第二限定核苷酸序列編碼之非功能性基因為斷裂的TCR- $\beta$ 基因。

【0067】 在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座包含TCR- $\beta$ 基因座。在一些實施例中，由第二限定核苷酸序列編碼之非功能性基因為斷裂的TCR- $\alpha$ 基因。

【0068】 在一些實施例中，內源性基因組標靶包含免疫檢查點基因座。在一些實施例中，免疫檢查點基因座選自由以下各者組成之群：PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM3、LAG3及VISTA。

【0069】 在一些實施例中，基因之至少一部分包含連接子序列。在一些實施例中，連接子序列編碼可裂解連接子多肽序列，其中在表現之後，可裂解連接子多肽經裂解使得產生僅由基因之至少一部分編碼的多肽。在一些實施例中，可裂解連接子多肽包含選自由以下各者組成之群中之2A核糖體跳躍元素：T2A、E2A、P2A及F2A。在一些實施例中，可裂解連接子多肽包含弗林裂解位點。在一些實施例中，可裂解連接子多肽包含Gly-Ser-Gly連接子，視需要其中Gly-Ser-Gly連接子為2A核糖體跳躍元素之N端，且視需要其中Gly-Ser-Gly連接子自N端至C端之方向為弗林裂

解位點：Gly-Ser-Gly連接子：2A核糖體跳躍元素。

【0070】 在一些實施例中，連接子序列包含內部核糖體入口位點(IRES)。

【0071】 在一些實施例中，連接子序列包含外源性啟動子序列。

【0072】 在一些實施例中，連接子序列包含剪接受體序列。

【0073】 在一些實施例中，基因之至少一部分包含第一連接子多肽序列及第二連接子多肽序列。在一些實施例中，第一連接子多肽序列及第二連接子多肽序列包含相同連接子多肽序列。在一些實施例中，編碼相同連接子多肽序列之編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列及編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列包含密碼子編碼分歧核苷酸序列，且其中編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列及編碼第二連接子多肽之核苷酸序列具有彼此相對編碼分歧之密碼子。

【0074】 在一些實施例中，基因之至少一部分編碼編碼區。在一些實施例中，編碼區選自由以下各者組成之群：調變免疫系統之因子、細胞介素、調變T細胞功能之因子、提高T細胞存活之因子、提昇T細胞功能之因子及免疫檢查點抑制劑。

【0075】 在一些實施例中，基因之至少一部分編碼非編碼區。在一些實施例中，非編碼區選自由以下各者組成之群：shRNA、siRNA、miRNA、調變免疫系統之因子、細胞介素、調變T細胞功能之因子、提高T細胞存活之因子及提昇T細胞功能之因子。

【0076】 在一些實施例中，基因之至少一部分包含TCR基因之至少一部分。在一些實施例中，TCR基因之至少一部分包含：a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；以及c)編碼

第二連接子序列之核苷酸序列。在一些實施例中，編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列或TCR基因之至少一部分選自由以下各者組成之群：鼠化TCR、人類化TCR、結構域調換TCR、點突變TCR、具有能夠形成二硫鍵聯之經工程改造半胱氨酸的經工程改造TCR、優化人體內表現之密碼子優化TCR、優化密碼子使用度且移除RNA不穩定性元素之序列優化TCR、TCR基因之可變區序列、嵌合抗原受體(CAR)及單鏈TCR之至少一部分。在一些實施例中，TCR- $\alpha$ 多肽序列、TCR- $\beta$ 多肽序列或由TCR基因之至少一部分編碼的多肽經工程改造以展現相對於內源性TCR多肽序列之與第二外源性TCR多肽序列之更大相聯性，視需要其中TCR- $\alpha$ 多肽序列及TCR- $\beta$ 多肽序列經工程改造以展現相對於內源性TCR多肽序列之彼此的更大相聯性。在一些實施例中，經編碼多肽序列之方向為連接子:TCR- $\alpha$ :第二連接子:TCR- $\beta$ 。在一些實施例中，經編碼多肽序列之方向為連接子:TCR- $\beta$ :第二連接子:TCR- $\alpha$ 。在一些實施例中，編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列或編碼TCR基因之至少一部分的核苷酸序列包含密碼子編碼分歧核苷酸序列，且其中密碼子編碼分歧核苷酸序列具有相對於內源性核苷酸序列相對編碼分歧之密碼子。

**【0077】** 在一些實施例中，細胞群包含人類細胞或人類衍生細胞。

**【0078】** 在一些實施例中，細胞群包含免疫細胞群。在一些實施例中，免疫細胞群包含T細胞群。在一些實施例中，T細胞群選自由以下各者組成之群：細胞毒素T淋巴球(cytotoxic T lymphocyte, CTL)、CD8<sup>+</sup> T細胞、CD4<sup>+</sup> T細胞、初代T細胞、腫瘤浸潤性T細胞、經工程改造T細胞、調節T細胞(Treg)、輔助T細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞、 $\alpha$ -

$\beta$  T細胞及 $\gamma$ - $\delta$  T細胞。在一些實施例中，免疫細胞群包含天然殺手細胞群。在一些實施例中，細胞群包含選自由以下各者組成的群中之群：B細胞、單核球、巨噬細胞、樹突狀細胞及天然殺手T細胞。

【0079】 在一些實施例中，細胞群包含幹細胞群。在一些實施例中，幹細胞群包含造血幹細胞群。在一些實施例中，幹細胞群包含胚胎幹細胞群。

【0080】 在一些實施例中，細胞群為初代細胞。

【0081】 在一些實施例中，細胞群為分離的細胞群，其中分離的細胞群與個體分離。在一些實施例中，個體為已知或懷疑患有癌症。

【0082】 在一些實施例中，細胞群包含活體外經培養細胞。在一些實施例中，活體外經培養細胞包含受刺激細胞。在一些實施例中，受刺激細胞包含經細胞介素刺激T細胞，視需要其中經細胞介素刺激T細胞包含受CD3刺激T細胞、受CD28刺激T細胞或受CD3及CD28刺激T細胞。在一些實施例中，受細胞介素刺激T細胞係在存在IL7、IL15或其組合的情況下培養。在一些實施例中，受細胞介素刺激T細胞係在存在IL2的情況下培養。在一些實施例中，受細胞介素刺激T細胞係在實質上不含IL2之培養基中培養。

【0083】 在一些實施例中，細胞群進一步包含第二整合式核苷酸序列，其中第二整合式核苷酸序列包含與編碼第二基因之至少一部分的核苷酸序列一致之序列，第二整合式核苷酸序列在第二內源性基因組標靶基因座處整合，且第二整合式核苷酸序列之取向可以使得第二基因之至少一部分能夠經表現。在一些實施例中，細胞群進一步包含第二環狀聚核苷酸，該第二環狀聚核苷酸包含第二外源性核苷酸組合物，第二外源性核苷酸組

合物包含：a)編碼第二基因之至少一部分的核苷酸序列；b)與第二內源性基因組標靶基因座之第一區域一致的核苷酸序列；以及c)與第二內源性基因組標靶基因座之第二區域一致的核苷酸序列，其中與第二內源性基因組標靶基因座之第一及第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於在第二內源性基因組標靶基因座處同源重組。

【0084】 本文中亦提供一種用於有需要之個體之方法治療，其中治療包含投與治療上有效劑量之本文中描述之經修飾細胞中之任一者或細胞群中之任一者。在一些實施例中，經修飾細胞或細胞群衍生自個體。在一些實施例中，經修飾細胞或細胞群關於個體為同種異體的。

【0085】 本文亦提供一種用於基因修飾細胞之方法，方法包含以下步驟：1)提供包含單一聚核苷酸之核苷酸組合物，單一聚核苷酸包含：a)編碼基因之至少一部分的核苷酸序列；b)與內源性基因組標靶基因座之第一區域一致的核苷酸序列；以及c)與內源性基因組標靶基因座之第二區域一致的核苷酸序列，與內源性基因組標靶基因座之第一及第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於在內源性基因組標靶基因座處同源重組，編碼基因之至少一部分的核苷酸序列之取向可以使得基因之至少一部分能夠在將組合物整合至內源性基因組標靶基因座中之後經表現；以及2)提供能夠在內源性基因組標靶基因座內裂解限定核苷酸序列之核酸酶組合物；3)使細胞與核苷酸組合物及核酸酶組合物接觸；4)藉由除使細胞感染病毒以外之方法將核苷酸組合物及核酸酶組合物傳遞至細胞中。在一些實施例中，方法進一步包含提供能夠在細胞內裂解第二限定核苷酸序列之第二核酸酶組合物，其中第二核酸酶組合物在接觸步驟中與細胞接觸且在傳遞步驟中經傳遞至細胞中。在一些實施例中，裂解引起突變，該突變產生由第二限

定核苷酸序列編碼之非功能性基因。在一些實施例中，產生非功能性基因之突變包含選自由以下各者組成的群中之基因之編碼區中的突變：造成所轉譯蛋白質讀框變化的讀框轉移突變、導致胺基酸被終止密碼子取代之無意義突變及造成一個胺基酸被另一胺基酸取代的誤義突變。在一些實施例中，產生非功能性基因之突變包含選自由以下各者組成的群中之基因的非編碼區中之突變：改變由基因編碼之mRNA產物之表現的突變及改變由基因編碼之mRNA產物之穩定性的突變。在一些實施例中，方法進一步包含：提供第二核苷酸組合物，第二組合物包含：a)編碼第二基因之至少一部分的核苷酸序列；b)與第二內源性基因組標靶基因座之第一區域一致的核苷酸序列；以及c)與第二內源性基因組標靶基因座之第二區域一致的核苷酸序列，其中所有核苷酸序列在單一聚核苷酸上，與第二內源性基因組標靶基因座之第一及第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於在第二內源性基因組標靶基因座處同源重組，編碼基因之至少一部分的核苷酸序列之取向可以使得第二基因之至少一部分能夠在將組合物整合至第二內源性基因組標靶基因座中之後經表現，且第二核苷酸組合物在接觸步驟中與細胞接觸且在傳遞步驟中經傳遞至細胞中。

**【0086】** 在一些實施例中，核酸酶組合物包含選自由以下各者組成的群中之核酸酶：成簇規律間隔短回文重複序列(CRISPR)家族核酸酶、類轉錄活化因子效應子核酸酶(TALEN)或其衍生物、鋅指核酸酶(ZFN)或其衍生物及復位核酸內切酶(HE)或其衍生物。在一些實施例中，CRISPR家族核酸酶為Cas9核酸酶。在一些實施例中，核酸酶組合物包含預成蛋白質複合物。在一些實施例中，核酸酶組合物包含能夠在細胞內表現核酸酶之核苷酸載體。在一些實施例中，在使細胞與核苷酸組合物及核酸酶組合

物接觸與傳遞步驟之間，接觸步驟小於60分鐘、小於45分鐘、小於30分鐘、小於20分鐘、小於15分鐘、小於10分鐘、小於5分鐘、或小於1分鐘。

【0087】 在一些實施例中，傳遞步驟選自由以下各者組成之群：電穿孔法、轉染、藉由物理方法之細胞膜變形、脂質奈米顆粒(lipid nanoparticles；LNP)、病毒類顆粒(virus like particles；VLP)及音波處理。在一些實施例中，傳遞步驟包含電穿孔法。在一些實施例中，經編碼多肽序列之表現係藉由內源性基因組標靶基因座內之內源性啟動子定向。在一些實施例中，經編碼多肽序列之表現係藉由外源性啟動子定向。在一些實施例中，外源性啟動子選自由以下各者組成之群：哺乳動物啟動子、人類啟動子、病毒啟動子、來自逆轉錄病毒或慢病毒之長末端重複序列(LTR)衍生啟動子、兩個啟動子之融合體、啟動子之兩個部分之融合體、MMLV LTR啟動子、HIV LTR啟動子、MCMV LTR啟動子、EF1a、MND、CMV、SV40、PGK1、Ubc、 $\beta$ -肌動蛋白、CAG、小分子誘導性啟動子、四環素誘導性啟動子、小分子條件性啟動子、Cre-LoxP條件性啟動子系統、Flp-FRT條件性啟動子系統及他莫昔芬條件性啟動子系統。

【0088】 在一些實施例中，基因之至少一部分長度大於或等於100個鹼基。在一些實施例中，基因之至少一部分長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於400個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於800個鹼基、長度大於或等於1500個鹼基、長度大於或等於2000個鹼基、或長度大於或等於4000個鹼基。

【0089】 在一些實施例中，與內源性基因組標靶基因座之第一區域或第二區域一致的核苷酸序列長度為50個鹼基、長度為100個鹼基、長度

為200個鹼基、長度為400個鹼基、長度為600個鹼基、長度為800個鹼基、長度為1500個鹼基、長度為2000個鹼基或長度為4000個鹼基。

【0090】 在一些實施例中，限定核苷酸序列在整合之後斷裂。

【0091】 在一些實施例中，以可操作方式與內源性基因組標靶基因座相聯之內源性基因之表現斷裂。

【0092】 在一些實施例中，方法進一步包含能夠增大同源重組速率或生存力之額外反應劑。

【0093】 在一些實施例中，單一聚核苷酸選自由以下各者組成之群：環狀質體、線性DNA片段、小環及ssDNA。在一些實施例中，環狀質體具有小於500個鹼基之載體主鏈，其中載體主鏈包含一種核苷酸序列，該核苷酸序列不為編碼基因之至少一部分的核苷酸序列、與第一內源性基因組標靶基因座一致的核苷酸序列，亦非與第二內源性基因組標靶基因座一致的核苷酸序列。在一些實施例中，單一聚核苷酸不為聚合酶鏈反應(PCR)擴大之聚核苷酸。在一些實施例中，單一聚核苷酸實質上不含污染物。在一些實施例中，單一聚核苷酸實質上不含減小細胞生存力之組分。

【0094】 在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座包含編碼區。在一些實施例中，其中內源性基因組標靶包含內含子。

【0095】 在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座為T細胞受體(TCR)- $\alpha$ 基因座。在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座為TCR- $\beta$ 基因座。在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座為免疫檢查點基因座。在一些實施例中，免疫檢查點基因座選自由以下各者組成之群：PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM3、LAG3及VISTA。

【0096】 在一些實施例中，基因之至少一部分包含連接子序列。在一些實施例中，連接子序列編碼可裂解連接子多肽序列，其中在表現之後，可裂解連接子多肽經裂解使得產生僅經基因之至少一部分編碼的多肽。在一些實施例中，可裂解連接子多肽序列包含選自由以下各者組成的群中之2A核糖體跳躍元素：T2A、E2A、P2A及F2A。

【0097】 在一些實施例中，可裂解連接子多肽序列包含弗林裂解位點序列。在一些實施例中，連接子序列包含內部核糖體入口位點(IRES)。在一些實施例中，連接子序列包含外源性啟動子。在一些實施例中，連接子序列進一步包含剪接受體序列。

【0098】 在一些實施例中，基因之至少一部分編碼編碼區。在一些實施例中，編碼區選自由以下各者組成之群：調變免疫系統之因子、細胞介素、調變T細胞功能之因子、提高T細胞存活之因子、提昇T細胞功能之因子及免疫檢查點抑制劑。

【0099】 在一些實施例中，基因之至少一部分編碼非編碼區。在一些實施例中，非編碼區選自由以下各者組成之群：shRNA、siRNA、miRNA、調變免疫系統之因子、細胞介素、調變T細胞功能之因子、提高T細胞存活之因子及提昇T細胞功能之因子。

【0100】 在一些實施例中，基因之至少一部分包含TCR基因之至少一部分。在一些實施例中，TCR基因之至少一部分選自由以下各者組成之群：鼠化TCR、人類化TCR、結構域調換TCR、點突變TCR、具有能夠形成二硫鍵聯之經工程改造半胱氨酸的經工程改造TCR、經優化用於表現於人體內之密碼子優化TCR、優化密碼子使用度及移除RNA不穩定性元素之序列優化TCR、TCR基因之可變區序列、嵌合抗原受體(CAR)及單鏈

TCR之至少一部分。在一些實施例中，TCR基因之至少一部分包含：a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；以及c)編碼第二連接子序列之核苷酸序列。在一些實施例中，TCR- $\alpha$ 多肽序列選自由以下各者組成之群：鼠化TCR- $\alpha$ 、人類化TCR- $\alpha$ 、結構域調換TCR- $\alpha$ 、點突變TCR- $\alpha$ 、具有能夠形成二硫鍵聯之經工程改造半胱胺酸的經工程改造TCR- $\alpha$ 、優化人體內表現之密碼子優化TCR- $\alpha$ 、嵌合抗原受體(CAR)及優化密碼子使用度及移除RNA不穩定性元素之序列優化TCR- $\alpha$ 。在一些實施例中，TCR- $\beta$ 多肽序列選自由以下各者組成之群：鼠化TCR- $\beta$ 、人類化TCR- $\beta$ 、結構域調換TCR- $\beta$ 、點突變TCR- $\beta$ 、具有能夠形成二硫鍵聯之經工程改造半胱胺酸之經工程改造TCR- $\beta$ 、優化人體內表現之密碼子優化TCR- $\beta$ 、嵌合抗原受體(CAR)及優化密碼子使用度及移除RNA不穩定性元素之序列優化TCR- $\beta$ 。在一些實施例中，經編碼多肽序列之方向為連接子:TCR- $\alpha$ :第二連接子:TCR- $\beta$ 。在一些實施例中，經編碼多肽序列之方向為連接子:TCR- $\beta$ :第二連接子:TCR- $\alpha$ 。在一些實施例中，第二連接子序列包含可裂解連接子多肽序列。在一些實施例中，可裂解連接子多肽序列包含選自由以下各者組成的群中之2A核糖體跳躍元素：T2A、E2A、P2A及F2A。在一些實施例中，可裂解連接子多肽序列包含弗林裂解位點序列。在一些實施例中，第二連接子序列包含內部核糖體入口位點(IRES)。在一些實施例中，第二連接子序列包含外源性啟動子。

**【0101】** 在一些實施例中，基因之至少一部分選自由以下各者組成之群：shRNA、siRNA、miRNA、調變免疫系統之因子、細胞介素、調變T細胞功能之因子、提供T細胞存活之因子、增強T細胞功能之因子及免疫檢查點抑制劑。

【0102】 在一些實施例中，第二基因之至少一部分包含TCR基因之至少一部分。

【0103】 在一些實施例中，經修飾細胞包含免疫細胞。在一些實施例中，免疫細胞包含T細胞。在一些實施例中，T細胞群選自由以下各者組成之群：細胞毒素T淋巴球(CTL)、CD8<sup>+</sup> T細胞、CD4<sup>+</sup> T細胞、初代T細胞、腫瘤浸潤性T細胞、經工程改造T細胞、調節T細胞(Treg)、輔助T細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞、 $\alpha$ - $\beta$  T細胞及 $\gamma$ - $\delta$  T細胞。在一些實施例中，其中免疫細胞包含天然殺手細胞。在一些實施例中，免疫細胞選自由以下各者組成之群：B細胞、單核球、巨噬細胞、樹突狀細胞及天然殺手T細胞。

【0104】 在一些實施例中，經修飾細胞包含幹細胞。在一些實施例中，幹細胞包含造血幹細胞。在一些實施例中，幹細胞包含胚胎幹細胞。

【0105】 在一些實施例中，經修飾細胞為初代細胞。

【0106】 在一些實施例中，經修飾細胞為經分離細胞，其中經分離細胞與個體分離。在一些實施例中，個體已知或懷疑患有癌症。

【0107】 在一些實施例中，經修飾細胞包含人類細胞或人類衍生細胞。

【0108】 在一些實施例中，經修飾細胞為活體外培養細胞。在一些實施例中，活體外培養細胞包含受刺激細胞。在一些實施例中，受刺激細胞包含受細胞介素刺激T細胞，視需要其中受細胞介素刺激T細胞包含受CD3刺激T細胞、受CD28刺激T細胞或受CD3及CD28刺激T細胞。在一些實施例中，受細胞介素刺激T細胞係在存在IL7、IL15或其組合的情況下培養。在一些實施例中，受細胞介素刺激T細胞係在存在IL2的情況下培

養。在一些實施例中，受細胞介素刺激T細胞係在實質上不含IL2之培養基中培養。

**【0109】** 在一些實施例中，經修飾細胞不含整合式病毒，其中整合式病毒以可操作方式與病毒介導的傳遞組分相聯。在一些實施例中，經修飾細胞之表面上之MHC I類不含衍生自病毒介導的傳遞組分或整合式病毒之肽，其中整合式病毒以可操作方式與病毒介導的傳遞組分相聯。

**【0110】** 本文中亦提供一種藉由本文所描述之方法中之任一者產生的經修飾細胞，其中經修飾細胞包含整合式核苷酸序列，其中整合式核苷酸序列包含與編碼基因之至少一部分之核苷酸序列一致的序列，整合式核苷酸序列整合於內源性基因組標靶基因座處，且整合式核苷酸序列之取向可以使得基因之至少一部分能夠經表現。

**【0111】** 一種藉由本文所描述之方法中之任一者產生的細胞群，其中群體中之大於10%、大於20%、大於30%、大於40%、大於50%、大於60%、或大於70%之細胞包含整合式核苷酸序列，其中整合式核苷酸序列包含與編碼基因之至少一部分之核苷酸序列一致的序列，整合式核苷酸序列整合於內源性基因組標靶基因座處，且整合式核苷酸序列之取向可以使得基因之至少一部分能夠經表現。

**【0112】** 在一些實施例中，細胞在整合式核苷酸序列之整合之後尚未進行分類、選拔或分離。在一些實施例中，傳遞步驟之後之細胞群的生存力為至少10%、至少20%、至少40%、至少60%或至少80%。在一些實施例中，在傳遞步驟後，存活期經評估為4日。在一些實施例中，存活期係藉由AOPI染色評估。

**【0113】** 本文中亦提供一種用於有需要之個體之方法治療，其中治

療包含投與治療有效劑量之藉由本文所描述之方法中之任一者產生的細胞或細胞群中之任一者。在一些實施例中，細胞或細胞群衍生自個體。在一些實施例中，細胞或細胞群關於個體為同種異體的。

**【0114】** 本文中亦提供一種用於基因修飾細胞之方法，方法包含以下步驟：1)提供核苷酸組合物，其包含：a)編碼基因之至少一部分的核苷酸序列；b)與內源性基因組標靶基因座之第一區域一致的核苷酸序列；以及c)與內源性基因組標靶基因座之第二區域一致的核苷酸序列，其中基因之至少一部分長度為100個鹼基，所有核苷酸序列在單一聚核苷酸上，與內源性基因組標靶基因座之第一及第二區域一致之核苷酸序列之取向可以便於在內源性基因組標靶基因座處同源重組，編碼基因之至少一部分的核苷酸序列之取向可以使得基因之至少一部分能夠在將組合物整合至內源性基因組標靶基因座中之後經表現；及2)提供能夠在內源性基因組標靶基因座內裂解限定核苷酸序列之CRISPR/Cas9核酸酶組合物；3)使T細胞與核苷酸組合物及CRISPR/Cas9核酸酶組合物接觸；以及4)藉由電穿孔法將核苷酸組合物及CRISPR/Cas9核酸酶組合物傳遞至T細胞中。

**【0115】** 本文亦提供一種產生具有限定T細胞受體之修飾的T細胞之方法，方法包含以下步驟：1)提供核苷酸組合物，其包含：a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之至少一部分的核苷酸序列；b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之至少一部分的核苷酸序列；c)編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列；d)編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列；e)與內源性TCR基因座之第一區域一致的核苷酸序列；以及f)與內源性TCR基因座之第二區域一致的核苷酸序列，其中所有核苷酸序列在單一聚核苷酸上，與內源性TCR基因座之第一及第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於在內源性TCR基因座處同源重

組，編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之至少一部分的核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之至少一部分的核苷酸序列及編碼第一及第二連接子多肽序列之核苷酸序列之取向可以使得多肽序列中之每一者能夠在將組合物整合至內源性TCR基因座中之後經表現為單一多肽，將第一連接子多肽序列安置在TCR- $\alpha$ 多肽序列之至少一部分、TCR- $\beta$ 多肽序列之至少一部分及第二連接子多肽序列之前，將第二連接子多肽序列安置於TCR- $\alpha$ 多肽序列與TCR- $\beta$ 多肽序列之間，及TCR- $\alpha$ 多肽序列及TCR- $\beta$ 多肽序列各自形成單獨多肽，其中單獨多肽能夠締合在一起以形成功能性TCR；2)提供能夠在內源性TCR基因座內裂解限定核苷酸序列之核酸酶組合物；3)使T細胞與核苷酸組合物及核酸酶組合物接觸；以及4)將核苷酸組合物及核酸酶組合物傳遞至T細胞中。

**【0116】** 在一些實施例中，方法進一步包含提供能夠在T細胞內裂解第二限定核苷酸序列之第二核酸酶組合物，其中第二核酸酶組合物在接觸步驟中與細胞接觸且在傳遞步驟中經傳遞至細胞中。在一些實施例中，裂解引起突變，該突變產生由第二限定核苷酸序列編碼之非功能性基因。在一些實施例中，產生非功能性基因之突變包含選自由以下各者組成的群中之基因之編碼區中的突變：造成所轉譯蛋白質讀框變化的讀框轉移突變、導致胺基酸被終止密碼子取代之無意義突變及造成一個胺基酸被另一胺基酸取代的誤義突變。在一些實施例中，產生非功能性基因之突變包含選自由以下各者組成的群中之基因的非編碼區中之突變：改變由基因編碼之mRNA產物之表現的突變及改變由基因編碼之mRNA產物之穩定性的突變。

**【0117】** 在一些實施例中，方法進一步包含：提供第二核苷酸組合

物，第二組合物包含：a)編碼基因之至少一部分的核苷酸序列；b)與內源性基因組標靶基因座之第一區域一致的核苷酸序列；以及c)與內源性基因組標靶基因座之第二區域一致的核苷酸序列，其中所有核苷酸序列在單一聚核苷酸上，與內源性基因組標靶基因座之第一及第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於在內源性基因組標靶基因座處同源重組，編碼基因之至少一部分的核苷酸序列之取向可以使得基因之至少一部分能夠在將組合物整合至內源性基因組標靶基因座中之後經表現，以及第二核苷酸組合物在接觸步驟中與T細胞接觸且在傳遞步驟中經傳遞至T細胞中。

**【0118】** 在一些實施例中，核酸酶組合物包含選自由以下各者組成的群中之核酸酶：成簇規律間隔短回文重複序列(CRISPR)家族核酸酶、類轉錄活化因子效應子核酸酶(TALEN)或其衍生物、鋅指核酸酶(ZFN)或其衍生物及復位核酸內切酶(HE)或其衍生物。在一些實施例中，CRISPR家族核酸酶為Cas9核酸酶。在一些實施例中，核酸酶組合物包含預成蛋白質複合物。在一些實施例中，核酸酶組合物包含能夠在T細胞內表現核酸酶之核苷酸載體。在一些實施例中，在使T細胞與核苷酸組合物及核酸酶組合物接觸與傳遞步驟之間，接觸步驟小於60分鐘、小於45分鐘、小於30分鐘、小於20分鐘、小於15分鐘、小於10分鐘、或小於5分鐘。

**【0119】** 在一些實施例中，傳遞步驟選自由以下各者組成之群：電穿孔法、轉染、藉由物理方法之細胞膜變形、脂質奈米顆粒(LNP)、病毒類顆粒(VLP)及音波處理。在一些實施例中，傳遞步驟包含電穿孔法。

**【0120】** 在一些實施例中，經編碼多肽序列之表現係藉由內源性基因組標靶基因座內之內源性啟動子定向。在一些實施例中，經編碼多肽序列之表現係藉由外源性啟動子定向。在一些實施例中，外源性啟動子選自

由以下各者組成之群：哺乳動物啟動子、人類啟動子、病毒啟動子、來自逆轉錄病毒或慢病毒之長末端重複序列(LTR)衍生啟動子、兩個啟動子之融合體、啟動子之兩個部分之融合體、MMLV LTR啟動子、HIV LTR啟動子、MCMV LTR啟動子、EF1a、MND、CMV、SV40、PGK1、Ubc、 $\beta$ -肌動蛋白、CAG、小分子誘導性啟動子、四環素誘導性啟動子、小分子條件性啟動子、Cre-LoxP條件性啟動子系統、Flp-FRT條件性啟動子系統及他莫昔芬條件性啟動子系統。

【0121】 在一些實施例中，編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之至少一部分的核苷酸序列或編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之至少一部分的核苷酸序列長度大於或等於100個鹼基。在一些實施例中，編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之至少一部分的核苷酸序列或編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之至少一部分的核苷酸序列長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於400個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於800個鹼基、長度大於或等於1500個鹼基、長度大於或等於2000個鹼基、或長度大於或等於4000個鹼基。

【0122】 在一些實施例中，與內源性TCR基因座之第一區域或第二區域一致的核苷酸序列長度為50個鹼基、長度為100個鹼基、長度為200個鹼基、長度為400個鹼基、長度為600個鹼基、長度為800個鹼基、長度為1500個鹼基、長度為2000個鹼基或長度為4000個鹼基。

【0123】 在一些實施例中，限定核苷酸序列在整合之後斷裂。

【0124】 在一些實施例中，以可操作方式與內源性TCR基因座相聯之內源性基因之表現斷裂。

【0125】 在一些實施例中，方法進一步包含能夠增大同源重組速率或生存力之額外反應劑。

【0126】 在一些實施例中，單一聚核苷酸選自由以下各者組成之群：環狀質體、線性DNA片段、小環及ssDNA。在一些實施例中，環狀質體具有小於500個鹼基之載體主鏈，其中載體主鏈為一種核苷酸序列，該核苷酸序列不為編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之至少一部分的核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之至少一部分的核苷酸序列，亦非編碼第一及第二連接子多肽序列之核苷酸序列。在一些實施例中，單一聚核苷酸不為聚合酶鏈反應(PCR)擴大之聚核苷酸。在一些實施例中，單一聚核苷酸實質上不含雜質。

【0127】 在一些實施例中，內源性TCR基因座包含編碼區。在一些實施例中，內源性TCR基因座包含內含子。

【0128】 在一些實施例中，內源性TCR基因座包含TCR- $\alpha$ 基因座。在一些實施例中，內源性TCR基因座包含TCR- $\beta$ 基因座。

【0129】 在一些實施例中，第一連接子序列包含可裂解連接子多肽序列，其中在表現之後，可裂解連接子多肽經裂解使得產生僅藉由編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之至少一部分、TCR- $\beta$ 多肽序列之至少一部分及第二連接子多肽序列所編碼的多肽。在一些實施例中，可裂解連接子多肽序列包含選自由以下各者組成的群中之2A核糖體跳躍元素：T2A、E2A、P2A及F2A。在一些實施例中，可裂解連接子多肽序列包含弗林裂解位點序列。在一些實施例中，第一連接子多肽序列包含IRES。在一些實施例中，第一連接子序列包含剪接受體序列。

【0130】 在一些實施例中，第二連接子序列包含可裂解連接子多肽序列，其中在表現之後，可裂解連接子多肽經裂解使得TCR- $\alpha$ 多肽序列及TCR- $\beta$ 多肽序列各自形成單獨多肽，其中單獨多肽能夠締合在一起以形成

功能性TCR。在一些實施例中，可裂解連接子多肽序列包含選自由以下各者組成的群中之2A核糖體跳躍元素：T2A、E2A、P2A及F2A。在一些實施例中，可裂解連接子多肽序列包含弗林裂解位點序列。

【0131】 在一些實施例中，第二連接子序列包含內部核糖體入口位點(IRES)。在一些實施例中，第二連接子序列包含外源性啟動子。

【0132】 在一些實施例中，TCR- $\alpha$ 多肽序列選自由以下各者組成之群：鼠化TCR- $\alpha$ 、人類化TCR- $\alpha$ 、結構域調換TCR- $\alpha$ 、點突變TCR- $\alpha$ 、具有能夠形成二硫鍵聯之經工程改造半胱氨酸的經工程改造TCR- $\alpha$ 、優化人體內表現之密碼子優化TCR- $\alpha$ 、嵌合抗原受體(CAR)及優化密碼子使用度及移除RNA不穩定性元素之序列優化TCR- $\alpha$ 。

【0133】 在一些實施例中，TCR- $\beta$ 多肽序列選自由以下各者組成之群：鼠化TCR- $\beta$ 、人類化TCR- $\beta$ 、結構域調換TCR- $\beta$ 、點突變TCR- $\beta$ 、具有能夠形成二硫鍵聯之經工程改造半胱氨酸之經工程改造TCR- $\beta$ 、優化人體內表現之密碼子優化TCR- $\beta$ 、嵌合抗原受體(CAR)及優化密碼子使用度及移除RNA不穩定性元素之序列優化TCR- $\beta$ 。

【0134】 在一些實施例中，經編碼多肽序列之方向為第一連接子:TCR- $\alpha$ :第二連接子:TCR- $\beta$ 。在一些實施例中，經編碼多肽序列之方向為連接子:TCR- $\beta$ :第二連接子:TCR- $\alpha$ 。

【0135】 在一些實施例中，若限定核苷酸序列在內源性TCR- $\alpha$ 基因座內，則第二限定核苷酸序列在內源性TCR- $\beta$ 基因座內。

【0136】 在一些實施例中，若限定核苷酸序列在內源性TCR- $\beta$ 基因座內，則第二限定核苷酸序列在內源性TCR- $\alpha$ 基因座內。在一些實施例中，第二限定核苷酸序列在免疫檢查點基因座內。在一些實施例中，基因

之至少一部分選自由以下各者組成之群：shRNA、siRNA、miRNA、細胞介素、提供T細胞存活之因子、提昇T細胞功能之因子及免疫檢查點抑制劑。

【0137】本文中亦提供一種用於導引內源性基因組標靶基因座處之同源重組之核苷酸組合物，其包含環狀聚核苷酸，該環狀聚核苷酸包含：  
a)編碼基因之至少一部分的核苷酸序列；b)與內源性基因組標靶基因座之第一區域一致的核苷酸序列；以及c)與內源性基因組標靶基因座之第二區域一致的核苷酸序列，其中所有核苷酸序列在單一聚核苷酸上，與內源性基因組標靶基因座之第一及第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於在內源性基因組標靶基因座處同源重組，編碼基因之至少一部分的核苷酸序列之取向可以使得基因之至少一部分能夠在將組合物整合至內源性基因組標靶基因座中之後經表現。在一些實施例中，編碼基因之至少一部分的核苷酸序列長度大於或等於100個鹼基。在一些實施例中，編碼基因之至少一部分的核苷酸序列長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於400個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於800個鹼基、長度大於或等於1500個鹼基、長度大於或等於2000個鹼基、或長度大於或等於4000個鹼基。

【0138】在一些實施例中，與內源性基因組標靶基因座之第一區域一致的核苷酸序列長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於100個鹼基、長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於300個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基、或長度大於或等於2000個鹼基。

【0139】在一些實施例中，與內源性基因組標靶基因座之第二區域

一致的核苷酸序列長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於100個鹼基、長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於300個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基、或長度大於或等於2000個鹼基。

【0140】 在一些實施例中，與內源性基因組標靶基因座之第一區域一致的核苷酸序列及與內源性基因組標靶基因座之第二區域一致的核苷酸序列各自長度大於或等於600個鹼基。

【0141】 在一些實施例中，環狀聚核苷酸包含質體或奈米質體。在一些實施例中，質體具有小於500個鹼基之載體主鏈，且其中載體主鏈為一種核苷酸序列，該核苷酸序列不為編碼基因之至少一部分的核苷酸序列且不為與第一內源性標靶基因組基因座一致之核苷酸序列。

【0142】 在一些實施例中，環狀聚核苷酸不為聚合酶鏈反應(PCR)擴大之聚核苷酸。

【0143】 在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座包含編碼區。在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座包含內含子。

【0144】 在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座或內源性TCR基因座包含T細胞受體(TCR)- $\alpha$ 基因座。在一些實施例中，內源性基因組標靶基因座或內源性TCR基因座包含TCR- $\beta$ 基因座。

【0145】 在一些實施例中，內源性基因組標靶包含免疫檢查點基因座。在一些實施例中，免疫檢查點基因座選自由以下各者組成之群：PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM3、LAG3及VISTA。

【0146】 在一些實施例中，基因之至少一部分包含連接子序列。在一些實施例中，連接子序列編碼可裂解連接子多肽序列，其中在表現之

後，可裂解連接子多肽經裂解使得產生僅經基因之至少一部分編碼的多肽。在一些實施例中，可裂解連接子多肽中之任一者包含弗林裂解位點。在一些實施例中，連接子序列中之任一者包含選自由以下各者組成的群中之2A核糖體跳躍元素：T2A、E2A、P2A及F2A。在一些實施例中，可裂解連接子多肽中之任一者包含Gly-Ser-Gly連接子，視需要其中Gly-Ser-Gly連接子為2A核糖體跳躍元素之N端，且視需要其中Gly-Ser-Gly連接子自N端至C端之方向為弗林裂解位點：Gly-Ser-Gly連接子：2A核糖體跳躍元素。在一些實施例中，連接子序列、編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列或編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列包含內部核糖體入口位點(IRES)。在一些實施例中，連接子序列、編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列或編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列包含外源性啟動子。

【0147】 在一些實施例中，編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列或編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列包含剪接受體序列。

【0148】 在一些實施例中，基因之至少一部分包含編碼信號肽之核苷酸序列，其中信號肽以操作方式連接至由基因之至少一部分、TCR- $\alpha$ 多肽序列、TCR- $\beta$ 多肽序列編碼的多肽或由TCR基因之至少一部分編碼的多肽。在一些實施例中，信號肽為外源性信號肽，視需要其中外源性信號肽為人類生長激素信號肽。

【0149】 在一些實施例中，第一連接子多肽序列及第二連接子多肽序列包含相同連接子多肽序列。在一些實施例中，編碼相同連接子多肽序列之編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列及編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列包含密碼子編碼分歧核苷酸序列，且其中編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列及編碼第二連接子多肽之核苷酸序列具有彼此相對編碼

分歧之密碼子。

**【0150】** 在一些實施例中，基因之至少一部分編碼編碼區。在一些實施例中，編碼區選自由以下各者組成之群：調變免疫系統之因子、細胞介素、調變T細胞功能之因子、提高T細胞存活之因子、提昇T細胞功能之因子及免疫檢查點抑制劑。

**【0151】** 在一些實施例中，基因之至少一部分編碼非編碼區。在一些實施例中，非編碼區選自由以下各者組成之群：shRNA、siRNA、miRNA、調變免疫系統之因子、細胞介素、調變T細胞功能之因子、提高T細胞存活之因子及提昇T細胞功能之因子。

**【0152】** 在一些實施例中，基因之至少一部分包含TCR基因之至少一部分。在一些實施例中，TCR基因之至少一部分包含：a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；以及c)編碼第二連接子序列之核苷酸序列。

**【0153】** 在一些實施例中，編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列或TCR基因之至少一部分選自由以下各者組成之群：鼠化TCR、人類化TCR、結構域調換TCR、點突變TCR、具有能夠形成二硫鍵聯之經工程改造半胱胺酸的經工程改造TCR、優化人體內表現之密碼子優化TCR、優化密碼子使用度且移除RNA不穩定性元素之序列優化TCR、TCR基因之可變區序列、嵌合抗原受體(CAR)及單鏈TCR之至少一部分。

**【0154】** 在一些實施例中，TCR- $\alpha$ 多肽序列、TCR- $\beta$ 多肽序列或由TCR基因之至少一部分編碼的多肽經工程改造以展現相對於內源性TCR多肽序列之與第二外源性TCR多肽序列之更大相聯性，視需要其中TCR- $\alpha$

多肽序列及TCR- $\beta$ 多肽序列經工程改造以展現相對於內源性TCR多肽序列之彼此的更大相聯性。

【0155】 在一些實施例中，經編碼多肽序列在自N端至C端之方向為連接子:TCR- $\alpha$ :第二連接子:TCR- $\beta$ 。在一些實施例中，經編碼多肽序列在N端至C端之方向為連接子:TCR- $\beta$ :第二連接子:TCR- $\alpha$ 。

【0156】 在一些實施例中，基因之至少一部分、編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列或編碼TCR基因之至少一部分的核苷酸序列包含密碼子編碼分歧核苷酸序列，且其中密碼子編碼分歧核苷酸序列具有相對於內源性核苷酸序列編碼分歧之密碼子。

【圖式簡單說明】

【0157】 就以下描述及隨附圖式將更好地理解本發明之此等及其他特徵、態樣及優勢，其中：

【0158】 圖1展示呈現用於整合至TRAC基因座中之ZsGreen報導體的通用編輯策略之示意圖。通用TCR $\alpha$ 基因座靶向策略使用以環狀奈米質體編碼之同源修復模板，該同源修復模板含有側接1 kb左右同源臂(「HR臂」)且由P2A序列間隔開的無啟動子ZsGreen且截短LNGRF編碼序列以及將ZsGreen及LNGRF晶匣與TCR $\alpha$ 基因座序列分離之5'P2A序列。

【0159】 圖2呈現用於ZsGreen整合之通用編輯時間線。

【0160】 圖3展示使用整合至TRAC基因座中之ZsGreen報導體之T細胞的編輯效率。

【0161】 圖4呈現展示用於將新抗原特定TCR構築體(neoTCR)整合至TCR $\alpha$ 基因座中之通用靶向策略的示意圖。

【0162】 圖5說明用於將新抗原特定TCR構築體(neoTCR)整合至

TCR $\alpha$ 基因座中之新抗原特定TCR構築體設計。**圖5A**說明標靶TCR $\alpha$ 基因座(內源性TRAC，頂部面板)及其CRISPR Cas9標靶位點(水平條，由箭頭指示之裂解位點)，及具有編碼neoTCR之聚核苷酸的環狀質體HR模板(底部面板)，其在整合之前位於左同源性臂與右同源性臂(「LHA」及「RHA」，分別地)之間。**圖5B**說明TCR $\alpha$ 基因座中之整合式neoTCR (頂部面板)，轉錄及剪接neoTCR mRNA(中部面板)及經表現neoTCR之轉譯及處理(底部面板)。

**【0163】** **圖6**呈現用於編輯插入neoTCR構築體之T細胞之通用編輯時間線。

**【0164】** **圖7**展示用於證實將neoTCR構築體精確基因組整合至TCR $\alpha$ 基因座中之入-出(in-out)PCR技術(通用策略，頂部面板)及在瓊脂糖凝膠上觀測之PCR擴增產物(底部面板)。

**【0165】** **圖8**展示藉由流式細胞量測術之MART-1 neoTCR之表現。**圖8A**展示使用MART-1特定抗原決定基肽多聚體(dextramer)染色之MART-1 neoTCR之表現。**圖8B**展示第10天時使用MART-1特定抗原決定基肽多聚體染色之MART-1 neoTCR之編輯結果的總結。

**【0166】** **圖9**展示用於IFN $\gamma$ (左側圖)及IL-2(右側圖)之抗原特異性細胞介素產生檢定中之經工程改造T細胞的評估。

**【0167】** **圖10**展示抗原特異性增殖檢定(**圖10A**)及抗原特異性T細胞介導的殺滅檢定(**圖10B**)中之經工程改造T細胞之評估。

**【0168】** **圖11**展示使用慢病毒轉導程序產生之表現MART-1或NY-ESO neoTCR之經工程改造T細胞(**圖11**，頂部面板)或使用較小或較大格式之使用電穿孔法-介導的HR編輯產生之表現MART-1 neoTCR之經工程

改造T細胞(圖11，底部面板)。

【0169】 圖12展示抗原特異性T細胞介導的殺滅檢定中之經工程改造T細胞之評估。各組中自上而下之列：未藉由同源肽脈衝之非同源MHC HLA-A01；藉由10 $\mu$ M MART1脈衝之非同源MHC HLA-A01、未藉由同源肽脈衝之同源MHC HLA-A02；藉由10 $\mu$ M MART1脈衝之同源MHC HLA-A01；組成性表現MART-1同源抗原肽之HLA-A02標靶細胞。

【0170】 圖13展示使用由PCR產生的純化環狀質體DNA及線性dsDNA作為HR模板之相對HR介導的編輯效率。圖13A展示標準PCR產物(頂部)及半保護PCR產物(底部)。圖13B展示使用環狀質體、標準PCR產物及半保護PCR產物用於HR模板之編輯效率。

【0171】 圖14展示如藉由細胞數(左)或AOPI染色(右)評估之使用購買(「pUC57」)或內部純化(「內部pUC57」)之T細胞生存力。

【0172】 圖15展示如藉由Neo12特定抗原決定基肽多聚體染色檢測之Neo12 neoTCR之表現。

【0173】 圖16展示如藉由Neo12特定抗原決定基肽多聚體染色檢測之Neo12 neoTCR之表現。

【0174】 圖17展示如藉由特定抗原決定基肽多聚體染色檢測之neoTCR MART-1、Neo12及NY-ESO之表現。

【0175】 圖18展示將neoTCR整合至供體衍生T細胞中。圖18A展示如藉由特定抗原決定基肽多聚體染色檢測之健康供體或患者衍生之T細胞中neoTCR MART-1、Neo12及NY-ESO之編輯效率(如CD8+)。圖18B展示健康供體衍生T細胞中neoTCR neo12之編輯效率(如CD8+)。

【0176】 圖19展示如藉由並不結合pan-TCR抗體之CD3複合物之檢

測評估的CD4+及CD8+細胞之編輯效率。

【0177】 圖20展示整合式neoTCR及內源性TCR之表面表現量。圖20A展示用於使用相同抗體(CD3)染色之內源性TCR (左直方圖)及Neo12 neoTCR TCR (右直方圖)之MFI直方圖。圖20B展示相較於內源性TCR之neoTCR MART-1、Neo12及NY-ESO之表面表現量分析。\*TCR表現量/細胞係基於文獻。

【0178】 圖21展示如藉由Neo12特定抗原決定基肽多聚體染色使用來自新分離PBMC且使用Prodigy平台分離的T細胞之較大格式編輯評估之的Neo12 neoTCR之表現。

【0179】 圖22展示用於使用標靶細胞(HLA-A02表現K562細胞)抑或藉由肽脈衝以評估經編輯T細胞的通用策略。

【0180】 圖23展示用於使用經工程改造以表現預成於HLA複合物(pHLA)中之肽的標靶細胞(HLA-A02表現K562細胞)以評估經編輯T細胞的通用策略。

【0181】 圖24展示抗原特異性T細胞介導的殺滅檢定中之經工程改造T細胞之評估。相比於表現標靶新抗原之活體內腫瘤，\*經脈衝肽僅短暫呈現於活體外標靶細胞上。

【0182】 圖25展示抗原特異性增殖檢定中之經工程改造T細胞之評估。圖25A展示藉由圖25B中計算之分裂細胞%展現增殖之代表性直方圖曲線。

【0183】 圖26展示用於細胞介素細胞介素IFN $\gamma$  (圖26A)、IL-2 (圖26B)、TNF $\alpha$  (圖26C)及IL-6 (圖26D)之抗原特異性細胞介素產生檢定中之經工程改造T細胞之評估。

【0184】 圖27展示使用供體衍生T細胞之經編輯T細胞之評估。圖27A展示衍生自健康供體及患者供體之T細胞之編輯效率。圖27B展示用於衍生自健康供體及患者供體之T細胞的抗原特異性T細胞介導的殺滅檢定。圖27C展示用於衍生自健康供體及患者供體之T細胞的抗原特異性增殖檢定。圖27D展示用於衍生自健康供體及患者供體之抗原特異性細胞介素產生檢定。

【0185】 圖28展示使用供體衍生T細胞之經編輯T細胞之評估。圖28A展示表現Neo12 neoTCR或MART-1 neoTCR之供體T細胞之編輯效率。圖28B展示用於表現Neo12 neoTCR或MART-1 neoTCR之供體T細胞的抗原特異性T細胞介導的殺滅檢定。圖28C展示用於表現Neo12 neoTCR或MART-1 neoTCR之供體T細胞的抗原特異性增殖檢定。

【0186】 圖29展示在以類似效率製造後第14天(左側圖)及第2個月(右側圖)之用於表現Neo12 neoTCR或MART-1 neoTCR之供體T細胞的抗原特異性T細胞介導的殺滅檢定。

【0187】 圖30展示用於表現Neo12 neoTCR (圖30A)或MART-1 neoTCR (圖30B)之經編輯T細胞之Isoplexis分析。圖30C展示經工程改造T細胞對於細胞介素反應(左側圖)及產生各細胞介素之T細胞百分比(右側圖)之貢獻。

【0188】 圖31展示用於所使用HSC編輯之通用工作流程。

【0189】 圖32展示用於證實將neo12 neoTCR構築體精確基因組整合至HSC之TCR $\alpha$ 基因座中之瓊脂糖凝膠上觀測之入-出PCR技術PCR擴增產物。

【0190】 圖33展示根據整合至NK細胞之TCR $\alpha$ 基因座中之ZsGreen

報導體的展現第11天之ZsGreen表現的代表性曲線。

【0191】 圖34展示用於證實將ZsGreen報導體精確基因組整合至NK細胞之TCR $\alpha$ 基因座中之瓊脂糖凝膠上觀測之入-出PCR技術PCR擴增產物。

#### 【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0192】 本申請案主張2017年10月30日申請的美國臨時申請案第62/579,113號及2017年10月30日申請的美國臨時申請案第62/579,114號之益處，出於所有目的其中之每一者在此以全文引用之方式併入。

#### 序列表

【0193】 本申請案含有序列表，其已經由EFS-Web提交且以全文引用的方式併入本文中。在20XX年XX月創建之該ASCII複本命名為XXXXXUS\_sequencelisting.txt，且大小為X,XXX,XXX位元組。

#### 定義

【0194】 如本文中所使用，「抗原」包括任何包括患者特異性新抗原之抗原。抗原包括可誘導免疫反應中任何物質。

【0195】 如本文中所使用，「抗原特異性T細胞」指代彼此藉由其T細胞受體(TCR)所區別之細胞，該T細胞受體為其給予其抗原特異性。

【0196】 如本文中所使用，「抗原複合體」、「抗原-MHC」、「抗原-MHC複合體」、「重組抗原-MHC複合體」、「肽MHC」、「p/MHC」及「pHLA」經互換使用以指代於抗原結合槽中具有肽之重組主要組織相容複合體。如本文中所使用，術語MHC包括(但不限於)稱為人類白血球抗原(HLA)之人類MHC。

【0197】術語「有效量」或「治療有效量」指代有效改善疾病之症狀的量，例如有效抑制腫瘤之生長的量。

【0198】術語「改善」指代疾病病況治療中之任何治療有益結果，例如癌症疾病病況，包括其預防、嚴重程度或進展之減輕、緩解或治癒。

【0199】術語「原位」指代與活有機體分離生長(例如在組織培養物中生長)之活細胞中出現的過程。

【0200】術語「活體內」指代活有機體中出現之過程。

【0201】如本文中所使用，術語「哺乳動物」包括人類及非人類兩者，且包括(但不限於)人類、非人類靈長類、犬科、貓科、鼠科、牛科、馬科以及豬科動物。

【0202】如本文中所使用，在兩個或更多個核酸或多肽序列之上下文中，當出於最大對應性之比較及比對時，術語百分比「一致性」指代具有指定百分比之相同核苷酸或胺基酸殘基的兩個或更多個序列或子序列，如使用下文所描述之序列比較算法(例如BLASTP及BLASTN或熟習此項技術者可用之其他算法)中之一者或藉由目視檢查所量測。取決於應用，百分比「一致性」可存在於進行比較之序列的區域內，例如於功能域內，或替代地，存在於待比較之兩個序列之全部長度內。

【0203】對於序列比較，通常一個序列充當與測試序列進行比較之參考序列。當使用序列比較演算法時，將測試及參考序列輸入電腦，必要時指定子序列座標，且指定序列算法程式參數。接著，序列比較演算法基於所指定之程式參數來計算測試序列相對於參考序列之序列一致性百分比。

【0204】可藉由以下進行用於比較之序列之最佳比對：例如藉由

Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)之局部同源演算法，藉由Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)之同源比對演算法，藉由Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)之用於相似性方法之檢索，藉由此等演算法之電腦化實施(GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)，或藉由目視檢查(通常參見Ausubel等人)。

【0205】適用於確定序列一致性百分比及序列相似性之算法的一個實例為BLAST算法，該算法描述於Altschul等人, J. Mol. Biol. 215:403至410 (1990)中。用於執行BLAST分析之軟體可經由國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information)([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/))公開獲得。

【0206】「保守性取代」或「保守性胺基酸取代」指代胺基酸於化學上或功能上藉由類似胺基酸之取代。提供類似胺基酸之保守性取代表為此項技術中所熟知。藉助於實例，在一些實施例中，將提供於表1至表4中之胺基酸的群組視為對彼此之保守性取代。

【0207】表1.於某些實施例中視為對彼此之保守性取代的胺基酸之所選群組。

|            |           |
|------------|-----------|
| 酸性殘基       | D及E       |
| 鹼性殘基       | K、R及H     |
| 親水性不帶電荷之殘基 | S、T、N及Q   |
| 脂族不帶電荷之殘基  | G、A、V、L及I |
| 非極性不帶電荷之殘基 | C、M及P     |
| 芳族殘基       | F、Y及W     |

【0208】表2.於某些實施例中視為對彼此之保守性取代的胺基酸之額外所選群組。

|     |       |
|-----|-------|
| 群組1 | A、S及T |
| 群組2 | D及E   |
| 群組3 | N及Q   |
| 群組4 | R及K   |
| 群組5 | I、L及M |
| 群組6 | F、Y及W |

【0209】 表3.於某些實施例中視為對彼此之保守性取代的胺基酸之其他所選群組。

|     |         |
|-----|---------|
| 群組A | A及G     |
| 群組B | D及E     |
| 群組C | N及Q     |
| 群組D | R、K及H   |
| 群組E | I、L、M、V |
| 群組F | F、Y及W   |
| 群組G | S及T     |
| 群組H | C及M     |

【0210】 額 外 保 守 性 取 代 可 發 現(例 如)於Creighton, *Proteins:Structures and Molecular Properties* 第2版(1993) W. H. Freeman與Co., New York, NY中。藉由在親本抗體中產生胺基酸殘基之一或多個保守性取代所產生的抗體稱為「經保守修飾之變異體」。

【0211】 術語「胺基酸」指代二十種常見天然存在之胺基酸。天然存在之胺基酸包括丙胺酸(Ala；A)、精胺酸(Arg；R)、天冬醯胺(Asn；N)、天冬胺酸(Asp；D)、半胱胺酸(Cys；C)；麩胺酸(Glu；E)、麩醯胺酸(Gln；Q)、甘胺酸(Gly；G)；組胺酸(His；H)、異白胺酸(Ile；I)、白胺酸(Leu；L)、離胺酸(Lys；K)、甲硫胺酸(Met；M)、苯丙胺酸(Phe；F)、脯胺酸(Pro；P)、絲胺酸(Ser；S)、蘇氨酸(Thr；T)、色胺酸(Trp；W)、酪胺酸(Tyr；Y)及纈胺酸(Val；V)。

【0212】 除非上下文特別陳述或以其他方式顯而易見，否則如本文中所使用，術語「約」應理解為在此項技術中之正常容限之範圍內，例如在平均值之2個標準差內。約可理解為在所陳述值之10%、9%、8%、

7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%內。

【0213】術語「實質上不含」應理解為意謂相關總組合物中之組分(例如雜質或病毒組分)之含量低於統計學上顯著量，包括相關總組合物中處於無法偵測含量之組分(亦即「不含」)。低於統計學上顯著量可意指未認定相關組合物中之組分含量具有統計可信度之偵測程度，諸如p值大於0.1、0.05或0.01。若按質量/體積百分比濃度計之組合物中組分含量低於10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、0.001%或0.0001%，則組合物實質上不含該組分。

【0214】必須指出，除非上下文另有明確規定，否則如本說明書及隨附申請專利範圍中所使用，單數形式「一(a/an)」及「該」包括複數形式。

### 經修飾細胞

【0215】本文中提供經修飾細胞，例如包括在不使用病毒傳遞系統下，添加及/或移除基因元件而經修飾之初代人類細胞。

【0216】在一個態樣中，經修飾細胞包含：包含外源性核苷酸序列之環狀聚核苷酸，該外源性核苷酸序列包含：a)編碼基因之至少一部分的核苷酸序列；b)與內源性基因組標靶基因座之第一區域一致的核苷酸序列；以及c)與內源性基因組標靶基因座之第二區域一致的核苷酸序列，與內源性基因組標靶基因座之第一及第二區域一致的該等核苷酸序列之取向可以便於在內源性基因組標靶基因座處之同源重組，且其中經修飾細胞實質上不含經病毒介導之傳遞組分。經修飾細胞可進一步包含整合式核苷酸序列，其中整合式核苷酸序列包含與編碼基因之至少一部分之核苷酸序列一致的序列，整合式核苷酸序列於內源性基因組標靶基因座處整合，且整

合式核苷酸序列之取向可以使得能夠表現基因之至少一部分。

【0217】 在另一態樣中，提供經修飾細胞，該經修飾細胞包含：T細胞，該T細胞包含：a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；c)編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列；d)編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列；其中編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列以及編碼第一及第二連接子多肽序列之核苷酸序列經整合至內源性TCR- $\alpha$ 基因座中，編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列以及編碼第一及第二連接子多肽序列之核苷酸序列之取向可以使得多肽序列中之每一者能夠經表現為單一多肽，其中第二連接子多肽序列經定位於TCR- $\alpha$ 多肽序列與TCR- $\beta$ 多肽序列之間，第一及第二連接子多肽為能夠經裂解於T細胞中使得TCR- $\alpha$ 多肽序列及TCR- $\beta$ 多肽序列各自形成分離多肽之可裂解連接子多肽，其中分離多肽能夠締合在一起以形成功能性TCR，其中經修飾細胞實質上不含經病毒介導之傳遞組分，且其中內源性TCR- $\beta$ 基因座已瓦解。經修飾T細胞可進一步包含環狀聚核苷酸，該環狀聚核苷酸包含外源性核苷酸序列，該外源性核苷酸序列包含：a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列，以及編碼第一及第二連接子多肽序列之核苷酸序列；b)與內源性TCR基因座之第一區域一致的核苷酸序列；以及c)與內源性TCR基因座之第二區域一致的核苷酸序列，且與內源性TCR基因座之第一及第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於內源性TCR基因座處之同源重組。

【0218】 在另一態樣中，提供包含以下各者之經修飾T細胞：a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；c)

編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列；d)編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列；其中編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列以及編碼第一及第二連接子多肽序列之核苷酸序列經整合至內源性TCR基因座中，編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列以及編碼第一及第二連接子多肽序列之核苷酸序列之取向可以使得多肽序列中之每一者能夠經表現為單一多肽，其中第二連接子多肽序列經定位於TCR- $\alpha$ 多肽序列與TCR- $\beta$ 多肽序列之間，且第一及第二連接子多肽為能夠經裂解於T細胞中以使得TCR- $\alpha$ 多肽序列及TCR- $\beta$ 多肽序列各自形成分離多肽之可裂解連接子多肽，其中分離多肽能夠締合在一起以形成功能性TCR。經修飾T細胞可進一步包含環狀聚核苷酸，該環狀聚核苷酸包含外源性核苷酸序列，該外源性核苷酸序列包含：a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列，以及編碼第一及第二連接子多肽序列之核苷酸序列；b)與內源性TCR基因座之第一區域一致的核苷酸序列；以及c)與內源性TCR基因座之第二區域一致的核苷酸序列，且與內源性TCR基因座之第一及第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於內源性TCR基因座處之同源重組。經修飾T細胞可實質上不含經病毒介導之傳遞組分。

**細胞修飾及基因組編輯**

【0219】 一般而言，經修飾細胞經修飾以使得其經基因組編輯或能夠經基因組編輯。舉例而言，經修飾細胞可使用經核酸酶介導之基因編輯系統經基因組編輯以表現外源性基因。如此，經修飾細胞可包含在包括內源性TCR基因座之內源性基因組標靶基因座內使所限定核苷酸序列斷裂之核酸酶組合物。若外源性聚核苷酸(例如外源性基因或其部分)經整合至經

修飾細胞之基因組中，則可將細胞視為經修飾。若其含有一般用於經核酸酶介導之基因編輯中之組分中的一或多種，亦即含有可促進基因組編輯之組分(例如核酸酶、同源性修復模板、CRISPR系統核苷酸等)，則可將細胞視為經修飾。若其含有一或多個非模板化突變(例如與整合式外源性聚核苷酸分離之突變)，諸如使內源性標靶基因座瓦解之一或多個非模板化突變，則可將細胞視為經修飾。各種修飾不為相互排它性的，亦即經修飾細胞可具有整合式外源性聚核苷酸(例如外源性基因或其部分)，以及一般用於經核酸酶介導之基因編輯中之組分中的一或多種，諸如促進外源性聚核苷酸之整合的彼等組分。

**【0220】** 在一說明性實例中，經修飾T細胞可具有編碼外源性TCR序列之整合式聚核苷酸、靶向內源性TCR基因座之CRISPR/Cas9 RNP及編碼外源性TCR序列之同源性修復模板(HRT)。在另一說明性實例中，經修飾細胞可具有靶向內源性TCR基因座之CRISPR/Cas9 RNP及編碼外源性TCR序列之同源性修復模板(HRT)。

**【0221】** 在另一說明性實例中，經修飾細胞可具有編碼外源性序列(例如基因之至少一部分)之整合式聚核苷酸、靶向內源性基因座之CRISPR/Cas9 RNP及編碼外源性序列之同源性修復模板(HRT)。在另一說明性實例中，經修飾細胞可具有靶向內源性基因座之CRISPR/Cas9 RNP及編碼外源性序列之同源性修復模板(HRT)。

**【0222】** 在另一說明性實例中，經修飾造血幹細胞(HSC)可具有編碼外源性序列(例如基因之至少一部分)之整合式聚核苷酸、靶向內源性基因座之CRISPR/Cas9 RNP及編碼外源性序列之同源性修復模板(HRT)。在另一說明性實例中，經修飾HSC可具有靶向內源性基因座之

CRISPR/Cas9 RNP及編碼外源性序列之同源性修復模板(HRT)。

【0223】 在另一說明性實例中，經修飾天然殺手(NK)細胞可具有編碼外源性序列(例如基因之至少一部分)之整合式聚核苷酸、靶向內源性基因座之CRISPR/Cas9 RNP及編碼外源性序列之同源性修復模板(HRT)。在另一說明性實例中，經修飾NK細胞可具有靶向內源性基因座之CRISPR/Cas9 RNP及編碼外源性序列之同源性修復模板(HRT)。

### **內源性基因之瓦解**

【0224】 經修飾細胞可經修飾以使得產生或能夠產生非功能性基因。

【0225】 藉由核酸酶組合物所產生之產生非功能性基因的突變可為例如同源重組DNA修復機制之模板化基因組編輯的結果。經基因組編輯以在基因組標靶基因座處表現外源性聚核苷酸(例如基因)之經修飾細胞亦可瓦解以操作方式與內源性基因組標靶基因座相聯之內源性基因的表現。舉例而言，由基因組標靶基因座編碼之內源性基因可為功能性缺失(例如內源性基因或其部分由整合式外源性基因移除/置換)或功能性瓦解(例如外源性基因經整合於內源性基因或其部分內，以瓦解內源性基因之轉錄及/或翻譯)。在一說明性實例中，編碼TCR之外源性基因可經整合於諸如編碼外顯子之TCR $\alpha$ 恆定區域的內源性TCR基因座中，以瓦解內源性TCR基因之表現。已瓦解表現相較於未經修飾細胞可降低對編碼內源性基因之mRNA的表現，或相較於未經修飾細胞可降低對內源性基因之翻譯。已瓦解表現相較於未經修飾細胞可為對編碼內源性基因之mRNA之可偵測表現的消除，或相較於未經修飾細胞可為對內源性基因之可偵測翻譯的消除。

【0226】 經修飾細胞可具有包括產生由所限定核苷酸序列(亦即基因

組標靶基因座)編碼之非功能性基因的非模板化突變(例如與整合式外源性聚核苷酸分離之突變)之修飾。藉由核酸酶組合物所產生之產生非功能性基因的突變可為非模板化基因組缺失之結果，例如導致基因組插入或缺失(亦稱為插入缺失)之經核酸酶斷裂誘發的非同源末端連接(NHEJ) DNA修復機制。可產生非功能性基因之突變包括基因之編碼區域中的突變(例如導致造成所轉譯蛋白質讀框變化之讀框轉移突變、導致自胺基酸至終止密碼子之取代的無意義突變或導致自一個胺基酸至另一胺基酸之取代的誤義突變)或非編碼區域中之突變(例如更改由基因編碼之mRNA產物之表現的突變或更改由基因編碼之mRNA產物之穩定性的突變)。修飾可包括能夠在經修飾細胞中產生非模板化突變之核酸酶組成物(例如能夠使所限定核苷酸序列斷裂之核酸酶組合物)。

### 多個修飾

【0227】 經修飾細胞可具有超過一個修飾，例如在經修飾細胞中超過一個基因組基因座處之修飾。舉例而言，經修飾細胞於超過一個基因組基因座處可具有超過一個整合式外源性聚核苷酸，諸如進一步包含第二整合式核苷酸序列之經修飾細胞，其中第二整合式核苷酸序列包含與編碼第二基因之至少該部分之核苷酸序列一致的序列，第二整合式核苷酸序列經在第二內源性基因組標靶基因座處整合，且第二整合式核苷酸序列之取向可以使得能夠表現第二基因之至少一部分。經修飾細胞可具有促進諸如包含第二外源性核苷酸組合物之第二環狀聚核苷酸的第二外源性聚核苷酸之整合的組分，第二外源性核苷酸組合物包含：a)編碼第二基因之至少一部分的核苷酸序列；b)與第二內源性基因組標靶基因座之第一區域一致的核苷酸序列；以及c)與第二內源性基因組標靶基因座之第二區域一致的核苷

酸序列，且與第二內源性基因組標靶基因座之第一及第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於第二內源性基因組標靶基因座處之同源重組，且/或第二核酸酶組合物能夠使經修飾細胞內之第二所限定核苷酸序列斷裂。一般而言，經修飾細胞不限於僅一個或兩個整合式核苷酸序列，且可包括任何數目個整合式核苷酸序列，諸如1個至10個、1個至2個、1個至3個、2個至3個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個或更多整合式核苷酸序列。

**【0228】** 同樣，經修飾細胞可具有可產生1個至10個、1個至2個、1個至3個、2個至3個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個或更多個整合式核苷酸序列之組分，諸如同源修復模板、核酸酶等。在一說明性實例中，經「多重」CRISPR介導之基因編輯方法可用以經由引入同時具有於多個基因組位置處直接斷裂之多個CRISPR RNP複合體的多個同源修復模板來整合多個基因或其部分。多個序列亦可經依序整合。

**【0229】** 經修飾細胞可具有包括多個非模板化突變(例如與整合式外源性聚核苷酸分離之突變)之修飾，該等非模板化突變諸如產生由所限定核苷酸序列(亦即基因組標靶基因座)編碼之非功能性基因的多個非模板化突變。修飾可包括能夠於經修飾細胞中產生多個非模板化突變之核酸酶組成物。舉例而言，經修飾細胞可分別具有產生兩個或三個非功能性基因之兩個或三個分離非模板化突變。一般而言，經修飾細胞可具有任何數目個非模板化突變，分別例如4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個或更多個分離非模板化突變。在一說明性實例中，經「多重」CRISPR介導之基因編輯方法可用以經由同時引入於多個基因組位置處直接斷裂導致多個非模板化突變之多個CRISPR RNP複合體來瓦解多個基因。

【0230】經修飾細胞可具有產生超過一個非功能性基因之超過一個突變。舉例而言，經修飾細胞可分別具有產生兩個或三個非功能性基因之兩個或三個分離突變。一般而言，經修飾細胞可具有產生任何數目個非功能性基因之任何數目個突變，分別例如產生4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個或更多個非功能性基因之4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個或更多個分離突變。在一說明性實例中，經「多重」CRISPR介導之基因編輯方法可用以經由同時引入於多個基因組位置處直接斷裂導致多個突變之多個CRISPR RNP複合體來瓦解多個基因。多個基因亦可經依序瓦解。藉由核酸酶組合物所產生之產生非功能性基因的突變可為例如同源重組DNA修復機制之模板化基因組編輯的結果。藉由核酸酶組合物所產生之產生非功能性基因的突變可為非模板化基因組缺失之結果，例如導致基因組插入或缺失(亦稱為插入缺失)之經核酸酶斷裂誘發的非同源末端連接(NHEJ) DNA修復機制。

【0231】多個修飾可包括所描述修飾中之任一者的組合，諸如與一或多個非模板化突變組合之一或多個整合式核苷酸序列。在一說明性實例中，經「多重」CRISPR介導之基因編輯方法可用以經由同源定向修復整合一或多個基因(亦即引入同時具有於多個基因組位置處直接斷裂之多個CRISPR RNP複合體的多個同源修復模板)或其部分而同時瓦解多個基因(亦即同時引入於多個基因組位置處直接斷裂導致例如多個插入缺失之多個非模板化突變的多個CRISPR RNP複合體)兩者。整合及瓦解可依序執行。

【0232】作為具有多個修飾之經修飾細胞的一說明性實例，經修飾T細胞具有經整合於TCR $\alpha$ 基因座及已瓦解之TCR $\beta$ 基因座中之TCR表現卡

匣以使得TCR $\beta$ 基因座為非功能性基因。作為具有多個修飾之經修飾細胞的另一說明性實例，經修飾T細胞具有經整合於TCR $\beta$ 基因座及已瓦解之TCR $\alpha$ 基因座中之TCR表現卡匣以使得TCR $\alpha$ 基因座為非功能性基因。

### **標靶基因座**

【0233】經修飾細胞經基因組編輯，或能夠於內源性基因組標靶基因座處，亦即於經修飾細胞內之特異性基因組位置處經基因組編輯，諸如所關注之特異性基因或所關注之特異性核苷酸序列。內源性基因組標靶基因座可為基因之編碼區域。內源性基因組標靶基因座可為基因之非編碼區域，諸如內含子。內源性基因組標靶基因座可為除典型地與典型基因相聯之基因組區域以外的非編碼基因組區域，諸如編碼非編碼功能性RNA、重複DNA元件、逆轉錄病毒元件、偽基因及其類似者之一或多個區域。

### **細胞群**

【0234】在一特定態樣中，提供細胞群(例如T細胞群)。細胞群可包含本文中所描述之經修飾細胞中的任一者。經修飾細胞可在異質細胞群及/或不同細胞類型之異質群體內。相對於經基因組編輯之細胞的百分比，細胞群可為異質的。細胞群可具有大於10%、大於20%、大於30%、大於40%、大於50%、大於60%、大於70%、大於80%或大於90%之群體包含整合式核苷酸序列。在某一態樣中，細胞群包含整合式核苷酸序列，其中整合式核苷酸序列包含基因之至少一部分，整合式核苷酸序列經整合於內源性基因組標靶基因座處，且整合式核苷酸序列之取向可以使得能夠表現基因之至少一部分，其中細胞群實質上不含經病毒介導之傳遞組分，且其中於群體中大於10%、大於20%、大於30%、大於40%、大於50%、大於60%、大於70%、大於80%或大於90%之細胞包含整合式核苷酸序列。

【0235】細胞群可具有大於91%、大於92%、大於93%、大於94%、大於95%、大於96%或大於97%、大於98%、大於99%、大於99.5%或大於99.9%之群體包含整合式核苷酸序列。細胞群可具有大於20%之群體包含整合式核苷酸序列。細胞群可具有大於30%之群體包含整合式核苷酸序列。細胞群可具有大於60%之群體包含整合式核苷酸序列。細胞群可具有大於70%之群體包含整合式核苷酸序列。

【0236】細胞群可具有10%與70%之間、20%與70%之間、30%與70%之間、40%與70%之間、50%與70%之間、60%與70%之間、10%與80%之間、10%與60%之間、10%與50%之間、10%與40%之間、10%與30%之間、10%與20%之間、20%與80%之間、30%與80%之間、40%與80%之間、50%與80%之間、60%與80%之間、70%與80%之間的群體包含整合式核苷酸序列。細胞群可具有10%與100%之間、20%與100%之間、30%與100%之間、40%與100%之間、50%與100%之間、60%與100%之間、70%與100%之間、80%與100%之間、90%與100%之間、95%與100%之間、96%與100%之間、97%與100%之間、98%與100%之間、99%與100%之間、99.5%與100%之間的群體包含整合式核苷酸序列。細胞群可具有10%與70%之間包含整合式核苷酸序列。細胞群可具有20%與70%之間包含整合式核苷酸序列。細胞群可具有30%與70%之間包含整合式核苷酸序列。細胞群可具有10%與80%之間包含整合式核苷酸序列。細胞群可具有20%與80%之間包含整合式核苷酸序列。細胞群可具有30%與80%之間包含整合式核苷酸序列。

【0237】相對於具有例如整合式核苷酸序列之單個修飾之細胞的百分比，細胞群可為異質的。相對於具有第一修飾、第二修飾或第一及第二

修飾兩者之細胞的百分比，細胞群可為異質的，例如作為一說明性實例，相對於具有整合式核苷酸序列、產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變或整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變兩者之細胞的百分比，該等細胞群為異質的。

【0238】細胞群可具有大於10%、大於20%、大於30%、大於40%、大於50%、大於60%、大於70%、大於80%或大於90%之群體包含整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有大於91%、大於92%、大於93%、大於94%、大於95%、大於96%或大於97%、大於98%、大於99%、大於99.5%或大於99.9%之群體包含整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有大於20%之群體包含整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有大於30%之群體包含整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有大於60%之群體包含整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有大於70%之群體包含整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有10%與70%之間、20%與70%之間、30%與70%之間、40%與70%之間、50%與70%之間、60%與70%之間、10%與80%之間、10%與60%之間、10%與50%之間、10%與40%之間、10%與30%之間、10%與20%之間、20%與80%之間、30%與80%之間、40%與80%之間、50%與80%之間、60%與80%之間、70%與80%之間的群體包含整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有10%與100%之間、

20%與100%之間、30%與100%之間、40%與100%之間、50%與100%之間、60%與100%之間、70%與100%之間、80%與100%之間、90%與100%之間、95%與100%之間、96%與100%之間、97%與100%之間、98%與100%之間、99%與100%之間、99.5%與100%之間的群體包含整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有10%與70%之間包含整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有20%與70%之間包含整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有30%與70%之間包含整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有10%與80%之間包含整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有20%與80%之間包含整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有30%與80%之間包含整合式核苷酸序列及產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。

【0239】細胞群可具有大於10%、大於20%、大於30%、大於40%、大於50%、大於60%、大於70%、大於80%或大於90%之群體包含整合式核苷酸序列或產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有10%與70%之間、20%與70%之間、30%與70%之間、40%與70%之間、50%與70%之間、60%與70%之間、10%與80%之間、10%與60%之間、10%與50%之間、10%與40%之間、10%與30%之間、10%與20%之間、20%與80%之間、30%與80%之間、40%與80%之間、50%與80%之間、60%與80%之間、70%與80%之間的群體包含整合

式核苷酸序列或產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有大於91%、大於92%、大於93%、大於94%、大於95%、大於96%或大於97%、大於98%、大於99%、大於99.5%或大於99.9%之群體包含整合式核苷酸序列或產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有大於20%之群體包含整合式核苷酸序列或產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有大於30%之群體包含整合式核苷酸序列或產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有大於60%之群體包含整合式核苷酸序列或產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。細胞群可具有大於70%之群體包含整合式核苷酸序列或產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。

【0240】細胞群可具有大於10%、大於20%、大於30%、大於40%、大於50%、大於60%、大於70%、大於80%、大於90%、大於95%、大於98%或大於99%之包含整合式核苷酸序列亦包含產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變之經修飾細胞。細胞群可具有10%與70%之間、20%與70%之間、30%與70%之間、40%與70%之間、50%與70%之間、60%與70%之間、10%與80%之間、10%與60%之間、10%與50%之間、10%與40%之間、10%與30%之間、10%與20%之間、20%與80%之間、30%與80%之間、40%與80%之間、50%與80%之間、60%與80%之間、70%與80%之間、10%與90%、20%與90%之間、30%與90%之間、40%與90%之間、50%與90%之間、60%與90%之間、70%與90%之間、80%與90%之間、10%與95%之間、20%與95%之間、30%與95%之間、40%與95%之間、50%與95%之間、60%與95%之間、70%

與95%之間、80%與95%之間、10%與98%之間、20%與98%之間、30%與98%之間、40%與98%之間、50%與98%之間、60%與98%之間、70%與98%之間、80%與98%之間、10%與99%之間、20%與99%之間、30%與99%之間、40%與99%之間、50%與99%之間、60%與99%之間、70%與99%之間、80%與99%之間、90%與99%之間、95%與99%之間、90%與95%之間及95%與98%之間的包含整合式核苷酸序列亦包含產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變之經修飾細胞。

【0241】細胞群可具有大於10%、大於20%、大於30%、大於40%、大於50%、大於60%、大於70%、大於80%、大於90%、大於95%、大於98%或大於99%之包含產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變亦包含整合式核苷酸序列之經修飾細胞。細胞群可具有10%與70%之間、20%與70%之間、30%與70%之間、40%與70%之間、50%與70%之間、60%與70%之間、10%與80%之間、10%與60%之間、10%與50%之間、10%與40%之間、10%與30%之間、10%與20%之間、20%與80%之間、30%與80%之間、40%與80%之間、50%與80%之間、60%與80%之間、70%與80%之間、10%與90%、20%與90%之間、30%與90%之間、40%與90%之間、50%與90%之間、60%與90%之間、70%與90%之間、80%與90%之間、10%與95%之間、20%與95%之間、30%與95%之間、40%與95%之間、50%與95%之間、60%與95%之間、70%與95%之間、80%與95%之間、10%與98%之間、20%與98%之間、30%與98%之間、40%與98%之間、50%與98%之間、60%與98%之間、70%與98%之間、80%與98%之間、10%與99%之間、20%與99%之間30%與99%之間、40%與99%之間、50%與99%之間、60%與99%之間、70%與

99%之間、80%與99%之間、90%與99%之間、95%與99%之間、90%與95%之間及95%與98%之間的包含產生由第二所限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變亦包含整合式核苷酸序列之經修飾細胞。

**【0242】** 經修飾細胞可經富集於修飾後(例如經基因組編輯後)之細胞群內以富集特異性修飾(例如外源性基因之整合)。群體可使用包括(但不限於)以下之方法來富集：螢光活化細胞分選(FACS) (例如外源性基因表現或共表現螢光標記物，或使用用於外源性基因之表現或內源性基因之缺失的抗體將群體染色)、藥物選擇(例如外源性基因表現或共表現藥物選擇基因)或親和純化(例如外源性基因表現或共表現親和標籤)。

**【0243】** 在特定態樣中，可在不富集經修飾細胞，亦即於細胞之修飾後(諸如在經核酸酶介導(例如經CRISPR介導)之基因組編輯後)不執行富集步驟之情況下，達成本文中所描述之均質群體。

**【0244】** 細胞群，特定言之係緊隨其中群體尚未富集之修飾之後的細胞群可為至少10個細胞、至少100個細胞、至少1000個細胞、至少10000個細胞、 $1 \times 10^6$ 個細胞、至少 $2 \times 10^6$ 個細胞、至少 $5 \times 10^6$ 個細胞、至少 $1 \times 10^7$ 個細胞、至少 $5 \times 10^7$ 個細胞、至少 $1 \times 10^8$ 個細胞、至少 $5 \times 10^8$ 個細胞、至少 $1 \times 10^9$ 個細胞或至少 $5 \times 10^9$ 個細胞。細胞群，特定言之係緊隨其中群體尚未富集之修飾之後的細胞群可為至少 $1 \times 10^7$ 個細胞。細胞群，特定言之係緊隨其中群體尚未富集之修飾之後的細胞群至少 $5 \times 10^7$ 個細胞。

## 基因編輯系統

**【0245】** 如上文所描述，一般而言，經修飾細胞經修飾以使得其經基因組編輯，或能夠使用經核酸酶介導之編輯經基因組編輯。

**【0246】** 一般而言，核酸酶經由例如基因組序列之特異性核酸序列

(亦即藉由核酸酶斷裂之「所限定核苷酸序列」)處的第一定向斷裂促進編輯，且後續編輯由例如經核酸酶斷裂誘發之非同源末端連接DNA修復機制的基於非模板化之DNA修復產生，或由例如同源重組DNA修復機制之基於模板的修復產生。

【0247】可經工程改造以促進序列特異性斷裂之多種核酸酶為熟習此項技術者所已知且包括(但不限於)：成簇規律間隔短回文重複序列(CRISPR)家族核酸酶、類轉錄活化因子效應子核酸酶(TALEN)或其衍生物、鋅指核酸酶(ZFN)或其衍生物及歸巢核酸內切酶(HE)或其衍生物。特定言之，可使用經CRISPR介導之基因編輯系統，諸如CRISPR/Cas9編輯系統。經核酸酶介導之編輯，且特定言之經CRISPR介導之編輯更詳細地論述於Adli M (*The CRISPR tool kit for genome editing and beyond*. Nat Commun. 2018年5月15日；9(1):1911)中，其所教示之全部內容以引用的方式併入本文中。

### ***經CRISPR介導之基因編輯***

【0248】一般而言，經CRISPR介導之基因編輯系統包含CRISPR相聯(Cas)核酸酶及導向特定標靶序列之斷裂的RNA。例示性經CRISPR介導之基因編輯系統為包含Cas9核酸酶及具有CRISPR RNA (crRNA)域及反式活化CRISPR (tracrRNA)域之RNA的CRISPR/Cas9系統。crRNA典型地具有兩個RNA域：經由鹼基對雜交使特異性導向例如基因組序列之標靶序列(「所限定核苷酸序列」)的前導RNA序列(gRNA)；以及雜交至tracrRNA之RNA域。tracrRNA可與核酸酶(例如Cas9)相互作用且從而促進核酸酶至基因組基因座之補充。crRNA與tracrRNA聚核苷酸可為分離聚核苷酸。crRNA及tracrRNA聚核苷酸可為單個聚核苷酸，亦稱為單個

前導RNA (sgRNA)。儘管此處說明Cas9系統，但可使用其他CRISPR系統，諸如Cpf1系統。核酸酶可包括其衍生物，諸如Cas9功能性突變體，例如相對於典型地藉由Cas9酶產生之完整雙鏈斷裂，一般介導僅單鏈所限定核苷酸序列之斷裂的Cas9「切口酶」突變體。

**【0249】** 一般而言，CRISPR系統之組分彼此相互作用以形成核糖核蛋白(RNP)複合體從而介導序列特異性斷裂。在一些CRISPR系統中，每一組件可單獨產生且用以形成RNP複合體。在一些CRISPR系統中，每一組件可於試管內單獨產生且彼此於試管內接觸(亦即「複合」)以形成RNP複合體。於試管內所產生之RNP可隨後經引入(亦即「傳遞」)至細胞之胞溶質及/或胞核中，例如引入至T細胞之胞溶質及/或胞核中。於試管內所產生之RNP複合體可藉由包括(但不限於)以下各者之多種方法傳遞至細胞：電穿孔、脂質介導轉染、藉由實體方法之細胞膜變形、脂質奈米粒子(LNP)、病毒類粒子(VLP)及音波處理。在一特定實例中，可使用基於Nucleofactor/Nucleofection®電穿孔之傳遞系統(Lonza®)將於試管內所產生之RNP複合體傳遞至細胞。其他電穿孔系統包括(但不限於)MaxCyte電穿孔系統、Miltenyi CliniMACS電穿孔系統、氬電穿孔系統及BTX電穿孔系統。可使用熟習此項技術者已知的多種蛋白生產技術於試管內產生(亦即合成及純化)例如Cas9之CRISPR核酸酶。可使用熟習此項技術者已知的多種RNA生產技術(諸如試管內轉錄或化學合成)於試管內產生(亦即合成及純化)例如sgRNA之CRISPR系統RNA。

**【0250】** 於試管內所產生之RNP複合體可以不同核酸酶比率經複合至gRNA。舉例而言，於試管內所產生之RNP複合體可與sgRNA一起形成，該等sgRNA與Cas9蛋白以1:1至1:9之間的Cas9:sgRNA莫耳比複合，

諸如1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8或1:9之Cas9:sgRNA莫耳比。於試管內所產生之RNP複合體可與sgRNA一起形成，該等sgRNA與Cas9蛋白以約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:6、約1:7、約1:8或約1:9之Cas9:sgRNA莫耳比複合。

【0251】於試管內所產生之RNP複合體亦可於經CRISPR介導之編輯系統中以不同的量使用。舉例而言，取決於所要待編輯之細胞的數目，可調整所添加之總RNP量，諸如當於反應中編輯大數目(例如 $5 \times 10^7$ )個細胞時，減小所添加RNP複合體之量。

【0252】在一些CRISPR系統中，每一組件(例如Cas9及sgRNA)可單獨由聚核苷酸及引入至細胞中之每一聚核苷酸編碼。在一些CRISPR系統中，每一組分可由單個聚核苷酸(亦即多啟動子或多順反子載體，見下文例示性多順反子系統之描述)編碼並引入至細胞中。根據於細胞內編碼CRISPR組分之每一聚核苷酸的表現(例如對核酸酶之翻譯及對CRISPR RNA之轉錄)，RNP複合體可於細胞內形成且可隨後直接位點特異性斷裂。

【0253】一些RNP可經工程改造以具有促進RNP至胞核中之傳遞的部分。舉例而言，Cas9核酸酶可具有核定位信號(NLS)域以使得若Cas9 RNP複合體經傳遞至細胞之胞溶質中或隨後為對Cas9之翻譯及後續RNP形成，則NLS可促進Cas9 RNP至胞核中之進一步遷移。

【0254】本文中所描述之經修飾細胞可使用非病毒方法修飾，例如本文中所描述之核酸酶及經CRISPR介導之基因編輯系統可使用非病毒方法傳遞至細胞。當經病毒介導之傳遞(例如基於傳遞方法之腺病毒、逆轉錄病毒及慢病毒)已用以傳遞核酸酶及經CRISPR介導之基因編輯系統時，

經病毒介導之系統可遭受亦引入導致免疫原性之組分的病毒系統。舉例而言，經病毒介導之傳遞組分可包括可經整合至基因組中之病毒或病毒衍生之核苷酸序列。因此，本文中所描述之經修飾細胞可實質上不含經病毒介導之傳遞組分。術語「實質上不含經病毒介導之傳遞組分」應理解為意謂小於存在於相關總組合物(例如細胞或細胞群)中之一或多個經病毒介導之傳遞組分之統計學上顯著的量，包括於相關總組合物中處於不可偵測含量之經病毒介導的傳遞組分(亦即「本文中所描述之經修飾細胞可不含經病毒介導之傳遞組分」)。小於統計學上顯著的量可指代並不認定為具有經病毒介導之傳遞組分存在於相關組合物中之統計可信度之偵測的含量，諸如p值大於0.1、0.05或0.01。經病毒介導之傳遞組分可包括病毒蛋白，諸如病毒結構蛋白(例如蛋白殼、包膜及/或膜融合蛋白)。一般而言，衍生自整合式病毒序列或衍生自所引入病毒蛋白之全部肽可潛在地藉由MHC分子呈現於細胞表面，特別係I類MHC等位基因，且可隨後導致免疫原性。在諸如過繼細胞療法之治療情境下，免疫原性可能不利地影響治療效果。因此，非病毒傳遞方法在待用於諸如過繼T細胞療法之過繼細胞療法中的修飾及編輯細胞中可為有利的。因此，在一特定態樣中，經修飾細胞之表面上的I類MHC可不含衍生自經病毒介導之傳遞組分或整合式病毒的肽，其中整合式病毒以操作方式與經病毒介導之傳遞組分相聯。

**【0255】** 在一些CRISPR系統中，可提供超過一種CRISPR組合物以使得各自單獨靶向相同基因或超過一個所限定核苷酸序列處之一般基因組基因座。舉例而言，兩種分離CRISPR組合物可經提供以在彼此於某一距離內之兩種不同所限定核苷酸序列處直接斷裂，諸如彼此小於或等於10個鹼基對、小於或等於20個鹼基對、小於或等於30個鹼基對、小於或等於

40個鹼基對、小於或等於50個鹼基對、小於或等於100個鹼基對、小於或等於200個鹼基對、小於或等於300個鹼基對、小於或等於400個鹼基對、小於或等於500個鹼基對、小於或等於1,000個鹼基對、小於或等於2,000個鹼基對、小於或等於5,000個鹼基對或小於或等於10,000個鹼基對。在一些CRISPR系統中，超過一個CRISPR組合物可經提供以使得各自單獨靶向相同基因之相反鏈或一般基因組基因座。舉例而言，兩種分離CRISPR「切口酶」組合物可經提供以在相同基因或相反鏈處之一般基因組基因座處直接斷裂。

### **基因編輯中之同源定向修復(HDR)**

【0256】在不希望受理論束縛之情況下，一般而言，經核酸酶介導之基因編輯系統用以引入利用細胞之天然DNA修復機制(特別係同源重組(HR)修復路徑)之外源性基因。簡言之，在損害基因組DNA(典型地雙鏈斷裂)之後，細胞可藉由在DNA合成期間使用於其5'末端及3'末端兩者處具有一致或實質上一致的序列之另一DNA源作為模板以修復病灶來解決該損害。在天然情境下，HDR可使用存在於細胞中之其他染色體作為模板。在基因編輯系統中，外源性聚核苷酸經引入至待用作同源重組模板(HRT或HR模板)之細胞中。一般而言，最初未發現於具有包括HRT (例如基因或基因之部分)內之5'互補末端與3'互補末端之間的病灶之染色體中的任何額外外源性序列可於模板化HDR期間經併入(亦即「經整合」)至所給基因組基因座中。因此，所給基因組基因座之典型HR模板具有與內源性基因組標靶基因座之第一區域一致的核苷酸序列、與內源性基因組標靶基因座之第二區域一致的核苷酸序列及編碼基因之至少一部分(例如所關注外源性基因)的核苷酸序列。

【0257】 在一些實例中，HR模板可為直鏈。直鏈HR模板之實例包括(但不限於)線性化質體載體、ssDNA合成DNA及PCR擴增DNA。

【0258】 在特定實例中，HR模板可為環狀，諸如質體或奈米質體。在不希望受理論束縛之情況下，環狀HR模板相較於類似直鏈模板可具有特殊優勢，諸如經增加之穩定性、經降低之合成誤差(例如於PCR擴增期間)及製造之容易性。如本文中所顯示，環狀HR模板相對於例如類似大小之直鏈模板的類似直鏈模板可具有經改善之編輯效率。環狀模板可包括超螺旋模板。

【0259】 在不希望受理論束縛之情況下，一般而言，所使用之HR模板愈大，則典型地同源重組(HR)修復路徑總體愈低效。因此，諸如藉由自HR模板，特別係自環狀模板移除外源性核苷酸序列來限制HR模板之大小可為有利的。舉例而言，可使用長度小於500個鹼基之載體骨架(亦即除基因或其部分以外之全部核苷酸序列)，諸如其中將除耐抗生素標記物及複製起點以外之外源性序列移除的載體。

【0260】 在環狀HR模板之一說明性實例中，使用Nanoplasמידs™ (Nature Technology)。Nanoplasמיד™為Nature Technology公司之商標。不含抗生素之RNA-OUT選擇載體及細胞系分別較詳細地描述於世界專利申請案WO2008153733中及等效美國、歐洲及澳大利亞專利：US 2010/0303859；EP2333091；以及AU 2008262478中，其所教示之全部內容特此以其全文引用的方式併入。Nanoplasמיד™載體及細胞另外較詳細地描述於依據專利合作條約之以下世界專利中：PCT/US 13/000259；PCT/US 13/00067；以及PCT/US 13/00068，其所教示之全部內容特此以其全文引用的方式併入。

【0261】在不希望受理論束縛之情況下，一般而言，HR模板中之雜質可導致經修飾細胞之編輯效率及/或經修飾細胞之生存力的降低。因此，所使用之HR模板可實質上不含雜質(例如除HR模板之DNA以外的任何組分)或不含基於偵測之限制的雜質。雜質可包括(但不限於)淨化過程相關雜質(例如來自緩衝劑之鹽或溶劑等)、除HR模板以外之DNA及其他核酸及來自用以產生HR模板之殘餘宿主細胞(例如細菌細胞，諸如大腸桿菌)的殘餘雜質，諸如內毒素、殘餘宿主細胞蛋白、殘餘宿主細胞RNA、殘餘宿主細胞gDNA及殘餘宿主細胞脂或碳水化合物。

【0262】如藉由瓊脂糖凝膠電泳所評估，當純度為至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少98%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%純淨時，HR模板之均質性(例如不含DNA及除HR模板以外之其他核酸的HR模板之純度)可藉由瓊脂糖凝膠電泳來評估，且可典型地視為實質上不含DNA及除HR模板以外之其他核酸。如藉由瓊脂糖凝膠電泳所評估，當純度為至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%純淨時，HR模板可視為實質上不含DNA及除HR模板以外之其他核酸。

【0263】當偵測到小於1000 EU/mg、小於900 EU/mg、小於800 EU/mg、小於700 EU/mg或小於600 EU/mg時，HR模板之內毒素雜質可藉由蠟變形細胞溶解物(LAL)檢定來評估，且可典型地視為實質上不含內毒素。當偵測到小於450 EU/mg、小於400 EU/mg、小於350 EU/mg、小於300 EU/mg、小於250 EU/mg、小於200 EU/mg、小於150 EU/mg、小於100 EU/mg或小於50 EU/mg時，HR模板視為實質上不含內毒素。當偵測到小於500 EU/mg時，HR模板視為實質上不含內毒素。

【0264】殘餘宿主細胞蛋白可藉由微BCA來評估。當小於5%、小於4%、小於3%、小於2%、小於1%、小於0.5%或小於0.1%之組合物包含殘餘宿主細胞蛋白時，HR模板視為實質上不含殘餘宿主細胞蛋白。當小於2%之組合物包含殘餘宿主細胞蛋白時，HR模板視為實質上不含殘餘宿主細胞蛋白。

【0265】殘餘宿主細胞RNA可藉由瓊脂糖凝膠電泳及具有SYBR Gold之染色來評估。當小於10%、小於7.5%、小於5%、小於2.5%、小於1%、小於0.5%或小於0.1%之組合物包含殘餘宿主細胞RNA時，HR模板視為實質上不含殘餘宿主細胞RNA。當小於5%之組合物包含殘餘宿主細胞RNA時，HR模板視為實質上不含殘餘宿主細胞RNA。

【0266】殘餘宿主細胞基因組DNA可藉由qPCR來評估。當小於10%、小於7.5%、小於5%、小於2.5%、小於1%、小於0.5%或小於0.1%之組合物包含殘餘宿主細胞基因組DNA時，HR模板視為實質上不含殘餘宿主細胞基因組DNA。當小於5%之組合物包含殘餘宿主細胞基因組DNA時，HR模板視為實質上不含殘餘宿主細胞基因組DNA。

【0267】過程相關雜質(例如來自緩衝劑之鹽或溶劑等)可藉由此項技術中所已知方法來評估。

【0268】殘餘宿主細胞脂或碳水化合物可藉由此項技術中所已知方法來評估。

【0269】HR模板可藉由光譜測定法來評估。當藉由光譜測定法將 $A_{260}/A_{280}$ 比率評估為1.8、 $1.8 \pm .001$ 、 $1.8 \pm .01$ 或 $1.8 \pm .1$ 時，HR模板視為實質上不含雜質。

【0270】本領域中所已知之其他檢定可用以評估HR模板純度。如藉

由本領域中已知之檢定所評估，HR模板可為至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%純淨。如藉由本領域中已知之檢定所評估，HR模板可為至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%純淨。如藉由本領域中已知之檢定所評估，HR模板可在95%與100%之間、96%與100%之間、97%與100%之間、98%與100%之間、99%與100%之間、99.5%與100%之間或99.9%與100%之間純淨。

【0271】HR模板可藉由熟習此項技術者所已知之方法來純化，該等方法包括(但不限於)基於矽石柱之淨化、酚氯仿萃取、層析淨化(例如HPLC)、聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)淨化及其組合。

【0272】在HDR之後，可移除標靶序列(「所限定核苷酸序列」)以使得內源性基因組標靶基因座不再能夠斷裂。舉例而言，於HR模板上編碼之外源性核苷酸序列可能缺失所給核酸酶所斷裂之標靶序列。

### **HR臂**

【0273】相對於待引入之外源性序列，一般將發現於HR模板之5'末端及3'末端處之一致或實質上一致的序列(亦即與內源性基因組標靶基因座之第一及第二區域一致的核苷酸序列)稱為臂(HR臂)。HR臂可與內源性基因組標靶基因座之區域一致(亦即100%一致)。在一些實例中，HR臂可與內源性基因組標靶基因座之區域實質上一致(例如與內源性基因組標靶基因座之區域至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%一致)。當可使用實質上一致的HR臂時，因為HDR途徑之效率可能受具有小於100%一致性之HR臂影響，所以使HR臂一致可為有利的。

【0274】雖然HR臂一般可具有任何長度，但亦可考量實際考慮因

素，諸如HR臂長度及總體模板大小對總體編輯效率之影響。與內源性基因組標靶基因座之第一區域(亦即5' HR臂)一致或實質上一致的核苷酸序列可長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於100個鹼基、長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於300個鹼基、長度大於或等於400個鹼基、長度大於或等於500個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於700個鹼基、長度大於或等於800個鹼基、長度大於或等於900個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基、長度大於或等於1100個鹼基、長度大於或等於1200個鹼基、長度大於或等於1300個鹼基、長度大於或等於1400個鹼基、長度大於或等於1500個鹼基、長度大於或等於1600個鹼基、長度大於或等於1700個鹼基、長度大於或等於1800個鹼基、長度大於或等於1900個鹼基、長度大於或等於2000個鹼基。與內源性基因組標靶基因座之第一區域(亦即5' HR臂)一致或實質上一致的核苷酸序列可大於或等於300個鹼基長度。與內源性基因組標靶基因座之第一區域(亦即5' HR臂)一致或實質上一致的核苷酸序列可大於或等於600個鹼基長度。與內源性基因組標靶基因座之第一區域(亦即5' HR臂)一致或實質上一致的核苷酸序列可大於或等於1000個鹼基長度。與內源性基因組標靶基因座之第一區域(亦即5' HR臂)一致或實質上一致的核苷酸序列可大於或等於2000個鹼基長度。

**【0275】** 與內源性基因組標靶基因座之第二區域(亦即3' HR臂)一致或實質上一致的核苷酸序列可長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於100個鹼基、長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於300個鹼基、長度大於或等於400個鹼基、長度大於或等於500個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於700個鹼基、長度大於或等於800個鹼基、長

度大於或等於900個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基、長度大於或等於1100個鹼基、長度大於或等於1200個鹼基、長度大於或等於1300個鹼基、長度大於或等於1400個鹼基、長度大於或等於1500個鹼基、長度大於或等於1600個鹼基、長度大於或等於1700個鹼基、長度大於或等於1800個鹼基、長度大於或等於1900個鹼基、長度大於或等於2000個鹼基。與內源性基因組標靶基因座之第二區域(亦即3' HR臂)一致或實質上一致的核苷酸序列可大於或等於300個鹼基長度。與內源性基因組標靶基因座之第二區域(亦即3' HR臂)一致或實質上一致的核苷酸序列可大於或等於600個鹼基長度。與內源性基因組標靶基因座之第二區域(亦即3' HR臂)一致或實質上一致的核苷酸序列可大於或等於1000個鹼基長度。與內源性基因組標靶基因座之第二區域(亦即3' HR臂)一致或實質上一致的核苷酸序列可大於或等於2000個鹼基長度。

【0276】與內源性基因組標靶基因座之第一及第二區域一致或實質上一致的核苷酸序列中之每一者可為相同大小或不同大小。舉例而言，與內源性基因組標靶基因座之第一區域一致或實質上一致的核苷酸序列及與內源性基因組標靶基因座之第二區域一致或實質上一致的核苷酸序列可各自大於或等於600個鹼基長度。。

【0277】與內源性基因組標靶基因座之第一或第二區域一致或實質上一致的核苷酸序列可與內源性基因組標靶基因座緊鄰斷裂位點之區域(亦即所限定核苷酸序列)一致或實質上一致。與內源性基因組標靶基因座之第一及第二區域一致或實質上一致的核苷酸序列可各自與內源性基因組標靶基因座緊鄰斷裂位點之區域(亦即所限定核苷酸序列)一致或實質上一致。與內源性基因組標靶基因座之第一或第二區域一致或實質上一致的核

核苷酸序列可與內源性基因組標靶基因座在斷裂位點之某一距離內的區域(亦即所限定核苷酸序列)一致或實質上一致，諸如彼此為1個鹼基對、小於或等於2個鹼基對、小於或等於3個鹼基對、小於或等於4個鹼基對、小於或等於5個鹼基對、小於或等於6個鹼基對、小於或等於7個鹼基對、小於或等於8個鹼基對、小於或等於9個鹼基對、小於或等於10個鹼基對、小於或等於15個鹼基對、小於或等於20個鹼基對、小於或等於50個鹼基對或小於或等於100個鹼基對。與內源性基因組標靶基因座之第一或第二區域一致或實質上一致的核苷酸序列可與內源性基因組標靶基因座在斷裂位點之1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個或20個鹼基對內的區域一致或實質上一致。

### 外源性序列

【0278】編碼基因(例如所關注外源性基因)之至少一部分的核苷酸序列一般可為任何所關注外源性核苷酸序列。舉例而言，所關注外源性核苷酸序列可為例如3個至100個核苷酸長度之較短序列。所關注外源性核苷酸序列可為單核苷酸。另外，所關注外源性核苷酸序列可為例如500個至3000個核苷酸長度之長序列。所關注外源性核苷酸序列對於多肽序列可為編碼或非編碼的。另外，所關注外源性核苷酸序列可經插入於細胞中使得其在插入時形成嵌合基因。舉例而言，外源性受體部分可經插入於內源性受體編碼序列中之讀框中以產生嵌合受體編碼序列，該嵌合受體編碼序列於編輯後包括以操作方式連接至內源性胞內部分(例如用於信號轉導)之外源性受體部分。

【0279】在一些實例中，基因或其部分可為蛋白編碼核苷酸序列(亦

即編碼多肽序列之核苷酸序列)。一般而言，可使用任何蛋白編碼核苷酸。在一些實例中，蛋白編碼核苷酸序列編碼適用於自體細胞療法(例如自體T細胞療法)中之蛋白。在一些實例中，蛋白編碼核苷酸序列可包括(但不限於)：調節免疫系統之因子、細胞介素、調節T細胞功能之因子、促進T細胞存活之因子、促進T細胞功能之因子或免疫檢查點抑制劑。蛋白編碼核苷酸序列，特別係分泌性蛋白或膜結合蛋白可包括編碼信號肽之核苷酸序列。信號肽對於由蛋白編碼核苷酸序列所編碼之蛋白可為內源性的。信號肽對於由蛋白編碼核苷酸序列所編碼之蛋白可為外源性的，諸如人類生長激素信號肽。

**【0280】** 在一些實例中，基因或其部分可為非蛋白編碼核苷酸序列。一般而言，可使用任何非蛋白編碼核苷酸。在一些情況下，非蛋白編碼核苷酸序列可為適用於自體細胞療法(例如自體T細胞療法)中之核苷酸序列。在一些情況下，非蛋白編碼核苷酸序列可包括(但不限於)shRNA、siRNA、miRNA及lncRNA。

**【0281】** 雖然編碼基因(例如所關注外源性基因)之至少一部分的核苷酸序列一般可為任何大小，但可考量實際考慮因素，諸如基因大小對總體模板大小及後續總體編輯效率之影響。因此，在一特定態樣中，本文中提供經基因組編輯或能夠經基因組編輯從而特別在使用非病毒傳遞方法時，以大於先前所描述彼等HR效率之HR效率(例如較大百分比之具有整合式聚核苷酸序列的群體)表現長度大於或等於100個鹼基之外源性基因的經修飾細胞。以類似方式將經改善之HR效率應用於長度大於100個鹼基之基因，諸如引入長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於400個鹼基、長度大於或等於500個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於

或等於750個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基、長度大於或等於1500個鹼基、長度大於或等於2000個鹼基、長度大於或等於3000個鹼基或長度大於或等於4000個鹼基之外源性序列。基因之至少一部分長度可大於或等於800個鹼基。基因之至少一部分長度可大於或等於1600個鹼基。

【0282】 外源性序列可長度在100個至200個鹼基之間、長度在100個至300個鹼基之間、長度在100個至400個鹼基之間、長度在100個至500個鹼基之間、長度在100個至600個鹼基之間、長度在100個至700個鹼基之間、長度在100個至800個鹼基之間、長度在100個至900個鹼基之間或長度在100個至1000個鹼基之間。外源性序列可長度在100個至2000個鹼基之間、長度在100個至3000個鹼基之間、長度在100個4000個鹼基之間、長度在100個至5000個鹼基之間、長度在100個至6000個鹼基之間、長度在100個至7000個鹼基之間、長度在100個至8000個鹼基之間、長度在100個至9000個鹼基之間或長度在100個至10,000個鹼基之間。外源性序列可長度在1000個至2000個鹼基之間、長度在1000個至3000個鹼基之間、長度在1000個至4000個鹼基之間、長度在1000個至5000個鹼基之間、長度在1000個至6000個鹼基之間、長度在1000個至7000個鹼基之間、長度在1000個至8000個鹼基之間、長度在1000個至9000個鹼基之間或長度在1000個至10,000個鹼基之間。

【0283】 外源性序列可長度大於或等於10個鹼基、長度大於或等於20個鹼基、長度大於或等於30個鹼基、長度大於或等於40個鹼基、長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於60個鹼基、長度大於或等於70個鹼基、長度大於或等於80個鹼基、長度大於或等於90個鹼基或長度大於或等於95個鹼基。外源性序列可長度在1個至100個鹼基之間、長度在1個至

90個鹼基之間、長度在1個至80個鹼基之間、長度在1個至70個鹼基之間、長度在1個至60個鹼基之間、長度在1個至50個鹼基之間、長度在1個至40個鹼基之間或長度在1個至30個鹼基之間。外源性序列可長度在1個至20個鹼基之間、長度在2個至20個鹼基之間、長度在3個至20個鹼基之間、長度在5個至20個鹼基之間、長度在10個至20個鹼基之間或長度在15個至20個鹼基之間。外源性序列可長度在1個至10個鹼基之間、長度在2個至10個鹼基之間、長度在3個至10個鹼基之間、長度在5個至10個鹼基之間、長度在1個至5個鹼基之間或長度在1個至15個鹼基之間。外源性序列長度可為15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個、50個、51個、52個、53個、54個、55個、56個、57個、58個、59個、60個、61個、62個、63個、64個、65個、66個、67個、68個、69個、70個、71個、72個、73個、74個、75個、76個、77個、78個、79個、80個、81個、82個、83個、84個、85個、86個、87個、88個、89個、90個、91個、92個、93個、94個、95個、96個、97個、98個、99個、100個、110個、115個、120個、125個、150個、175個、200個、225個或250個鹼基序列。外源性序列長度可為1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個或14個鹼基。

【0284】在實例中，引入多個外源性序列，該等多個外源性序列可為不同大小，例如第一外源性序列可大於或等於100個鹼基且第二外源性序列可大於或等於100個鹼基，或第一外源性序列可大於或等於100個鹼

基且第二外源性序列可小於100個鹼基(例如長度在1個至100個鹼基之間)。

【0285】 基因之至少一部分可在整合至內源性基因組標靶基因座中之後表現。

【0286】 在一些實例中，HR模板不編碼啟動子序列。編碼基因之至少一部分的核苷酸序列之表現可藉由內源性基因組標靶基因座內之內源性啟動子來定向，亦即基因之至少一部分經整合至內源性基因組標靶基因座中使得內源性啟動子以操作方式連接至基因之至少一部分。在一說明性實例中，編碼TCR之外源性序列可經整合至諸如編碼外顯子之TCR  $\alpha$  恆定區域的TCR基因組基因座中，以使得內源性TCR  $\alpha$  啟動子以操作方式連接至TCR。

【0287】 在一些實例中，HR模板編碼以操作方式連接至基因之至少一部分的外源性啟動子序列。外源性啟動子之實例包括(但不限於)：哺乳動物啟動子、人類啟動子、病毒啟動子、來自逆轉錄病毒或慢病毒之長末端重複序列(LTR)衍生啟動子、兩個啟動子之融合體、啟動子之兩個部分的融合體、MMLV LTR啟動子、HIV LTR啟動子、MCMV LTR啟動子、EF1a、MND、CMV、SV40、PGK1、Ubc、 $\beta$ -肌動蛋白、CAG、小分子誘導性啟動子、四環素誘導性啟動子、小分子條件性啟動子、Cre-LoxP條件性啟動子系統、Flp-FRT條件性啟動子系統及他莫昔芬條件性啟動子系統。外源性啟動子可為構成性的。外源性啟動子可為誘導性的，諸如藉由小分子(例如四環素及衍生物)誘導。外源性啟動子可為條件性的，諸如在基因組重排(例如Cre-LoxP及FLP-Frt系統)之後為活性的啟動子。外源性啟動子可為細胞型依賴型，亦即僅於特定細胞群中直接表現。外源性啟

動子可為哺乳動物的，包括人類。外源性啟動子可為病毒。

**【0288】** 外源性序列可具有連接子序列。舉例而言，外源性序列可具有在經整合至內源性基因組標靶基因座中之後將基因之至少一部分連接至內源性序列的連接子序列。連接子編碼可斷裂連接子多肽序列，其中在表現之後，可斷裂連接子多肽斷裂以使得產生僅藉由基因之至少一部分編碼的多肽作為分離多肽。可斷裂肽之實例包括弗林(Furin)斷裂位點及TEV斷裂位點。在一些實例中，可斷裂連接子包括進一步促進斷裂之多肽序列，此種可撓性連接子(例如Gly-Ser-Gly序列)。在另一實例中，連接子可編碼例如T2A、E2A、P2A及F2A之2A核糖體跳躍元件，以使得於翻譯期間產生僅藉由基因之至少一部分編碼的多肽作為分離多肽。在另一實例中，連接子可編碼內部核糖體入口位點(IRES)，以使得於翻譯期間產生僅藉由基因之至少一部分編碼的多肽作為分離多肽。連接子可編碼剪接受體，諸如病毒剪接受體。

**【0289】** HR模板可編碼作為分異於內源性核苷酸序列之密碼子的外源性聚核苷酸。舉例而言，密碼子分異序列可經過優化以促進所編碼蛋白之經增加表現的密碼子。密碼子分異序列可為經分異以移除可能導致基因組不穩定之序列元件的密碼子，該等序列元件諸如促進重組之序列元件(例如重組信號序列)。

### **多順反子及多啟動子系統**

外源性序列可為多順反子，亦即可自單個mRNA轉錄本產生超過一個分離多肽。外源性序列可為經由使用各種連接子之多順反子，例如編碼第一基因之至少一部分的核苷酸序列可連接至編碼第二基因之至少一部分的核苷酸序列，諸如按5'至3'之方向係呈第一基因：連接子：第二基因之

形式。舉例而言，連接子可編碼可斷裂連接體多肽序列，其中在表現之後，可斷裂連接體多肽斷裂以使得產生由第一及第二基因編碼之分離多肽。可斷裂肽之實例包括弗林斷裂位點及TEV斷裂位點。在一些實例中，可斷裂連接子包括進一步促進斷裂之多肽序列，此種可撓性連接子(例如Gly-Ser-Gly序列)。在另一實例中連接子可編碼例如T2A、E2A、P2A及F2A之2A核糖體跳躍元件，以使得於翻譯期間產生由第一及第二基因編碼之分離多肽。在另一實例中，連接子可編碼內部核糖體入口位點(IRES)，以使得於翻譯期間產生由第一及第二基因編碼之分離多肽。連接子可編碼剪接受體，諸如病毒剪接受體。一般而言，多順反子系統可使用諸如上文所描述之彼等的任何數目之連接子或連接子之組合，從而表現任何數目之基因或其部分(例如外源性序列可編碼各自藉由連接子分離之第一、第二及第三基因以使得產生由第一、第二及第三基因編碼之分離多肽。在使用相同連接子之倍數的多順反子系統中，連接子可編碼相同多肽序列但具有密碼子分異核苷酸序列。

**【0290】** 外源性序列可具有多個開放讀框(ORF)，亦即可自外源性序列產生超過一個分離mRNA轉錄本。外源性序列可具有經由使用多個啟動子之多個ORF，例如第一啟動子能夠以操作方式連接至編碼第一基因之至少一部分的核苷酸序列，且第二啟動子能夠以操作方式連接至編碼第二基因之至少一部分的核苷酸序列。如本文中所使用，「連接子」可指代上文所描述之多順反子連接子、以操作方式連接至上文所描述之額外ORF的額外啟動子或指代使第一多肽序列與第二多肽序列相連接之多肽。

**【0291】** 第二基因可為本文中所描述的外源性序列中之任一者(見外源性序列區段)。

## 額外反應劑

【0292】 在一些實例中，經修飾細胞(或待經修飾之細胞)可與促進HDR修復(亦即增加同源性重組率及/或效率)之反應劑接觸(例如與反應劑一起培養)，該促進HDR修復包括相對於諸如NHEJ之其他DNA修復路徑促進HDR修復。促進HDR修復之反應劑包括(但不限於)同源重組之活化因子修復路徑、非同源末端連接(NHEJ)修復路徑的抑制劑或其組合。

【0293】 一般而言，本文中所描述之細胞修飾及編輯技術可能對經修飾細胞有毒性(亦即降低經修飾細胞之生存力)。因此，在一些情況下，提供能夠增加經修飾細胞之生存力的反應劑對於總體編輯效率，特別係HR編輯效率可為有利的。能夠增加生存力之反應劑可包括核酸感測途徑之抑制劑，諸如TLR9核酸感測途徑、AIM2核酸感測途徑、IFI16核酸感測途徑、cGAS核酸感測途徑及胞漿核酸感測途徑之抑制劑。在不希望受理論束縛之情況下，核酸感測途徑之此等抑制劑可降低對各種所引入(亦即所傳遞)核酸(例如HR模板及sgRNA)作出反應之細胞反應(例如固有免疫信號傳導途徑)，且細胞反應之降低可改善生存力。在一說明性實例中，能夠增加生存力之反應劑可為寡核苷酸拮抗劑，諸如擁有串疊型重複序列TTAGGG之拮抗劑A151。能夠增加生存力之反應劑可包括除提供於細胞培養基中之彼等以外之因子，諸如修飾T細胞以表現生存力因子(例如促進細胞存活之因子)，例如更詳細地描述於Portt等人(*Biochim Biophys Acta*.2011年1月；1813(1)：238-59)中之彼等，其所教示之全部內容以引用的方式併入本文中。

## 經修飾T細胞

【0294】 在一特定態樣中，經修飾細胞為經修飾T細胞。大體而

言，經修飾T細胞可經修飾以使得其在任何內源性基因組靶標基因座處在基因學上經編輯，或能夠在基因學上經編輯。內源性基因組靶標基因座可為內源性TCR基因座。內源性TCR基因座可為TCR- $\alpha$ 基因座或TCR- $\beta$ 基因座。內源性基因組靶標基因座可為免疫檢查點基因座，諸如PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM3、LAG3及VISTA基因座。

【0295】大體而言，經修飾T細胞可經修飾以使得其在基因學上經編輯，或能夠在基因學上經編輯，以表現任何相關外源性基因。舉例而言，相關外源性基因(「基因之至少一部分」)可包括TCR基因(諸如TCR- $\alpha$ 或TCR- $\beta$ 基因或其部分)之至少一部分。TCR基因可包括TCR- $\alpha$ 基因及TCR- $\beta$ 基因兩者。TCR- $\alpha$ 基因及TCR- $\beta$ 基因可藉由連接子(參見多順反子系統中之上文所描述之連接子)連接。TCR基因可包括TCR- $\gamma$ 或TCR- $\delta$ 基因或其部分。TCR基因可包括TCR- $\gamma$ 基因及TCR- $\delta$ 基因兩者。TCR基因可包括但不限於：鼠化TCR；人源化TCR；域交換TCR；點突變TCR；工程改造TCR，其具有能夠形成二硫鍵聯之工程改造半胱胺酸；密碼子優化TCR，其經優化以用於在人體內表現；序列優化TCR，其經優化以用於RNA不穩定性元素之密碼子使用度及移除；TCR基因之可變區序列；嵌合抗原受體(CAR)；或單鏈TCR。TCR基因可包括以下之至少一部分：鼠化TCR；人源化TCR；域交換TCR；點突變TCR；工程改造TCR，其具有能夠形成二硫鍵聯之工程改造半胱胺酸；密碼子優化TCR，其經優化以用於在人體內表現；序列優化TCR，其經優化以用於RNA不穩定性元素之密碼子使用度及移除；TCR基因之可變區序列；嵌合抗原受體(CAR)；或單鏈TCR。TCR基因可包括經工程改造以展現相對於內源性TCR多肽序列而言與第二外源性TCR多肽序列之更大結合的TCR基因，諸如經工程改造

以展現相對於內源性TCR多肽序列而言與彼此之更大結合的TCR- $\alpha$ 多肽序列及TCR- $\beta$ 多肽序列。

【0296】 在一特定態樣中，經修飾T細胞具有：a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；c)編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列；d)編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列。在一個實例中，經編碼多肽序列自N端至C端之方向為連接子:TCR- $\alpha$ :第二連接子:TCR- $\beta$ 。在一個實例中，經編碼多肽序列自N端至C端之方向為連接子:TCR- $\beta$ :第二連接子:TCR- $\alpha$ 。

【0297】 TCR基因可為識別呈現於MHC上之疾病特異性抗原決定基的TCR (例如，經連接之TCR- $\alpha$ 及TCR- $\beta$ 結構)。TCR基因可為識別呈現於MHC對偶基因上之癌症特異性抗原決定基的TCR (例如，TCR- $\alpha$ 及TCR- $\beta$ 鏈兩者)，諸如識別呈現於MHC對偶基因上之癌症特異性新抗原決定基(新抗原)的TCR。大體而言，TCR識別係指TCR以足夠的親和力結合抗原-MHC複合物以使得TCR結合或多個TCR結合之組合(亦即，TCR群聚)可導致免疫應答。用於鑑別識別新抗原決定基，特定言之患者特異性新抗原決定基之TCR的方法及組合物更詳細地描述於WO2018165475中，其以全文引用之方式併入本文中。另外，適用於鑑別新抗原特異性T細胞是否存在於患者樣本中之方法可與本文所描述之方法組合使用，例如，如美國公開案第2017/0003288號及PCT/US17/59598中所描述，其以全文引用之方式併入本文中。

【0298】 大體而言，經修飾T細胞可為任何T細胞。經修飾T細胞可為人類T細胞。經修飾T細胞可為源自人類之T細胞，諸如永生化T細胞或活體外發育之T細胞(例如，經胸腺器官培養物發育之細胞)。經修飾T細胞

可為細胞毒性T淋巴細胞(CTL)、CD8<sup>+</sup> T細胞、CD4<sup>+</sup> T細胞、初代T細胞、腫瘤浸潤性T細胞或工程改造T細胞。經修飾T細胞可為調節T細胞(Treg)、輔助T細胞(例如，Th1細胞、Th2細胞或Th17細胞)、 $\alpha$ - $\beta$  T細胞或 $\gamma$ - $\delta$  T細胞。經修飾T細胞可為原生T細胞、幹細胞記憶T細胞、中心記憶T細胞、移行記憶T細胞、效應記憶T細胞或效應T細胞。經修飾T細胞可為初代T細胞。

**【0299】** 經修飾T細胞，諸如初代T細胞，可自個體(諸如已知或疑似患有癌症之個體)分離。T細胞分離方法為熟習此項技術者所知且包括但不限於：基於細胞表面標記物表現之分選技術(諸如FACS分選)、陽性分離技術(例如，CD4及/或CD8 MACS®)及陰性分離(例如，CD3 MACS®)、磁性分離及其組合。用以分離T細胞之來源包括但不限於血液、PBMC、藉由血球分離術收集之血液(例如，leukopak)及腫瘤組織。

**【0300】** 經修飾T細胞可為培養T細胞，諸如活體外培養T細胞。經修飾T細胞可為活體外培養初代T細胞，諸如自個體分離之初代T細胞。培養T細胞可與一或多種細胞介素一起培養。培養T細胞可與IL2、IL7、IL15或其組合一起培養。舉例而言，培養T細胞可與IL2一起培養。在另一實例中，培養T細胞可與IL7及IL15一起培養。在另一實例中，培養T細胞可與IL2、IL7及IL15一起培養。在另一實例中，培養T細胞可在不存在(基本上不含) IL2的情況下與IL7及IL15一起培養。在另一實例中，培養T細胞可單獨與IL21一起培養以用於與IL2、IL7及/或IL15組合(例如，與IL2組合，與IL7組合，與IL15組合，或與IL7及IL15組合)。培養T細胞可用一或多個刺激分子(例如，受體促效劑)刺激，例如，與該等分子一起培養。刺激分子包括但不限於CD3及CD28。在一實例中，培養T細胞可用

CD3刺激(受CD3刺激之T細胞)。在另一實例中，培養T細胞可用CD28刺激(受CD28刺激之T細胞)。在另一實例中，培養T細胞可用CD3及CD28兩者刺激(受CD3及CD28刺激之T細胞)。刺激分子可固定於表面上，諸如培養盤之表面(培養盤結合)或珠粒之表面(珠粒結合)。

【0301】 在一說明性實例中，經修飾T細胞可為在基因學上經編輯以表現識別特異性抗原決定基(亦即，抗原)之TCR的初代T細胞，該特異性抗原決定基諸如腫瘤抗原、新抗原、腫瘤新抗原、病毒抗原、磷酸抗原、細菌抗原、微生物抗原或其組合。

【0302】 在一說明性實例中，經修飾T細胞可為在基因學上經編輯以表現識別癌症特異性抗原決定基之TCR的初代T細胞，該TCR諸如識別呈現於MHC對偶基因上之癌症特異性新抗原決定基(新抗原)的TCR。如本文中所使用，術語「新抗原」為具有至少一個改變的抗原，該改變使得其例如經由腫瘤細胞中之突變或特異性針對腫瘤細胞之轉譯後修飾而不同於對應的野生型親本抗原。新抗原可包括多肽序列或核苷酸序列。突變可包括讀框轉移或非讀框轉移插入缺失、誤義或無意義取代、剪接位點改變、基因組重排或基因融合、或產生neoORF之任何基因組或表現改變。突變亦可包括剪接變異體。特異性針對腫瘤細胞之轉譯後修飾可包括異常磷酸化。特異性針對腫瘤細胞之轉譯後修飾亦可包括蛋白酶體產生之剪接抗原(參見Liepe等人, A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides: Science. 2016年10月21日 ;354(6310):354-358)。可藉由分析來自個體之腫瘤、病毒或細菌定序資料以鑑別一或多個個體細胞突變，諸如使用電腦模擬預測演算法分析定序資料來選擇新抗原。預測演算法可為預測個體之新抗原與MHC對偶基因之間的結合之

MHC結合演算法。

【0303】在另一說明性實例中，經修飾T細胞可為自個體分離且在基因學上經編輯以表現識別癌症特異性抗原決定基之TCR的初代T細胞，該TCR諸如識別呈現於個體之MHC對偶基因上之癌症特異性新抗原決定基(新抗原)的TCR。

【0304】在另一說明性實例中，經修飾T細胞可為自個體分離且在基因學上經編輯以表現識別癌症特異性抗原決定基之TCR的初代T細胞，該TCR諸如識別經預測呈現於個體之MHC對偶基因上之癌症特異性新抗原決定基(新抗原)的TCR。MHC呈現預測方法為熟習此項技術者所知且包括但不限於：經由利用質譜法及MHC呈現預測(例如，美國公開案第2017/0199961號，其全部教示內容以引用之方式併入本文中)組合定序資料，及利用MHC結合親和力預測(例如，美國專利9,115,402所頒佈，其全部教示內容以引用之方式併入本文中)組合定序資料來鑑別新抗原。

【0305】在另一說明性實例中，經修飾T細胞可為與個體同種異體且在基因學上經編輯以表現識別癌症特異性抗原決定基之TCR的初代T細胞，該TCR諸如識別呈現於個體之MHC對偶基因上之癌症特異性新抗原決定基(新抗原)的TCR。可將同種異體T細胞HLA分型且匹配(HLA匹配)至個體，諸如在需要減小由於投與經修飾T細胞而產生之免疫原性的實例中。人類白血球抗原(HLA)分型可自患者之腫瘤或血液樣本測定。通常發現於人類種群中之HLA亦可包括於新抗原預測演算法中，諸如HLA-A\*02, 24, 01；HLA-B\*35, 44, 51；高加索人中之DRB1\*11, 13, 07；HLA-A\*02, 03, 30；HLA-B\*35, 15, 44；非洲巴西人中之DRB1\*13, 11, 03及HLA-A\*24, 02, 26；HLA-B\*40, 51, 52；亞洲人中之DRB1\*04, 15,

09。亦可使用HLA對偶基因之特異性配對。發現於人類種群中之常見對偶基因進一步描述於Bardi等人(Rev Bras Hematol Hemoter. 2012; 34(1): 25-30)中，其全部教示內容以引用之方式併入本文中。HLA資訊可與鑑定為用於MHC結合之預測演算法中之推定的新抗原肽序列一起使用，如Fritsch等人, 2014, *Cancer Immunol Res.*, 2:522-529中更詳細地描述，其全部內容以引用之方式併入本文中。

### 經修飾初代細胞

**【0306】** 在一特定態樣中，經修飾細胞為經修飾初代細胞。大體而言，經修飾初代細胞可經修飾以使得其在任何內源性基因組靶標基因座處在基因學上經編輯，或能夠在基因學上經編輯。大體而言，經修飾初代細胞可經修飾以使得其在基因學上經編輯，或能夠在基因學上經編輯，以表現任何相關外源性基因。

**【0307】** 大體而言，經修飾初代細胞可為任何初代細胞。例示性初代細胞包括幹細胞、人類幹細胞、胚胎幹細胞及免疫細胞(例如，造血細胞)。免疫細胞之實例包括(但不限於)B細胞、T細胞、單核球、巨噬細胞、樹突狀細胞及天然殺手(NK)細胞。免疫細胞可為NK細胞。免疫細胞可為NK-T細胞。免疫細胞可包括後天免疫系統及/或先天免疫系統之細胞。包括人類幹細胞之幹細胞可為造血幹細胞。

**【0308】** 經修飾初代細胞可為人類初代細胞。經修飾初代細胞可為腫瘤浸潤性初代細胞或工程改造初代細胞。經修飾初代細胞可為初代T細胞。經修飾初代細胞可為造血幹細胞(HSC)。經修飾初代細胞可為天然殺手細胞。經修飾初代細胞可為任何體細胞。

**【0309】** 經修飾初代細胞可自個體(諸如已知或疑似患有癌症之個

體)分離。初代細胞分離方法為熟習此項技術者所知且包括但不限於：基於細胞表面標記物表現之分選技術(諸如FACS分選)、陽性分離技術及陰性分離、磁性分離及其組合。

【0310】經修飾初代細胞可為培養初代細胞，諸如活體外培養初代細胞。經修飾初代細胞可為活體外培養初代細胞，諸如自個體分離之初代細胞。培養初代細胞可與一或多種細胞介素一起培養。

### 針對同源性修復之細胞編輯方法

【0311】在一個態樣中，提供用於基因修飾細胞之方法。

【0312】用於基因修飾細胞之方法可包括：提供本文中所描述之HR模板中之任一者，提供本文中所描述之核酸酶組合物中之任一者，使本文中所描述之細胞(例如，T細胞、初代細胞、HSC或NK細胞)中之任一者與HR模板及核酸酶組合物接觸，以及將HR模板及核酸酶組合物傳遞至細胞中，特定言之藉由除病毒介導之傳遞以外的傳遞手段。在使細胞與HR模板及核酸酶組合物接觸與傳遞步驟之間的接觸步驟可小於60分鐘、小於45分鐘、小於30分鐘、小於20分鐘、小於15分鐘、小於10分鐘、或小於5分鐘、或小於1分鐘。傳遞手段可包括經描述用於傳遞本文中所描述之CRISPR介導之系統的方法中之任一者，諸如用於傳遞本文中所描述之RNP複合物之方法。如上文所描述，可將多個HR模板及/或核酸酶組合物傳遞至細胞中，諸如將多個HR模板及/或核酸酶組合物同時傳遞至細胞中。

【0313】不希望受理論所束縛，一般而言(及如在HR模板純度的上下文中所論述)，在編輯過程中引入之雜質及污染物可導致經修飾細胞之編輯效率及/或經修飾細胞之生存力降低。舉例而言，來自培養細胞之殘

餘培養基可引入編輯過程中之雜質及污染物。因此，用於基因修飾細胞之方法可包括用以最小化或消除殘餘培養基之步驟。

【0314】 在一說明性實例中，用於基因修飾人類初代T細胞(例如，自人類個體分離之T細胞)之方法可包括：提供編碼完整TCR (TCR- $\alpha$ 及TCR- $\beta$ 兩者)之HR模板、能夠靶向TCR基因座(例如，TCR- $\alpha$ 恆定基因座)之CRISPR RNP複合物，以及使用電穿孔將HR模板及RNP錯合物傳遞至T細胞中。

【0315】 亦提供可產生經修飾細胞群之方法，經修飾細胞群諸如本文中所描述之經修飾細胞群中之任一者。

## 治療方法

【0316】 在一個態樣中，亦提供治療方法。舉例而言，提供患有癌症之個體之治療方法。在另一實例中，基因可經校正(例如，替換，亦已知基因療法或基因替換療法)，諸如用功能基因(例如，用於紅血素病之HSC)替換非功能基因。本發明之該等方法包括投與治療有效量之經修飾細胞，諸如基因學上經編輯之細胞(例如，基因學上經編輯之T細胞)。經修飾細胞可調配於醫藥組合物中。除了經修飾細胞中之一或多者以外，此等組合物亦可包含醫藥學上可接受之賦形劑、載劑、緩衝劑、穩定劑或熟習此項技術者所熟知之其他材料。該等材料應為無毒的且不應干擾活性成分之效能。載劑或其他材料之精確性質可視投與途徑而定，例如靜脈內投與。

【0317】 經修飾細胞可自正投與治療(自體性)之個體導出(例如，分離)。

【0318】 經修飾細胞可與正投與治療之個體同種異體。可將同種異

體經修飾細胞HLA匹配至正投與如上文所描述之治療之個體。

【0319】 經修飾細胞可單獨或與其他治療組合視待治療之病狀而定同時或依序投與。

### 核苷酸組合物

【0320】 本文中描述適用於本發明之基因(例如基因、載體、外源性序列、表現構築體、HR模板)之多肽及核酸序列。適用於本發明之多肽及核酸序列與本文中所描述或本文中由資料庫寄存編號所提及之序列至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%一致。適用於本發明之多肽及核酸序列可與本文中所描述或本文中由資料庫寄存編號所提及之序列100%一致。

【0321】 在兩個或更多個核酸或多肽序列之上下文中，術語「一致性百分比」係指兩個或更多個序列或子序列如使用下文所描述之序列比較演算法(例如，BLASTP及BLASTN或技術人員可用之其他算法)中之一者或藉由目視檢查所量測，當比較及比對最大對應性時，具有指定百分比之相同核苷酸或胺基酸殘基。視應用而定，「一致性」百分比可存在於所比較之序列區域上，例如功能域上，或者，存在於待比較之兩個序列的全長度上。對於序列比較，通常以一個序列作為與測試序列進行比較之參考序列。當使用序列比較演算法時，將測試及參考序列輸入電腦，必要時指定子序列座標，且指定序列算法程式參數。接著，序列比較演算法即依據所指定之程式參數來計算測試序列相對於參考序列之序列一致性百分比。進行比較之序列之最佳比對可以：例如藉由Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)之局部同源演算法，藉由Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)之同源比對演算法，藉由Pearson & Lipman,

Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)之用於相似性方法之檢索，藉由電腦執行此等演算法(GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)，或藉由目視檢查(通常參見Ausubel等人)。適用於確定序列一致性百分比及序列相似性之算法的一個實例為BLAST算法，該算法描述於Altschul等人, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)中。用於執行BLAST分析之軟體可經由國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/))公開獲得。

【0322】 在一個態樣中，提供用於在內源性基因組靶標基因座處導引同源重組之核苷酸組合物，諸如本文中所描述之HR模板中之任一者。

【0323】 在一個實例中，用於在內源性基因組靶標基因座處導引同源重組之核苷酸組合物(亦即HR模板)包含：a)編碼基因之至少一部分的核苷酸序列；b)與內源性基因組靶標基因座之第一區域一致的核苷酸序列；及c)與內源性基因組靶標基因座之第二區域一致的核苷酸序列，其中基因之至少一部分的長度為100個鹼基，所有核苷酸序列在單一聚核苷酸上，與內源性基因組靶標基因座之第一及第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於在內源性基因組靶標基因座處同源重組，且編碼基因之至少一部分的核苷酸序列之取向可以使得基因之至少一部分能夠在將組合物整合至內源性基因組靶標基因座中之後表現。核苷酸組合物可為環狀的。

## 實例

【0324】 下文為執行本發明之特定實施例之實例。該等實例僅出於說明性目的而提供，且不意欲以任何方式限制本發明之範疇。已努力確保

所用數字及順序的精確性(例如量、溫度等)，但當然應允許一些實驗性誤差及偏差。

【0325】除非另外指明，否則本發明之實踐將採用此項技術之技能範圍內的蛋白質化學、生物化學、重組DNA技術及藥理學之習知方法。在文獻中完全解釋此類技術。參見例如T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993)；A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc.，現行版)；Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版, 1989)；*Methods In Enzymology* (S. Colowick及N. Kaplan編, Academic Press, Inc.)；*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第18版(Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990)；Carey及Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 第3版. (Plenum Press)第A卷 及 第B卷 (1992)。

#### 實例1：用於使用CRISPR進行T細胞編輯之方法及材料

【0326】在下文描述用以將相關基因(亦即，「在基因的一部分處」)併入內源性基因組靶標基因座及分析該等基因之方法及材料。

#### T細胞

【0327】根據標準菲科爾分離方法(Ficoll isolation method)將PBMC自血液(例如，藉由血球分離術收集之leukopak)分離。遵循標準方法將分離之PBMC以等分試樣冷凍。作為標準方法之部分，將冷凍的人類外周血液單核細胞(PBMC)解凍，並且作為標準基因編輯方法之部分，用培養基(TexMACS，3%人類血清，無細胞介素)培養。在方法之變化形式中，購買冷凍的PBMC (AllCells)。第二天，作為標準基因編輯方法之部

分，遵循製造商之方法，藉由使用磁性珠粒(Miltenyi)進行陽性選擇來富集CD8及CD4陽性T細胞。在方法之變化形式中，使用CD3陰性選擇或CD62L陽性選擇富集細胞，如下文所指示。作為標準基因編輯方法之部分，將所富集之細胞在電穿孔程序(參見下文)之前用在製造商建議下以1:17.5之比率使用之TransAct (CD3/CD28反應劑，Miltenyi)刺激48至72小時，且用培養基(TexMACS，各自含有12.5ng/mL IL-7及IL-15之3%人類血清)培養。

【0328】在指示患者/供體PBMC分離的情況下，藉由患者血球分離術收集細胞之leukopak。作為標準基因編輯方法之部分，接著將leukopak冷凍且隨後視需要解凍，或在方法之變化形式中如所指示保持在2-8°C (新鮮)。第二天，藉由使用Prodigy平台(Miltenyi)進行陽性選擇來富集CD8及CD4陽性T細胞。所富集之細胞如上培養。

### **同源重組(HR) 模板**

【0329】如所提及般使用Nanoplasמידs™ (Nature Technology) (HR模板標示為「NTC」)。Nanoplasמיד™為Nature Technology Corp.之商標。不含抗生素之RNA-OUT選擇載體及細胞株由世界專利申請案WO2008153733及由分別為US 2010/0303859；EP2333091；及AU 2008262478之等效的美國、歐洲及澳大利亞專利涵蓋，其全部教示內容以全文引用之方式併入本文中。Nanoplasמיד™載體及細胞株另外由以下在專利合作條約下之世界專利涵蓋：PCT/US 13/000259；PCT/US 13/00067；及PCT/US 13/00068，其全部教示內容以全文引用之方式併入本文中。

【0330】亦如所提及般使用含有來源於pUC57載體之PBR322複製起

點及康微素(Kanamycin，Kan)抗生素抗性標記物之標準質體(HR模板標示為「pUCu」)。移除除了抗生素抗性標記物及複製起點以外的額外序列。

【0331】 在有指示的情況下，購買(Nature Technology)經純化HR模板或遵循製造商之方法(Maxi套組，Macherey Nagel)使用標準DNA純化技術將其「內部」純化。

【0332】 所用HR模板描述於表4中。除非另外提及，否則所提供之序列包括具有同源臂、基因卡匣及質體主鏈之完整HR模板。

表4：同源修復模板序列

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NTC9385R-TRAC(1k) P2A.ZsGreen.f-P2A.LNGFRt.BGHpA (SEQ ID NO: 8)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| CCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTGGCTTGTTGTCCACAACCGTTAAACCTTAAAAGCT<br>TTAAAAGCCTTATATATTCTTTTTTTTCTTATAAACTTAAACCTTAGAGGCTATTTAAGT<br>TGCTGATTTATATTAATTTTATTGTTCAAACATGAGAGCTTAGTACGTGAAACATGAGAGC<br>TTAGTACGTTAGCCATGAGAGCTTAGTACGTAGCCATGAGGGTTTAGTTCGTAAACAT<br>GAGAGCTTAGTACGTAAACATGAGAGCTTAGTACGTACTATCAACAGGTTGAACTGCT<br>GATCCACGTTGTGGTAGAATTGGTAAAGAGAGTCGTGTAAAATATCGAGTTCGCACATCT<br>TGTTGTCTGATTATTGATTTTTGGCGAAACCATTTGATCATATGACAAGATGTGTATCTAC<br>CTTAACCTAATGATTTTGATAAAAATCATTAGGTACCACATTAAAAACACAAAATCCTACG<br>GAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAAAGCCTCCAGCAGCTCCTGCTTTCT<br>GAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGACTCACTAGCACTCTATCACGGCCAT<br>ATTCTGGCAGGGTCAGTGGCTCCAACTAACATTTGTTTGGTACTTTACAGTTTATTAATA<br>GATGTTTATATGGAGAAGCTCTCATTCTTTCTCAGAAGAGCCTGGCTAGGAAGGTGGAT<br>GAGGCACCATATTCATTTTGCAGGTGAAATTCCTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTG<br>CTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTT<br>ATAGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAA<br>CTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGA<br>CCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTT<br>ACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAG<br>CAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCG<br>TGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGA<br>GTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGA<br>CCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCATCACTGGCATCTGGACTCCA<br>GCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTCTTGTCCT<br>ACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGA<br>CAAGTCTGTCTGCCTATTTCGAATTCGGCTCCGGAGCCACTAATTCTCCCTGTTGAAACA<br>GGCTGGCGATGTTGAAGAAAACCCCGGTCCTATGGCCCAGTCCAAGCACGGCCTGACC<br>AAGGAGATGACCATGAAGTACCGCATGGAGGGCTGCGTGGACGGCCACAAGTTCGTGA<br>TCACCGGCGAGGGCATCGGCTACCCCTTCAAGGGCAAGCAGGCCATCAACCTGTGCGT<br>GGTGGAGGGCGGCCCTTGCCCTTCGCCGAGGACATCTTGTCGCCGCCCTTCATGTACG<br>GCAACCGCGTGTTACCGAGTACCCCCAGGACATCGTGGACTACTTCAAGAACTCCTGC<br>CCCGCCGATACACCTGGGACCGCTCCTTCCTGTTTCGAGGACGGCGCCGTGTGCATCTG |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CAACGCCGACATCACCGTCAGCGTGGAGGAGAACTGCATGTACCACGAGTCCAAGTTCT<br>ACGGCGTGAAC TTCCCCGCCGACGGCCCCGTGATGAAGAAGATGACCGACAAC TGGGA<br>GCCCTCCTGCGAGAAGATCATCCCCGTGCCCAAGCAGGGCATCTTGAAGGGCGACGTCA<br>GCATGTACCTGCTGCTGAAGGACGGTGGCCGCTTGCGCTGCCAGTTCGACACCGTGTAC<br>AAGGCCAAGTCCGTGCCCCGCAAGATGCCCCGACTGGCACTTCATCCAGCACAAAGCTGA<br>CCCGCGAGGACCGCAGCGACGCCAAGAACCAGAAGTGGCACCTGACCGAGCACGCCA<br>TCGCCTCCGGCTCCGCCTTGCCCCGGGCCAAGCGGGGCAGCGGCGCCACCAACTTCAG<br>CCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCTATGGGGGCAGGTGCC<br>ACCGGCCGCGCTATGGACGGGGCCGCGCCTGCTGCTGTTGCTGCTTCTGGGGGTGTCCCT<br>TGGAGGTGCCAAGGAGGCATGCCCCACAGGCCTGTACACACACAGCGGTGAGTGCTGC<br>AAAGCCTGCAACCTGGGCGAGGGTGTGGCCCAGCCTTGTGGAGCCAACCAGACCGTGT<br>GTGAGCCCTGCCTGGACAGCGTGACGTTCTCCGACGTGGTGAGCGCGACCGAGCCGTG<br>CAAGCCGTGCACCGAGTGCGTGGGGCTCCAGAGCATGTGCGCGCCGTGCGTGGAGGCC<br>GACGACGCCGTGTGCCGCTGCGCCTACGGCTACTACCAGGATGAGACGACTGGGCGCT<br>GCGAGGCGTGCCGCGTGTGCGAGGCGGGCTCGGGCCTCGTGTTCTCCTGCCAGGACAA<br>GCAGAACACCGTGTGCGAGGAGTGCCCCGACGGCACGTATTCCGACGAGGCCAACCA<br>GTGGACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCGAGCGCCAGCTCCGCGAGT<br>GCACACGCTGGGCCGACGCCGAGTGCGAGGAGATCCCTGGCCGTTGGATTACACGGTC<br>CACACCCCCAGAGGGCTCGGACAGCACAGCCCCCAGCACCCAGGAGCCTGAGGCACCT<br>CCAGAACAAAGACCTCATAGCCAGCACGGTGGCAGGTGTGGTGACCACAGTGATGGGCA<br>GCTCCCAGCCCGTGGTGACCCGAGGCACCACCGACAACCTCATCCCTGTCTATTGCTCC<br>ATCCTGGCTGCTGTGGTTGTGGGTCTTGTGGCCTACATAGCCTTCAAGAGGTAACTCGAG<br>TGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCT<br>GGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCT<br>GAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGAT<br>TGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCGCGGCCGCACC<br>GATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGAC<br>AAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGA<br>GCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGAC<br>ACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCT<br>TCAGGAATGGCCAGGTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACCTCCTCTGATT<br>GGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCCTCTTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCC<br>TTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCA<br>GGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTT<br>GCTCAGACTGTTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTT<br>GCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCAGCTCACTAAGTCAGTCTC<br>ACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGT<br>GTTGAAGTGGAGGAATAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTC<br>TAGTTGGGGGAGCCCATCTGTGAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGT<br>GTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTC<br>TCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATA<br>GAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGAGAAGAGCAGCAGGCATGAGTTGAAT<br>GAAGGAGGCAGGGCCGGGTACAGGGCCTTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAGGCTAG<br>C |
| NTC9385R-TRAC(1k)DTS_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHPA (SEQ ID NO: 9)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| CCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTGGCTTGTTGTCCACAACCGTTAAACCTTAAAAGCT<br>TTAAAAGCCTTATATATTCTTTTTTTTCTTATAAACTTAAACCTTAGAGGCTATTAAAGT<br>TGCTGATTTATATTAATTTTATTGTTCAAACATGAGAGCTTAGTACGTGAAACATGAGAGC<br>TTAGTACGTTAGCCATGAGAGCTTAGTACGTTAGCCATGAGGGTTTAGTTGTTAAACAT<br>GAGAGCTTAGTACGTTAAACATGAGAGCTTAGTACGTACTATCAACAGGTTGAACTGCT<br>GATCCACGTTGTGGTAGAATTGGTAAAGAGAGTCGTGTAAAATATCGAGTTCGCACATCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

TGTTGTCTGATTATTGATTTTTGGCGAAACCATTTGATCATATGACAAGATGTGTATCTAC  
CTTA ACTTAATGATTTTGATAAAAATCATTAGGTACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCA  
TGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCCATGGACATTA  
AAAACACAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAAAGCCT  
CCAGCAGCTCCTGCTTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGACTCACT  
AGCACTCTATCACGGCCATATTCTGGCAGGGTCAGTGGCTCCA ACTAACATTTGTTTGGT  
ACTTTACAGTTTATTAATAAGATGTTTATATGGAGAAGCTCTCATTCTTTCTCAGAAGAG  
CCTGGCTAGGAAGGTGGATGAGGCACCATATTCATTTTG CAGGTGAAATTCCTGAGATGT  
AAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTT  
AGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGG  
TAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGC  
CCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGC  
CTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATC  
CTATTAATAAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAGGTTTCCTTGAGT  
GGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGA  
TAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTAT  
TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTTCCA  
TCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCT  
AACCCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGA  
GAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTTCGAATTCGGCTCCGGAGCCACTA  
ACTTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAGAAAACCCCGGTCCCTATGGCCACC  
GGCTCTAGAACAAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCCATGTCTCCAAGA  
GGGATCTGCCGGCATTACACAGGCCCTACATCTCAGATTCTGGCCGCTGGCAGACGGA  
TGACACTGAGATGCACCCAGGACATGAGACACAACGCCATGTACTGGTATCGGCAGGAC  
CTCGGCCTGGGACTGAGACTGATCCACTACTCTAATACCGCCGGCACCACCGGCAAAGG  
CGAAGTGCCTGATGGCTACTCCGTGTCCAGAGCCAATACCGACGACTTCCC ACTGACAC  
TGGCCTCTGCTGTGCCTAGCCAGACCTCCGTGTACTTCTGTGCCAGCAGCCTGTCTTTG  
GCACCGAGGCCTTTTTTCGGCCAAGGCACCAGACTGACCGTGGTGGAAGATCTGAACAA  
AGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCCACACAC  
AGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCTACCGGCTTCTTCCCCGATCACGTGGA ACTGTCT  
TGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTCTGA  
AAGAACAGCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCTGTCTAGCAGACTGAGAGTGTC  
CGCCACCTTCTGGCAGAACCC CAGAAACCACTTCAGATGCCAGGTCCAGTTCTACGGCC  
TGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGAAAGAGAGCCAAGCCTGTGACACAGATCGTGTCT  
TGCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGTGTCTATACCAGCAGGGCG  
TGCTGTCTGCCACCATCCTGTATGAGATCCTGCTCGGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGC  
TGGTGTCTGCTCTGGTGCTGATGGCTATGGTCAAGCGGAAGGACTTCCGGGGCCAAGCGG  
GGCAGCGGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAAC  
CCCGGCCCTATGGCCACAGGCAGCAGAACATCTCTGCTGCTGGCCTTCCGACTGCTGTG  
TCTGCCTTGGCTGCAAGAGGCTTCCGCCCAGCAGAAAGAGGTGGAACAGAATAGCGGC  
CCTCTGAGCGTTCCAGAAGGCGCTATCGCCAGCCTGAACTGCACCTACAGCGATAGAGG  
CAGCCAGAGCTTCTTCTGGTACAGACAGTACAGCGGCAAGAGCCCCGAGCTGATCATGT  
TCATCTACAGCAACGGCGACAAAGAGGACGGCCGGTTTACAGCCCAGCTGAACAAGGC  
CAGCCAATACGTGTCCCTGCTGATCAGAGATAGCCAGCCTAGCGACAGCGCCACCTATC  
TGTGCGCCGTGAATTTTGGCGGCGGAAAGCTGATCTTTGGCCAGGGCACAGAGCTGAG  
CGTGAAGCCCAACATTCAGAACCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACAGCAAG  
AGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTCAACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCC  
AGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGACAAGACCGTGCTGGACATGCGGAGCAT  
GGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGATTTCGCCTGCGCC  
AACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGTCCTGAGAGCAG  
CTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAG

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AACCTGTCCGTGATCGGCTTCCGCATCCTGCTGCTGAAAGTGGCCGGCTTCAACCTGCT<br>GATGACCCTGAGACTGTGGTCCAGCTGACTCGAGTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCT<br>GTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAGTGTCTT<br>TCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGG<br>GGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCT<br>GGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCGCGGCCGCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGT<br>CACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTA<br>TGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCA<br>AACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGG<br>CAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAG<br>AGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACCTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCC<br>ACCAAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGA<br>CACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTC<br>AGTCTCTCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCCTTACTGC<br>TCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTG<br>CCAAAAAATCTTTCCCAGCTCCTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCA<br>ATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAGT<br>CAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAG<br>CTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAAC<br>AGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGAT<br>ACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAAT<br>GAGAAAGGAGAAGAGCAGCAGGCATGAGTTGAATGAAGGAGGCAGGGCCGGGTGACA<br>GGGCCTTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAGGGATCCGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTC<br>CCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGCTAGC                                                                                                                                                       |
| NTC9385R-TRAC(1k)DTS_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 10)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| CCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTGGCTTGTTGTCCACAACCGTTAAACCTTAAAAGCT<br>TTAAAAGCCTTATATATTCTTTTTTTTCTTATAAACTTAAAACCTTAGAGGGCTATTTAAGT<br>TGCTGATTTATATTAATTTTATTGTTCAAACATGAGAGCTTAGTACGTGAAACATGAGAGC<br>TTAGTACGTTAGCCATGAGAGCTTAGTACGTTAGCCATGAGGGTTTAGTTGTTAAACAT<br>GAGAGCTTAGTACGTAAACATGAGAGCTTAGTACGTACTATCAACAGGTTGAACTGCT<br>GATCCACGTTGTGGTAGAATTGGTAAAGAGAGTCGTGTAAATATCGAGTTCGCACATCT<br>TGTTGTCTGATTATTGATTTTTGGCGAAACCATTTGATCATATGACAAGATGTGTATCTAC<br>CTTAACTTAATGATTTTGATAAAAATCATTAGGTACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCA<br>TGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCCATGGACATTA<br>AAAACACAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAAAGCCT<br>CCAGCAGCTCCTGCTTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGACTCACT<br>AGCACTCTATCACGGCCATATTCTGGCAGGGTCAGTGGCTCCAACCTAACATTTGTTTGGT<br>ACTTTACAGTTTATTAATAGATGTTTATATGGAGAAGCTCTCATTTCTTTCTCAGAAGAG<br>CCTGGCTAGGAAGGTGGATGAGGCACCATATTCATTTTGCAAGGTGAAATTCCTGAGATGT<br>AAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTT<br>AGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGG<br>TAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGC<br>CCAGCCTAAGTTGGGGAGACCCTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGC<br>CTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATC<br>CTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTCAGGTTTCCTTGAGT<br>GGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGA<br>TAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTAT<br>TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTTCA<br>TCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCT<br>AACCCTGATCCTCTTGTTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGA<br>GAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTTCGAATTCGGCTCCGGAGCCACTA |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ACTTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAGAAAACCCCGGTCCTATGGCCACC<br>GGCTCTAGAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCCATGTCTCCAAGA<br>GGGATCTGCCGGCATTACACAGGCCCTACATCTCAGATTCTGGCCGCTGGCAGACGGA<br>TGACACTGAGATGCACCCAGGACATGAGACACAACGCCATGTACTGGTATCGGCAGGAC<br>CTCGGCCTGGGACTGAGACTGATCCACTACTCTAATACCGCCGGCACCACCGGCAAAGG<br>CGAAGTGCCTGATGGCTACTCCGTGTCCAGAGCCAATACCGACGACTTCCCCTGACAC<br>TGGCCTCTGCTGTGCCTAGCCAGACCTCCGTGTACTTCTGTGCCAGCAGCCTGTCTTTG<br>GCACCGAGGCCTTTTTTCGGCCAAGGCACCAGACTGACCGTGGTGGGAAGATCTGAACAA<br>AGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCCACACAC<br>AGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCTACCGGCTTCTTCCCCGATCACGTGGAAGTGTCT<br>TGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTCTGA<br>AAGAACAGCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCTGTCTAGCAGACTGAGAGTGTC<br>CGCCACCTTCTGGCAGAACCCCAAGAAACCTTCAGATGCCAGGTCCAGTTCTACGGCC<br>TGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGAAGAGAGCCAAGCCTGTGACACAGATCGTGTG<br>TGCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGTGTGCATACCAGCAGGGCG<br>TGCTGTCTGCCACCATCCTGTATGAGATCCTGCTCGGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGC<br>TGGTGTCTGCTCTGGTGTCTGATGGCTATGGTCAAGCGGAAGGACTTCCGGGGCCAAGCGG<br>GGCAGCGGGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAAC<br>CCCGGCCCTATGGCCACAGGCAGCAGAACATCTCTGCTGCTGGCCTTCCGACTGCTGTG<br>TCTGCCTTGGCTGCAAGAGGCTTCCGCCCAGCAGAAAGAGGTGGAACAGAATAGCGGC<br>CCTCTGAGCGTTCCAGAAGGCGCTATCGCCAGCCTGAACTGCACCTACAGCGATAGAGG<br>CAGCCAGAGCTTCTTCTGGTACAGACAGTACAGCGGCAAGAGCCCCGAGCTGATCATGT<br>TCATCTACAGCAACGGCGACAAAGAGGACGGCCGGTTTACAGCCCAGCTGAACAAGGC<br>CAGCCAATACGTGTCCCTGCTGATCAGAGATAGCCAGCCTAGCGACAGCGCCACCTATC<br>TGTGCGCCGTGAATTTTGGCGGCGGAAAGCTGATCTTTGGCCAGGGCACAGAGCTGAG<br>CGTGAAGCCCAACATTCAGAACCCCGATCCTGCTGTGTATCAGCTGCGCGACAGCAAGA<br>GCAGCGACAAGAGCGTGTGTTTGTTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAA<br>AGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGAC<br>TTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGC<br>CTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCT<br>TTGGTGCCTTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCT<br>GGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAA<br>ACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGG<br>AAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTC<br>TCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACTGCTCTTCT<br>AGGCCTCATTCTAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAA<br>AAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACT<br>GATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATG<br>AGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTGAGCTGGGA<br>AAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTAC<br>CTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGC<br>CCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAA<br>GGAGAAGAGCAGCAGGCATGAGTTGAATGAAGGAGGCAGGGCCGGGTCACAGGGCCT<br>TCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAGGGATCCGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGC<br>AGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGCTAGC |
| NTC9385R-TRAC(1k)DTS_P2A.1G4.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHPA (SEQ ID NO: 11)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| CCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTGGCTTGTTGTCCACAACCGTTAAACCTTAAAAGCT<br>TTAAAAGCCTTATATATTCTTTTTTTTCTTATAAACTTAAAACCTTAGAGGCTATTTAAGT<br>TGCTGATTTATATTAATTTTATTGTTCAAACATGAGAGCTTAGTACGTGAAACATGAGAGC<br>TTAGTACGTTAGCCATGAGAGCTTAGTACGTTAGCCATGAGGGTTTAGTTGTTAAACAT<br>GAGAGCTTAGTACGTTAAACATGAGAGCTTAGTACGTACTATCAACAGGTTGAACTGCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

GATCCACGTTGTGGTAGAATTGGTAAAGAGAGTCGTGTAAAATATCGAGTTCGCACATCT  
TGTTGTCTGATTATTGATTTTTGGCGAAACCATTTGATCATATGACAAGATGTGTATCTAC  
CTTA ACTTAATGATTTTGATAAAAATCATTAGGTACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCA  
TGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCCATGGACATTA  
AAAACACAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAAAGCCT  
CCAGCAGCTCCTGCTTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGACTCACT  
AGCACTCTATCACGGCCATATTCTGGCAGGGTCAGTGGCTCCA ACTAACATTTGTTTGGT  
ACTTTACAGTTTATTA AATAGATGTTTATATGGAGAAGCTCTCATTTCTTTCTCAGAAGAG  
CCTGGCTAGGAAGGTGGATGAGGCACCATATTCATTTTGCAGGTGAAATTCCTGAGATGT  
AAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTT  
AGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGG  
TAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGC  
CCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGC  
CTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATC  
CTATTA AATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAGGTTTCCTTGAGT  
GGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGA  
TAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTAT  
TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCA  
TCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCTT  
AACCTTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGA  
GAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTTCGAATTCGGCTCCGGAGCCACTA  
ACTTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAGAAAACCCCGGTCCTATGGCCACC  
GGCTCTAGAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCCATGTCTCCAAGA  
GGGATCTGCCGGTGTCACTCAGACCCCCAAAATTCCAGGTCCTGAAGACAGGACAGAGC  
ATGACACTGCAGTGTGCCCAGGATATGAACCATGAATACATGTCCTGGTATCGACAAGAC  
CCAGGCATGGGGCTGAGGCTGATTCATTACTCAGTTGGTGCTGGTATCACTGACCAAGG  
AGAAGTCCCCAATGGCTACAATGTCTCCAGATCAACCACAGAGGATTTCCCGCTCAGGC  
TGCTGTGCGGCTGCTCCCTCCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTTACGTCGGGA  
ACACCGGGGAGCTGTTTTTTGGAGAAGGCTCTAGGCTGACCGTACTGGAGGACCTGAA  
CAAAGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCCACA  
CACAGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCTACCGGCTTCTTCCCCGATCACGTGGA ACTG  
TCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTC  
TGAAAGAACAGCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCTGTCTAGCAGACTGAGAGT  
GTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCC CAGAAACCACTTCAGATGCCAGGTCCAGTTCTACG  
GCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGAAGAGAGCCAAGCCTGTGACACAGATCGT  
GTCTGCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGTGTCTATACCAGCAGG  
GCGTGCTGTCTGCCACCATCCTGTATGAGATCCTGCTCGGCAAGGCCACACTGTACGCT  
GTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGCTGATGGCTATGGTCAAGCGGAAGGACTTCCGGGGCAA  
GCGGGGCAGCGGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGA  
GAACCCCGGCCCTATGGCCACAGGCAGCAGAACATCTCTGCTGCTGGCCTTTCGGACTGC  
TGTGTCTGCCTTGGCTGCAAGAGGCTTCCGCCAAACAGGAGGTGACGCAGATTCCTGCA  
GCTCTGAGTGTCCCAGAAGGAGAAAACTTGGTTCTCAACTGCAGTTTCACTGATAGCGC  
TATTTACAACCTCCAGTGGTTTAGGCAGGACCCTGGGAAAGGTCTCACATCTCTGTTGCT  
TATTCAGTCAAGTCAGAGAGAGCAAACAAGTGGAAGACTTAATGCCTCGCTGGATAAAT  
CATCAGGACGTAGTACTTTATACATTGCAGCTTCTCAGCCTGGTGACTCAGCCACCTACC  
TCTGTGCTGTGAGGCCACATCAGGAGGAAGCTACATACCTACATTTGGAAGAGGAACC  
AGCCTTATTGTTTCATCCGTATATTCAGAACCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGAC  
AGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACG  
TGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATACCGACAAGACCGTGCTGGACATGCG  
GAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGATTTCCGCC  
TGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCAAGTCCTGA

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAA<br>CTTCCAGAACCTGTCCGTGATCGGCTTCCGCATCCTGCTGCTGAAAGTGGCCGGCTTCA<br>ACCTGCTGATGACCCTGAGACTGTGGTCCAGCTGACTCGAGTGTGCCTTCTAGTTGCCA<br>GCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC<br>TGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT<br>CTGGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGG<br>CATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCGCGGCCGCACCGATTTTGATTCTCAAACAA<br>ATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGA<br>GGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCA<br>TGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGG<br>TAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCT<br>GCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCC<br>ATTGCCACCAAAACCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGA<br>GAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGGCACGTGGCCC<br>AGCCTCAGTCTCTCCAACTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCT<br>TACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCC<br>TGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACC<br>CACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAA<br>AAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCT<br>GTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAG<br>AAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTG<br>AAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGC<br>TCAATGAGAAAGGAGAAGAGCAGCAGGCATGAGTTGAATGAAGGAGGCAGGGCCGGG<br>TCACAGGGCCTTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAGGGATCCGGTGTGGAAAGTCCCCA<br>GGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGCTA<br>GC |
| Linear TRAC(1k)P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 12)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| ACATTAAAAACACAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAA<br>AGCCTCCAGCAGCTCCTGCTTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGAC<br>TCACTAGCACTCTATCACGGCCATATTCTGGCAGGGTCAGTGGCTCCAACTAACATTTGT<br>TTGGTACTTTACAGTTTATTAAATAGATGTTTATATGGAGAAGCTCTCATTTCCTTCTCAGA<br>AGAGCCTGGCTAGGAAGGTGGATGAGGCACCATATTCATTTTGCAGGTGAAATTCCTGA<br>GATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGG<br>GGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCT<br>CCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCT<br>AATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGC<br>TGGGCCTTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGA<br>AGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTCAGGTTTCCT<br>TGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAG<br>ATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGAT<br>GCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTT<br>GTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGGAAATGAGATCAT<br>GTCCTAACCCCTGATCCTCTTGTCACACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCA<br>GCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCTGAATTCGGCTCCGGAG<br>CCACTAACTTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAGAAAACCCCGGTCCTATG<br>GCCACCGGCTCTAGAACAAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCCATGTCTC<br>CAAGAGGGATCTGCCGAAACGGGAGTTACGCAGACACCAAGACACCTGGTTCATGGGAA<br>TGACAAATAAGAAGTCTTTGAAATGTGAACAACATCTGGGTCATAACGCTATGTATTGGT<br>ACAAGCAAAGTGCTAAGAAGCCACTGGAGCTCATGTTTGTCTACAGTCTTGAAGAACG<br>GGTTGAAAACAACAGTGTGCCAAGTCGCTTCTCACCTGAATGCCCCAACAGCTCTCACT<br>TATTCCTTCACCTACACACCCTGCAGCCAGAAGACTCGGCCCTGTATCTCTGCGCCAGCA                                                  |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GCCAGTCGAGGGGGGGCTCAGCAGTACTTCGGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGA<br>GGACCTGAACAAAGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAG<br>ATCAGCCACACACAGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCTACCGGCTTCTTCCCCGATCA<br>CGTGGAAGTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGGCGTCAGCACAGAT<br>CCCCAGCCTCTGAAAGAACAGCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCTGTCTAGCA<br>GACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCAAGAAACCACTTCAGATGCCAGGT<br>CCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGAAGAGAGCCAAGCCTGTG<br>ACACAGATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGTGTG<br>ATACCAGCAGGGCGTGCTGTCTGCCACCATCCTGTATGAGATCCTGCTCGGCAAGGCCA<br>CACTGTACGCTGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGTGCTGATGGCTATGGTCAAGCGGAAGGAC<br>TTCCGGGCCAAGCGGGGGCAGCGGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCG<br>ACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCTATGGCCACAGGCAGCAGAACATCTCTGCTGCTGGC<br>CTTCGGACTGCTGTGTCTGCCTTGGCTGCAAGAGGCTTCCGCCCAAGAGGAGGTGGAG<br>CAGGATCCTGGACCACTCAGTGTTCCAGAGGGAGCCATTGTTTCTCTCAACTGCACTTA<br>CAGCAACAGTGCTTTTTCAATACTTCATGTGGTACAGACAGTATTCCAGAAAAGGCCCTG<br>AGTTGCTGATGTACACATACTCCAGTGGTAACAAAGAAGATGGAAGGTTTACAGCACAG<br>GTCGATAAATCCAGCAAGTATATCTCCTTGTTTCATCAGAGACTCACAGCCCAGTGATTCA<br>GCCACCTACCTCTGTGCAATGAGTGAGGACTACAAGCTCAGCTTTGGAGCCGGAACCAC<br>AGTAACTGTAAGAGCAAATATTCAGAACCCCGATCCTGCTGTGTATCAGCTGCGCGACA<br>GCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGTTTGTTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTG<br>TCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCT<br>ATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGC<br>AAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGG<br>GCAGCTTTGGTGCCTTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCA<br>GAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGC<br>CACCAAAACCTCTTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATG<br>ACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCT<br>CAGTCTCTCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACTG<br>CTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCT<br>GCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACC<br>AATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAG<br>TCAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAG<br>CTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAAC<br>AGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGAT<br>ACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAAT<br>GAGAAAGGAGAAGAGCAGCAGGCATGAGTTGAATGAAGGAGGCAGGGCCGGGTCACA<br>GGGCCTTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAG |
| NTC9385R-TRAC(1k)DTS_P2A.neol2.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| CCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTGGCTTGTTGTCCACAACCGTTAAACCTTAAAAGCT<br>TTAAAAGCCTTATATATTCTTTTTTTTCTTATAAACTTAAACCTTAGAGGCTATTTAAGT<br>TGCTGATTTATATTAATTTTATTGTTCAAACATGAGAGCTTAGTACGTGAAACATGAGAGC<br>TTAGTACGTTAGCCATGAGAGCTTAGTACGTTAGCCATGAGGGTTTAGTTTCGTTAAACAT<br>GAGAGCTTAGTACGTAAACATGAGAGCTTAGTACGTACTATCAACAGGTTGAACTGCT<br>GATCCACGTTGTGGTAGAATTGGTAAAGAGAGTCGTGTAAATATCGAGTTTCGCACATCT<br>TGTTGTCTGATTATTGATTTTTGGCGAAACCATTTGATCATATGACAAGATGTGTATCTAC<br>CTTAACTTAATGATTTTGATAAAAATCATTAGGTACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCA<br>TGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCCATGGACATTA<br>AAAACACAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAAAGCCT<br>CCAGCAGCTCCTGCTTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGACTCACT<br>AGCACTCTATCACGGCCATATTCTGGCAGGGTCAGTGGCTCCAACCTAACATTTGTTTGGT<br>ACTTTACAGTTTATTAAATAGATGTTTATATGGAGAAGCTCTCATTTCTTTCTCAGAAGAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

CCTGGCTAGGAAGGTGGATGAGGCACCATATTCATTTTGCAGGTGAAATTCCTGAGATGT  
AAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTT  
AGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGG  
TAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGC  
CCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGC  
CTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATC  
CTATTAATAAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAGGTTTCCTTGAGT  
GGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGA  
TAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTTCTAAGATGCTAT  
TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTTCCA  
TCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCT  
AACCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGA  
GAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTTCGAATTCGGCTCCGGAGCCACTA  
ACTTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAGAAAACCCCGGTCCCTATGGCCACC  
GGCTCTAGAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCCATGTCTCCAAGA  
GGGATCTGCCGAAACGGGAGTTACGCAGACACCAAGACACCTGGTCATGGGAATGACA  
AATAAGAAGTCTTTGAAATGTGAACAACATCTGGGTCATAACGCTATGTATTGGTACAAG  
CAAAGTGCTAAGAAGCCACTGGAGCTCATGTTTGTCTACAGTCTTGAAGAACGGGTTGA  
AAACAACAGTGTGCCAAGTCGCTTCTCACCTGAATGCCCCAACAGCTCTCACTTATTCC  
TTCACCTACACACCCTGCAGCCAGAAGACTCGGGCCCTGTATCTCTGCGCCAGCAGCCAG  
TCGAGGGGGGCTCAGCAGTACTTCGGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGACC  
TGAACAAAGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGC  
CACACACAGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCTACCGGCTTCTTCCCCGATCACGTGGA  
ACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACAGATCCCCAG  
CCTCTGAAAGAACAGCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCTGTCTAGCAGACTGA  
GAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCAAGAACCACTTCAGATGCCAGGTCCAGTTC  
TACGGCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGAAGAGAGCCAAGCCTGTGACACAGA  
TCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGTGTACATACCAG  
CAGGGCGTGCTGTCTGCCACCATCCTGTATGAGATCCTGCTCGGCAAGGCCACACTGTA  
CGCTGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGTCTGATGGCTATGGTCAAGCGGAAGGACTTCCGGG  
CCAAGCGGGGCAGCGGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGG  
AGGAGAACCCCGGCCCTATGGCCACAGGCAGCAGAACATCTCTGCTGCTGGCCTTCGG  
ACTGCTGTGTCTGCCTTGGCTGCAAGAGGCTTCCGCCCAGAAGGAGGTGGAGCAGGAT  
CCTGGACCACTCAGTGTTCCAGAGGGAGCCATTGTTTCTCTCAACTGCACTTACAGCAA  
CAGTGCTTTTCAATACTTCATGTGGTACAGACAGTATTCCAGAAAAGGCCCTGAGTTGCT  
GATGTACACATACTCCAGTGGTAACAAAGAAGATGGAAGGTTTACAGCACAGGTTCGATA  
AATCCAGCAAGTATATCTCCTTGTTTCATCAGAGACTCACAGCCCAGTGATTCAGCCACCT  
ACCTCTGTGCAATGAGTGAGGACTACAAGCTCAGCTTTGGAGCCGGAACCACAGTAAC  
TGTAAGAGCAAATATTCAGAACCCCGATCCTGCTGTGTATCAGCTGCGCGACAGCAAGA  
GCAGCGACAAGAGCGTGTGTTTGTTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAA  
AGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGAC  
TTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGC  
CTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCT  
TTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCT  
GGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAA  
ACCTCTTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGG  
AAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTC  
TCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCT  
AGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAA  
AAATCTTTCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACT  
GATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAAAAGTCAGATG

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGA<br>AAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTAC<br>CTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGC<br>CCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAA<br>GGAGAAGAGCAGCAGGCATGAGTTGAATGAAGGAGGCAGGGCCGGGTCACAGGGCCT<br>TCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAGGGATCCGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGC<br>AGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGCTAGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| pUCu-Kan TRAC(1k) P2A.Neo12.TRBC2opt.f-P2A.TRA(Va) (SEQ ID NO: 14)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| GGTACCACATTAAAAACAAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTA<br>AGGAAAAGCCTCCAGCAGCTCCTGCTTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCT<br>GCATGACTCACTAGCACTCTATCACGGCCATATTCTGGCAGGGTCAGTGGCTCCAATAA<br>CATTTGTTTGGTACTTTACAGTTTATTAAATAGATGTTTATATGGAGAAGCTCTCATTCTT<br>TCTCAGAAGAGCCTGGCTAGGAAGGTGGATGAGGCACCATATTCATTTTGCAGGTGAAA<br>TTCCTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAG<br>TGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAG<br>CAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCAT<br>TCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTG<br>CTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTT<br>TGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTAG<br>GTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTT<br>GGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTT<br>TCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCC<br>CGCCCTTGTCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATG<br>AGATCATGTCCTAACCCCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCG<br>TGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCGAATTCGGCT<br>CCGGAGCCACTAACTTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAGAAAACCCCGGT<br>CCTATGGCCACCGGCTCTAGAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCCA<br>TGTCTCCAAGAGGGATCTGCCGAAACGGGAGTTACGCAGACACCAAGACACCTGGTCA<br>TGGGAATGACAAATAAGAAAGTCTTTGAAATGTGAACAACATCTGGGTCATAACGCTATGT<br>ATTGGTACAAGCAAAGTGCTAAGAAGCCACTGGAGCTCATGTTTGTCTACAGTCTTGAA<br>GAACGGGTTGAAAACAACAGTGTGCCAAGTCGCTTCTCACCTGAATGCCCCAACAGCT<br>CTCACTTATTCCTTACCTACACACCCTGCAGCCAGAAGACTCGGCCCTGTATCTCTGCG<br>CCAGCAGCCAGTCGAGGGGGGGCTCAGCAGTACTTCGGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGT<br>CACAGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCCTCCAAAAGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAG<br>GCCGAGATCAGCCACACACAGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCTACCGGCTTCTACCC<br>CGATCACGTGGAACGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGC<br>ACAGATCCCCAGCCTCTGAAAGAACAGCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCTGTC<br>TAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCAAGAAACCACTTCAGATGC<br>CAGGTCCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGC<br>CTGTGACACAGATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGC<br>GAGTCATACCAGCAGGGCGTGCTGTCTGCCACCATCCTGTATGAGATCCTGCTCGGCAA<br>GGCCACACTGTACGCTGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGTCTGATGGCTATGGTCTCCCGGG<br>AGCGCATCCCCGAGGCCCGGGCCAAGCGGGGCAGCGGCCACCAACTTCAGCCTGCT<br>GAAGCAGGCCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCTATGGCCACAGGCAGCAGAAC<br>ATCTCTGCTGCTGGCCTTCGGACTGCTGTGTCTGCCTTGGCTGCAAGAGGCTTCCGCCC<br>AGAAGGAGGTGGAGCAGGATCCTGGACCACTCAGTGTTCCAGAGGGAGCCATTGTTTC<br>TCTCAACTGCACTTACAGCAACAGTGCTTTTCAATACTTCATGTGGTACAGACAGTATTC<br>CAGAAAAGGCCCTGAGTTGCTGATGTACACATACTCCAGTGGTAACAAAGAAGATGGA<br>AGGTTTACAGCACAGGTGCGATAAATCCAGCAAGTATATCTCCTTGTTTCATCAGAGACTCA<br>CAGCCCAGTGATTACGCCACCTACCTCTGTGCAATGAGTGAGGACTACAAGCTCAGCTT<br>TGGAGCCGGAACACAGTAACTGTAAGAGCAAATATTCAGAACCCCGATCCTGCTGTGT |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ATCAGCTGCGCGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGTTTGTTACCGATTTTGAT<br>TCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACGTGT<br>GCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAAT<br>CTGACTTTGCAATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCC<br>CCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATG<br>GCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTC<br>GGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGG<br>CAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGC<br>ACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACT<br>GTTTGCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCT<br>TATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCA<br>CTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTG<br>GAGGAATTA AAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGG<br>GAGCCCATCTGTCTAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACT<br>CAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGA<br>AATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTG<br>GGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGAGAAGAGCAGCAGGCATGAGTTGAATGAAGGAGG<br>CAGGGCCGGGTACAGGGCCTTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAGGCTAGCCGCGTTG<br>CTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAG<br>TCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCT<br>CCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCC<br>CTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGG<br>TCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCC<br>TTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCA<br>GCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTT<br>GAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT<br>GAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACC<br>GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATC<br>TCAAGAAGATCCTTTGATCTTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTA<br>TTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAA<br>ACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTC<br>GTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGA<br>AATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCC<br>AGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAA<br>CCGTTATTCAATTCGTGATTGCGCCTGAGCCAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGA<br>CAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAA<br>TATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTTCCGGGGATCGC<br>AGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAG<br>GCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCT<br>ACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAGCGATAGAT<br>TGTCGCACCTGATTGCCCAGACATTATCGCGAGCCCATTATACCCATATAAATCAGCATCC<br>ATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTG<br>TATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTATCTTGTCGA<br>TGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC |
| pUCu-Kan TRAC(1k)_MNDZsGreen.f-P2A.LNGFRt.P2A (SEQ ID NO: 15)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| GGTACCACATTAAAAACACAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTA<br>AGGAAAAGCCTCCAGCAGCTCCTGCTTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCT<br>GCATGACTCACTAGCACTCTATCACGGCCATATTCTGGCAGGGTCAGTGGCTCCAACATA<br>CATTGTGTTGGTACTTTACAGTTTATTAAATAGATGTTTATATGGAGAAGCTCTCATTCTT<br>TCTCAGAAGAGCCTGGCTAGGAAGGTGGATGAGGCACCATATTCATTTTGCAGGTGAAA<br>TTCCTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

TGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAG  
CAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCAT  
TCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTG  
CTTTGCTGGGCCTTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTT  
TGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAG  
GTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTT  
GGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTT  
TCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCC  
CGCCCTTGTCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATG  
AGATCATGTCCTAACCCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCG  
TGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCGAACAGAGA  
AACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAG  
GGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAG  
TTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCCGCCCTCAGC  
AGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT  
GCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCC  
GAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCC  
ACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAGGCGGCCGCGCCGCCACCATGGCCCAGTCCAAGCAC  
GGCCTGACCAAGGAGATGACCATGAAGTACCGCATGGAGGGCTGCGTGGACGGCCACA  
AGTTCGTGATCACCGGCGAGGGCATCGGCTACCCCTTCAAGGGCAAGCAGGCCATCAAC  
CTGTGCGTGGTGGAGGGCGGCCCTTGCCCTTCGCCGAGGACATCTTGTCCGCCGCCTT  
CATGTACGGCAACCGCGTGTTCACCGAGTACCCCCAGGACATCGTGGACTACTTCAAGA  
ACTCCTGCCCCGCCGGATACACCTGGGACCGCTCCTTCTGTTTCGAGGACGGCGCCGTG  
TGCATCTGCAACGCCGACATCACCGTCAGCGTGGAGGAGAACTGCATGTACCACGAGTC  
CAAGTTCTACGGCGTGAACCTCCCCGCCGACGGCCCCGTGATGAAGAAGATGACCGAC  
AACTGGGAGCCCTCCTGCGAGAAGATCATCCCGTGCCCAAGCAGGGCATCTTGAAGG  
GCGACGTCAGCATGTACCTGCTGCTGAAGGACGGTGGCCGCTTGCGCTGCCAGTTCGAC  
ACCGTGTACAAGGCCAAGTCCGTGCCCCGCAAGATGCCCCGACTGGCACTTCATCCAGCA  
CAAGCTGACCCGCGAGGACCGCAGCGACGCCAAGAACCAGAAGTGGCACCTGACCGA  
GCACGCCATCGCCTCCGGCTCCGCCTTGCCCCGGGCCAAGCGGGGCAGCGGCGCCACC  
AACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAAACCCCGGCCCTATGGGGG  
CAGGTGCCACCGGCCGCGCTATGGACGGGGCCGCGCCTGCTGCTGTTGCTGCTTCTGGGG  
GTGTCCCTTGAGGTGCCAAGGAGGCATGCCCCACAGGCCTGTACACACACAGCGGTG  
AGTGCTGCAAAGCCTGCAACCTGGGCGAGGGTGTGGCCAGCCTTGTGGAGCCAACCA  
GACCGTGTGTGAGCCCTGCCTGGACAGCGTGACGTTCTCCGACGTGGTGAGCGCGACC  
GAGCCGTGCAAGCCGTGCACCGAGTGCGTGGGGCTCCAGAGCATGTGCGCGCCGTGCG  
TGGAGGCCGACGACGCCGTGTGCCGCTGCGCCTACGGCTACTACCAGGATGAGACGAC  
TGGGCGCTGCGAGGCGTGCCGCGTGTGCGAGGCGGGCTCGGGCCTCGTGTTCTCCTGC  
CAGGACAAGCAGAACACCGTGTGCGAGGAGTGCCCCGACGGCACGTATTCGACGAGG  
CCAACCACGTGGACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCGAGCGCCAGCT  
CCGCGAGTGCACACGCTGGGCCGACGCCGAGTGCGAGGAGATCCCTGGCCGTTGGATT  
ACACGGTCCACACCCCCAGAGGGCTCGGACAGCACAGCCCCCAGCACCCAGGAGCCTG  
AGGCACCTCCAGAACAAGACCTCATAGCCAGCACGGTGGCAGGTGTGGTGACCACAGT  
GATGGGCAGCTCCCAGCCCGTGGTGACCCGAGGCACCAACCGACAACCTCATCCCTGTCT  
ATTGCTCCATCCTGGCTGCTGTGGTTGTGGGTCTTGTGGCCTACATAGCCTTCAAGAGGG  
GCTCCGGAGCCACTAACTTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAGAAAACCC  
GGTCTACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCTGATGTGTAT  
ATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGT  
GGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTC  
CAGAAGACACCTTCTTCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGT  
TTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAACT

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCCTCTTTTTACTAAGAAA<br>CAGTGAGCCTTGTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGA<br>AGGTGGCAGGAGAGGGGCAGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAACTGAGTTCCTGCCTG<br>CCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTT<br>CTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAA<br>GTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATG<br>CACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAG<br>CACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGAT<br>TGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGG<br>AAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAG<br>GACCCATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGAGAAGAGCAGCAGGCATG<br>AGTTGAATGAAGGAGGCAGGGCCGGGTACAGGGCCTTCTAGGCCATGAGAGGGTAGA<br>CAGGCTAGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACA<br>AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGC<br>GTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATA<br>CCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTA<br>TCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTC<br>AGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC<br>GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG<br>CGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTAT<br>TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGAT<br>CCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACG<br>CGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTAGAAAAACTCATCGAGCATC<br>AAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTTGAAAAAGCCGTT<br>TCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTAT<br>CGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATAAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAA<br>ATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAA<br>AAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAA<br>ATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCCAGACGAAATAC<br>GCGATCGCTGTAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAAC<br>ACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATG<br>CTGTTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAAT<br>GCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTG<br>TAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGGCGCATCGGGCT<br>TCCCATAACAAGCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCCATTATA<br>CCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGACGTTTCCCGTTGAATA<br>TGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATG<br>ATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC |
| 僅pUCu主鏈(SEQ ID NO: 16)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| GCTAGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAA<br>ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTT<br>CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTG<br>TCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTC<br>AGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCC<br>CGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTT<br>ATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTG<br>CTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTA<br>TCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGC<br>AAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAG<br>AAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATG<br>AAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AATGAAGGAGAAAACCTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTC<br>TGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAG<br>GTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTT<br>TATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCAC<br>TCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCCAGACGAAATACGCGAT<br>CGCTGTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGC<br>CAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTT<br>TTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTG<br>ATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACA<br>TCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCA<br>TACAAGCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCAT<br>ATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGACGTTTCCCCTTGAATATGGCT<br>CATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTATTGTTTCATGATGATATAT<br>TTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACGGTACC                                                                                                                                                                                            |
| TRAC 5'同源臂(SEQ ID NO: 17)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| ACATTAAAAACACAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAA<br>AGCCTCCAGCAGCTCCTGCTTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGAC<br>TACTAGCACTCTATCACGGCCATATTCTGGCAGGGTCAGTGGCTCCAACTAACATTTGT<br>TTGGTACTTTACAGTTTATTAAATAGATGTTTATATGGAGAAGCTCTCATTTCTTTCTCAGA<br>AGAGCCTGGCTAGGAAGGTGGATGAGGCACCATATTCATTTTGCAGGTGAAATTCCTGA<br>GATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGG<br>GGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCT<br>CCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCT<br>AATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGC<br>TGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGA<br>AGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTACAGGTTTCCT<br>TGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAG<br>ATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGAT<br>GCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTT<br>GTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGGAAATGAGATCAT<br>GTCCTAACCCCTGATCCTCTTGTCACACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCA<br>GCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTC |
| TRAC 3' 同源臂(SEQ ID NO: 18)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| ACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACA<br>GACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTG<br>GAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCAGAAG<br>ACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTT<br>GCTTCAGGAATGGCCAGGTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACCTCCTCT<br>GATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTG<br>AGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTG<br>GCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTGCC<br>TTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAA<br>GTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCAGCTCACTAAGTCAGT<br>CTCACGCAGTCACTATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCA<br>GGTGTGGAAGTGAGGAATTAAGAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCA<br>TTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAA<br>TGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGG<br>CTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCT<br>ATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGAGAAGAGCAGCAGGCATGAGTTG<br>AATGAAGGAGGCAGGGCCGGGTCACAGGGCCTTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAG        |

核糖核蛋白(RNP) 複合物

【0333】 RNP複合物使用CRISPR spCas9作為核酸酶(Aldevron , sNLS-SpCas9-sNLS核酸酶)而產生。在電穿孔緩衝劑中將sgRNA化學合成(Synthego)且自600 μM之儲備濃度稀釋至120 μM之工作濃度。sgRNA與Cas9蛋白以1:6 Cas9:sgRNA莫耳比複合，且在室溫下培育至少10分鐘且接著保持低溫(4℃或在冰上)直至使用。

【0334】 藉由將針對相關靶位點之gRNA序列(亦即，內源性基因組靶標內之限定核苷酸序列)併入在相同核苷酸上含有crRNA及tracrRNA序列兩者之sgRNA核苷酸構架中來設計sgRNA。本文中所使用之sgRNA在下文提供有指示硫代磷酸酯鍵聯之「(ps)」及指示2'O-甲基鹼基之「m」。

TRAC-1 sgRNA (SEQ ID NO: 19):

[mG](ps)[mA](ps)[mG](ps)AAUCAAAAUCGGUGAAUGUUUUUAG  
AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC  
UUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC[mU](ps)[mU](ps)[mU](ps)U

TRBC-2 sgRNA (SEQ ID NO: 20):

[mG](ps)[mG](ps)[mC](ps)UCUCGGAGAAUGACGAGGUUUUAG  
AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC  
UUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC[mU](ps)[mU](ps)[mU](ps)U

電穿孔/核轉染

【0335】 描述用於基因編輯T細胞之電穿孔條件的通用方法概述於下文：

| 設備                                                  |
|-----------------------------------------------------|
| Cas9蛋白                                              |
| 用於電穿孔法之CRISPR sgRNA                                 |
| 同源修復模板                                              |
| 具有以下之Lonza P3初代細胞4D-Nucleofector® × Kit S (32 RCT)： |

|                                    |
|------------------------------------|
| - P3核轉染溶液                          |
| - 增補劑(或與P3溶液混合)                    |
| - pmaxGFP對照載體                      |
| - 16孔核比色管條帶(Nucleocuvette Strip)   |
| 分離之初代人類T細胞                         |
| 48孔組織培養盤                           |
| T細胞培養基(具有IL-7及IL-15之3% HS TexMACS) |
| 200 µl PCR條帶管，無菌                   |
| 具有X單位之Lonza核轉染系統                   |
| 細胞計數器                              |

注意：可使用100 µL核轉染比色管(目錄號V4XP-3012或V4XP-3024)替代20 µL比色管，在此情況下，細胞數目、經轉染試劑之量及電鍍體積必須全部按比例擴大。亦可用於替代的電穿孔裝置(相應地取代緩衝劑及體積)。

程序：

- 藉由將1 mL T細胞培養基(TexMACS，各自含有12.5ng/mL IL-7及IL-15之3%人類血清)添加至48孔培養盤(對於各樣品及對照物[例如偽處理及GFP]而言足夠的孔，僅加1種培養基，額外加~10%)之各孔中來製備樣品盤。注意：在方法之變化形式中，用含有IL-2而非IL-7及IL-15之培養基培養細胞，如下文所指示。
- 一旦充分混合，就將1 mL培養基等分至孔中。將培養盤置放於37℃培育箱中。
- 將核轉染增補劑添加至核轉染溶液中(4.5:1)。
- 如所描述般將RNP複合物裝配於200 µL條帶管中。包括偽處理(僅核轉染緩衝劑)及核轉染對照物(例如，0.5 µg GFP質體)。
- 將適當量之HR DNA添加至各管中(通常0.2-0.4 µg/µL)。
- 移除小體積的用於計數之細胞(例如，20 µL用於細胞計數儀)且將剩餘部分轉移至合適的錐形小瓶以短暫離心細胞。

7. 在RT下以 $90\times g$ 使細胞球粒化10分鐘。
8. 對細胞計數。
9. 自球粒化細胞移除上澄液。
10. 將細胞再懸浮於充足核轉染緩衝劑中，以使得各20  $\mu\text{L}$ 核比色管將具有0.5至1百萬個細胞，考慮到細胞小球之體積(10 M個細胞為 $\sim 15\ \mu\text{L}$ )。
11. 將細胞分佈至含有樣本之200  $\mu\text{L}$ 條帶管中。將細胞培育0至45分鐘，通常小於10分鐘。
12. 將核轉染反應傳遞至核比色管。
13. 在適當位置處點擊蓋板。
14. 自培育箱移除含有預溫熱培養基之培養盤。
15. 將4D單位程式化以使用EO-115程式且以適當定向(具有較大斷流器之A1頂部)將容器置放至4D-X中並按開始。
16. 將 $\sim 100\ \mu\text{L}$ 之溫熱細胞培養基自培養盤之對應孔緩慢地轉移至核比色管之孔(100  $\mu\text{L}$ 比色管為500個)中。
17. 將全部 $\sim 120\ \mu\text{L}$ 自各核比色管轉移至培養盤上之對應孔。
18. 在後續分析之前將細胞培育5至11天(亦即，採集7至14天)，例如用於轉基因表現、基因組靶向或功能分析(例如，T細胞殺傷或細胞介素產生)。(注意：敲除表現型通常可見小於24小時，敲除表現型通常可見24至48小時，其中表現型在72小時之後穩定)

### 流式細胞測量術分析

【0336】藉由流式細胞測量術評定細胞的相關基因表現。針對ZsGreen構築體，評定ZsGreen構築體(GFP)之螢光。針對TCR表現，使用

TCR特異性抗體(抗人類TCR $\alpha/\beta$ 抗體純系IP26 Brilliant Violet 510, Biolegend)將細胞染色。針對CD3表現,使用CD3特異性抗體(純系SK7, Biolegend)將細胞染色。針對NK細胞研究,使用CD5 (純系UCHT2, Biolegend)及CD56 (純系5.1H11, Biolegend)。

【0337】除非另外指出,否則藉由FSC/SSC、單峰、活細胞(近IR染料),接著藉由特異性閘控(例如,CD8、抗原決定基肽多聚體(dextramer)等)閘控T細胞。

在有指示的情況下,螢光團-MHC三聚體葡聚糖複合物(亦稱為「抗原決定基肽多聚體」)用以鑑別抗原特異性TCR識別且更詳細地描述於Bethune等人(*BioTechniques* 62:123-130 2017年3月)及Bethune等人(*eLife* 5: 2016)中,其全部教示內容各自以引用之方式併入本文中。抗原決定基肽多聚體係藉由使用螢光標記之抗生蛋白鏈菌素(Life Technologies, Carlsbad, CA)來製備。用於抗原特異性TCR識別之肽為:ELAGIGILTV (Mart-1 F5, SEQ ID NO: 5); YLTHRVDVI (Neo12, SEQ ID NO: 6); SLLMWITQV (NY-ESO 1G4, SEQ ID NO: 7)。

### 慢病毒產生及轉導

【0338】將NY-ESO (1G4)及MART-1 (F5)TCR構築體次選殖至呈TCR $\alpha$ -F2A-TCR $\beta$ -P2A-Myc271形式之pCCLc-MND類慢病毒載體(Addgene #81071)中。Myc271為包含與胞外cMyc抗原決定基標籤融合之CD271 (LNGFR)之跨膜及截斷胞外域的嵌合轉導標記物。編碼NY-ESO (1G4)及MART-1之慢病毒藉由短暫轉染慢病毒類載體及其封裝載體(pMD2.G)而產生於HEK-293T細胞中。轉染之後48小時,收集病毒,經由0.45  $\mu$ m針筒過濾器過濾,且用於感染。

【0339】人類CD3<sup>+</sup> T細胞自健康供體之PBMC分離，刺激24小時並接著在細胞介素存在下生長，如上文所描述。48小時後，以 $2 \times 10^6$ 個細胞/孔將細胞接種於具有凝聚胺之250  $\mu$ L培養基中，其中將500  $\mu$ L培養基(假擬條件)或特異性病毒上澄液(pCCLc-MND-F5TCR-Myc271或pCCLc-MND-1G4TCR-Myc271)添加至該凝聚胺。在存在病毒的情況下將CD3<sup>+</sup> T細胞以800g在30°C下離心90分鐘，伴以緩慢加速且無制動器。離心之後，移除500  $\mu$ L培養基且添加500  $\mu$ L新鮮培養基或500  $\mu$ L病毒。4天後，分析人類T細胞之TCR表面表現。為了測試表面表現，將細胞沖洗且用螢光抗體及pMHC多聚體在FACS緩衝劑中染色，並藉由流式細胞測量術分析。

### 生存力分析

【0340】使用Nucleocounter NC-200 (Chemometec)來量測細胞數及生存力。此儀器利用具有內置移液器之卡匣Via-2來抽吸樣本容積，且用固定於卡匣內之螢光染料吖啶橙(AO)及4',6-二甲脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色樣本，隨著該等染料前進穿過流體通道，其分別染色總細胞群及死亡細胞群，在卡匣之讀取範圍之前。一旦卡匣負載至儀器中，使用經設計用於PBMC樣本之方法且報告以細胞/毫升為單位之總細胞數(自己吸收AO染料之細胞數導出)，且由自呈DAPI標記物陽性之群體百分數外插之生存力百分比計算存活細胞群(細胞/毫升)。

【0341】在生存力分析方法之變化形式中，使用吖啶橙/碘化丙啶(AOPI)及細胞計數儀(Nexcelom)評定生存力，如下文所指示。

### 基因組靶向分析

【0342】輸入輸出PCR技術用以確認相關基因經由兩對引子(靶向上

游接合點之引子對及下游接合點引子對)至TCR $\alpha$ 基因座中之精確基因組整合。在工程改造T細胞之輸入輸出PCR之後偵測具有正確質量之兩個擴增序列確認經整合neoTCR序列卡匣至TCR $\alpha$ 基因組基因座中之正確插入。

**【0343】** 用於輸入輸出PCR技術之引子為

上游前向引子：TGCTAATCCTCCGGCAAACC (SEQ ID NO: 1)

上游反向引子：TTCTTCAACATCGCCAGCCT (SEQ ID NO: 2)

下游前向引子：CAGCCATCTGTTGTTTGCCC (SEQ ID NO: 3)

下游反向引子：AGCTTTCTGGCGTCCTTAGAAT (SEQ ID NO: 4)

**【0344】** 基因組DNA自工程改造T細胞分離，且標準PCR技術用以擴增相關基因組區域及藉由凝膠電泳分析PCR產物。

### *用於功能分析之T細胞/標靶細胞共培養*

**【0345】** 工程改造T細胞(100,000個)與表現用不同濃度(自0.01至1000 nM之10倍連續稀釋)之特異性肽脈衝之HLA-A2的標靶細胞(25,000個)共培養(效應比靶標之比率4:1)。在方法之變化形式中，T細胞(50,000個)與表現HLA-A2之標靶細胞(25,000個)以效應比靶標之比率2:1共培養，如下文所指示。冷凍乾燥肽(Bio-Synthesis Inc, GenScript)在DMSO中重構至10 mM且接著在DMSO中進一步稀釋至1 mM工作儲備液。接著，使用1 mM起始溶液(1  $\mu$ L 1 mM工作儲備液/9  $\mu$ L DMSO)執行肽之10倍連續稀釋直至達至0.01 nM為止。靶標A2至K562細胞(1 M總細胞/肽濃度， $1 \times 10^6$ 個細胞/毫升)用1  $\mu$ L之肽連續稀釋液在15 mL錐形管中脈衝且在37°C下培育1小時。培育後，將9 mL培養基添加至各管中且接著以1000 rpm離心5分鐘。用10 mL培養基洗滌細胞小球一次且接著將其再懸浮於4 mL培養基中以用於共培育實驗。在「無肽」或「0肽」的情況下未使用

肽。

【0346】以構成方式表現匹配及失配肽-HLA (pHLA)之標靶細胞亦用作對照以評定特異性，如所指示。K562標靶細胞用編碼HLA肽分子之慢病毒載體進行轉導，該HLA肽分子含有用ZsGreen作為K562細胞之轉導標記物的Neo12、MART1或NYESO1肽。經表現HLA (MHC)肽分子由具有抗原肽、 $\beta$ 2-微球蛋白及HLA-A2域之線性組合物的單一多肽鏈經由可撓性GS連接子及二硫化物截留修飾而構成，如Bethune等人(*eLife* 5: 2016)中更詳細地描述，其全部教示內容以引用之方式併入本文中。

### ***T細胞細胞毒性分析***

【0347】在將T細胞與標靶細胞共培養48小時之後，在4°C下在暗處使用存活/死亡細胞染色套組(用於流動之存活/死亡近IR生存力染料，目錄號NC0584313，ThermoFisher)將細胞染色20分鐘。在具有受損膜之細胞中，染料與在細胞內部中以及細胞表面上之游離胺反應，從而產生強烈螢光染色。在活細胞中，染料之反應性限於細胞表面胺，從而產生不太強烈的螢光。在存活細胞與死亡細胞之間的強度差通常大於50倍，以使得易於區別。在培育後，將細胞洗滌，用eBioscience IC固定緩衝劑(ThermoFisher，目錄號00-8222-49)固定且藉由流式細胞測量術分析。

### ***增殖分析***

【0348】工程改造T細胞在共培養之前用細胞增殖染料e450(ThermoFisher，目錄號65-0842-90)預標記。此螢光染料結合至含有一級胺之任何細胞蛋白，且隨著細胞分裂，染料相等地分佈在可測量為染料之螢光強度連續減半的子細胞之間。如針對T細胞細胞毒性分析所描述般執行共培養分析。在將T細胞與標靶細胞共培養72小時之後，用eBioscience

IC固定緩衝劑(ThermoFisher，目錄號00-8222-49)將細胞固定且藉由流式細胞測量術分析。

### 細胞介素產生分析

**【0349】** 使用細胞介素珠粒分析(CBA，來自BD BioSciences之珠粒類免疫分析)在共培養物之上澄液中評定細胞介素產生。CBA為流式細胞測量術多工珠粒類免疫分析應用，其允許藉由使用抗體塗佈之珠粒使多個多種蛋白質同時量化以有效地捕獲分析物。在將T細胞與標靶細胞共培養24小時之後，收集上清液且對IFN $\gamma$ 、IL-2及TNF $\alpha$ 分泌進行分析。

### 實例2：TCR $\alpha$ 基因座中之報導子整合

**【0350】** 將ZsGreen報導子構築體整合至TCR $\alpha$ 基因座中。**圖1**呈現表示所用通用編輯策略之示意圖。簡言之，通用TCR $\alpha$ 基因座靶向策略使用同源修復模板，其含有由1 kb左側及右側同源臂(「HR臂」)側接且由P2A序列分離之無啟動子ZsGreen及截斷LNGRF編碼序列，以及將ZsGreen及LNGRF卡匣自TCR $\alpha$ 基因座序列分隔，在環狀奈米質體中經編碼之5' P2A序列(參見SEQ ID NO: 8)。**圖2**呈現用於ZsGreen整合之通用編輯時間線。簡言之，將PBMC解凍且使用CD3陰性選擇將初代人類T細胞分離並用抗CD3/抗CD28刺激，如上文所描述。形成使用sgRNA之核糖核蛋白(RNP)複合物，該sgRNA靶向內源性TCR $\alpha$ 基因座(亦稱為TRAC基因座)，如上文所描述。此處，sgRNA併入TRAC gRNA靶向序列GAGAATCAAAATCGGTGAAT (SEQ ID NO: 21)。將HR模板、RNP複合物及T細胞混合且電穿孔，如上文所描述。電穿孔後，用含有IL-2 (20 ng/mL)之培養基培養細胞。

**【0351】** 由於ZsGreen報導子不具有啟動子，因此僅精確框內融合

物應產生可偵測信號。另外，對TCR $\alpha$ 基因座之適當靶向應導致同時敲除TCR $\alpha$ 及耗損表面表現TCR複合物。實際上，如圖3中所示，當HR模板及RNP兩者包括在內(圖3右側圖「KO-KI」)時，偵測到ZsGreen陽性/TCR陰性細胞之高百分比(大於22%)。值得注意的是，ZsGreen陽性亦為表明ZsGreen報導子適當地整合至TCR $\alpha$ 基因座中之TCR陰性。作為對照，缺乏RNP並不產生高於視為先前技術之層級的ZsGreen陽性細胞或TCR陰性細胞(圖3左側圖)。在各種經測試條件下之編輯效率量化於表5中。

表5：T細胞使用ZsGreen報導子之編輯效率

|                        | TCR+ GFP- | TCR+ GFP+ | TCR- GFP- | TCR- GFP+ |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| HR DNA + RNP           | 2.61      | 0.094     | 75        | 22.4      |
| 僅HR DNA                | 96.8      | 0.071     | 3.16      | 0.021     |
| 偽處理                    | 98.4      | 0.00948   | 1.6       | 0.00118   |
| 僅RNP                   | 18.4      | 0.023     | 81.6      | 0.065     |
| 1 $\mu$ g DNA模板ZsGreen | 73        | 25.6      | 1.8       | 0.36      |

實例3：TCR $\alpha$ 基因座策略中之新抗原特異性TCR整合

【0352】 將新抗原特異性TCR構築體(neoTCR)整合至TCR $\alpha$ 基因座中。圖4呈現表示所用通用靶向策略之示意圖。簡言之，通用TCR $\alpha$ 基因座靶向策略使用含有由1 kb左側及右側HR臂側接之neoTCR編碼序列的同源修復模板。另外，內源性TCR $\beta$ 基因座斷裂，使得僅表現由neoTCR構築體編碼之TCR序列。使用作為奈米質體或pUCu質體之環狀HR模板來應用通用策略。

【0353】 新抗原特異性TCR構築體設計圖解於圖5中。靶標TCR $\alpha$ 基因座(「TRAC (C $\alpha$ )」)與質粒HR模板一起展示，且展示所得經編輯序列及下游mRNA/蛋白質產物。展示靶標TCR $\alpha$ 基因座(內源性TRAC)及其CRISPR Cas9靶位點(水平條帶，由箭頭指示之裂解位點) (圖5A，上部圖)。展示具有編碼neoTCR之聚核苷酸的環狀質粒HR模板(圖5A，下部圖)。

圖)，其位於左側同源臂與右側同源臂(分別為「LHA」及「RHA」)之間。展示由經密碼子優化之HR模板引入的TRAC區域(豎直條帶)。TCR $\beta$ 恆定域來源於表示為功能上等效於TRBC1之TRBC2。neoTCR卡匣中之其他元素包括：2A = P2A核糖體跳躍元素；F =自上游TCR $\beta$ 蛋白質移除2A標記之2A之弗林裂解位點上游；HGH =人類生長激素信號序列。neoTCR表現基因卡匣之HR模板包括兩個側接同源臂以引導插入至藉由具有TCR $\alpha$ 前導RNA之CRISPR Cas9核酸酶RNP靶向的TCR $\alpha$ 基因組基因座中。此等同源臂(LHA及RHA)側接neoTCR表現基因卡匣之neoE特異性TCR序列。

【0354】一旦整合至基因組中(圖5B，上部圖)，就將neoTCR表現基因卡匣自內源性TCR $\alpha$ 啟動子轉錄為單一信使RNA，該內源性TCR $\alpha$ 啟動子另外包括來自該個別T細胞之內源性TCR $\alpha$ 多肽的一部分(圖5B，中間圖)。在此單一neoTCR 信使RNA之核糖體多肽轉譯期間，PACT neoTCR序列未藉由在來源於豬捷申病毒-1之P2A核糖體跳躍序列處自身裂解而自內源性CRISPR斷裂之TCR $\alpha$ 多肽連接(圖5B，下圖)。經編碼neoTCR $\alpha$ 及neoTCR $\beta$ 多肽亦未藉由內源性細胞人類弗林蛋白酶及包括於neoTCR表現基因卡匣中之第二自身裂解P2A序列基元而經由裂解彼此連接(圖5B，下圖)。藉由信號前導序列(來源於人類生長激素，HGH)將neoTCR $\alpha$ 及neoTCR $\beta$ 多肽單獨地靶向至用於多聚體裝配及將neoTCR蛋白質複合物運輸至T細胞表面之內質網。納入弗林蛋白酶裂解位點有助於自上游TCR $\beta$ 鏈移除2A序列以減小對TCR $\beta$ 功能之電位干擾。在各2A (未圖示)之前納入gly-ser-gly連接子進一步增強三個多肽之分離。

【0355】另外，三個重複蛋白序列在HR模板內經密碼子編碼分歧以促進基因組穩定性。在TCR基因卡匣內兩個P2A相對於彼此經密碼子編碼

分歧，並且兩個HGH信號序列相對於彼此經密碼子編碼分歧，以促進活體外工程改造T細胞基因組內所引入之neoTCR卡匣序列的穩定性。類似地，重新引入之TRAC外顯子1之5'端(豎直條帶)減小隨時間推移經由移除兩個直接重複之介入序列而損耗整個卡匣的可能性。

**【0356】** 圖6呈現用於編輯插入neoTCR構築體之T細胞之通用編輯時間線。簡言之，在標準編輯程序之後培養初代人類T細胞(新鮮或冷凍)，如上文所描述。形成使用sgRNA之核糖核蛋白(RNP)複合物，該sgRNA靶向具有TRAC gRNA靶向序列GAGAATCAAAATCGGTGAAT (SEQ ID NO: 21)之內源性TCR $\alpha$ 基因座(亦稱為TRAC基因座)，如上文所描述。另外，形成使用sgRNA之RNP複合物，該sgRNA靶向具有TRBC gRNA靶向序列GGCTCTCGGAGAATGACGAG (SEQ ID NO: 22)之內源性TCR $\beta$ 基因座(亦稱為TRBC基因座)，如上文所描述。將HR模板、RNP複合物及T細胞混合且電穿孔，如上文所描述。接著在細胞介素存在下培養電穿孔之T細胞(亦即，經修飾細胞)，如上文所描述。

#### 實例4：NeoTCR整合(MART-1)

**【0357】** 將MART-1 neoTCR整合至TCR $\alpha$ 基因座中。在標準電穿孔介導之編輯程序及插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.F5.TRBOpt.f-P2A.TRAopt.BGHpA (SEQ ID NO: 9)編碼的MART-1 neoTCR構築體之後編輯T細胞。

**【0358】** 輸入輸出PCR技術用以確認neoTCR構築體經由兩對引子(靶向上游接合點之引子對及下游接合點引子對)至TCR $\alpha$ 基因座中之精確基因組整合(示意性呈現於圖7中之上部圖)。在工程改造T細胞之輸入輸出PCR之後偵測具有正確質量之兩個擴增序列用以確認經整合neoTCR序列

卡匣至TCR $\alpha$ 基因組基因座中之正確插入。如圖7中所示，未觀測到僅用質體DNA HR模板而不用核酸酶(「僅DNA」)治療之細胞的整合。觀測到與僅TCR $\alpha$ 核酸酶(「KOKI」)或TCR $\alpha$ 加TCR $\beta$ 核酸酶(「KOKI KO」)一起工程改造之細胞的上游(圖7左側圖)及下游(圖7右側圖)接合點兩者之擴增產物。因此，結果表明在適當時，neoTCR構築體恰當地經整合且內源性TCR $\beta$ 斷裂。

【0359】藉由流式細胞測量術評定工程改造T細胞的MART-1 neoTCR表現。如圖8A中所示，藉由以較小(20  $\mu$ L，圖8A左下圖)及較大(100  $\mu$ L，圖8A右下圖)編輯形式染色之MART-1特異性抗原決定基肽多聚體偵測MART-1 neoTCR之表現。僅在HR模板不具有RNP (圖8A左上圖)時僅偵測到信號之背景層級，或僅在RNP不具有HR模板(圖8A右上圖)時僅使用信號之背景層級。在編輯程序之後的不同時間點可見類似結果。在編輯程序之後第4天，基因編輯之結果定量於下表6中。在編輯程序之後第7天，基因編輯之結果定量於下表7中。在編輯程序之後第10天，基因編輯之結果展示於圖8B中，在提供HR模板及RNP複合物兩者時具有經整合neoTCR (條紋狀)。因此，結果表明在提供HR模板及RNP複合物兩者時，neoTCR構築體在整合至TCR $\alpha$ 基因座中之後恰當地表現。

表6：TCR編輯第4天

|                 | TCR+ Dex- | TCR+ Dex+ | TCR- Dex+ | TCR- Dex- |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 20 ul HR + RNP  | 10.3      | 8.5       | 0.14      | 81.2      |
| 100 ul HR + RNP | 12.1      | 11.6      | 0.45      | 76.1      |
| 僅RNP *          |           |           |           |           |
| 20 ul HR        | 99        | 0.23      | 0         | 0.77      |
| 偽處理             | 98.7      | 0.29      | 0         | 1.06      |

\* 自分析省略

表7：TCR編輯第7天

|                 | TCR+ Dex- | TCR+ Dex+ | TCR- Dex+ | TCR- Dex- |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 20 ul HR + RNP  | 8.4       | 17.4      | 0.4       | 73.8      |
| 100 ul HR + RNP | 26.8      | 28        | 0.61      | 44.6      |
| 僅RNP            | 20.7      | 0.067     | 0.22      | 79        |
| 20 ul HR        | 98.2      | 0.78      | 0.00154   | 0.97      |
| 偽處理             | 98.6      | 0.37      | 0.00297   | 1.07      |

【0360】 評定工程改造T細胞的抗原特異性細胞介素產生。如圖9中所示，表現MART-1 neoTCR之工程改造T細胞在與以構成方式表現MART-1同源抗原肽(圖9，「K562 HLA-A02/MART1」)或用MART-1同源抗原肽脈衝(圖9，「K562 HLA-A02 (10 μM MART1)」)之HLA-A02標靶細胞共培育(E:T比率2:1)時產生IFN $\gamma$ 及IL-2兩者。在與未用同源肽脈衝之HLA-A02標靶細胞(圖9，「K562 HLA-A02」)共培育時，或在與表現非同源MHC HLA-A01之標靶細胞(圖9，分別為「K562 HLA-A01 (10 μM MART1)」及「K562 HLA-A01」)共培育時，在有意義的層級處未觀測到細胞介素產生。因此，表現MART-1 neoTCR之工程改造T細胞證明抗原特異性細胞介素產生。

【0361】 評定工程改造T細胞的抗原特異性增殖及抗原特異性T細胞介導之殺傷。如圖10A中所示，表現肽特異性pHLA之將轉導K562標靶細胞證明在與表現MART-1 neoTCR之T細胞共培育(E:T比率2:1)時幾乎不或不增殖，該MART-1 neoTCR使用較小(圖10A，「MART-1」)或較大(圖10A，「MART-1 (較大)」)編輯形式進行工程改造。相比之下，標靶細胞在單獨培育(圖10A，「僅標靶細胞」)或與進行假擬編輯程序但未經工程改造以表現neoTCR (亦即，未經HR模板或RNP電穿孔)之T細胞共培育(圖10A，「偽處理」)時生長。如圖10B中所示，標靶細胞在與表現MART-1 neoTCR之T細胞共培育(E:T比率2:1)時經殺傷，該MART-1 neoTCR使用

較小(圖10B,「MART-1」)或較大(圖10B,「MART-1 (較大)」)編輯形式進行工程改造。相比之下,在單獨培育(圖10B,「僅標靶細胞」)或與進行假擬編輯程序但未經工程改造以表現neoTCR之T細胞共培育(圖10B,「偽處理」)時觀測到極少標靶細胞死亡。因此,表現MART-1 neoTCR之工程改造T細胞證明標靶細胞之抗原特異性殺傷。

#### 實例5：比較經由電穿孔及轉導之編輯效率

【0362】 T細胞在標準電穿孔介導之HR編輯程序或慢病毒轉導程序之後經工程改造以表現TCR $\alpha$ 基因座處之neoTCR。由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHpA (SEQ ID NO: 9)編碼之MART-1 neoTCR構築體用於電穿孔介導之編輯。如圖11中所示,使用慢病毒轉導程序產生表現MART-1或NY-ESO neoTCR之工程改造T細胞(圖11,上部圖)或使用利用較小或較大形式之電穿孔介導之HR編輯產生表現MART-1 neoTCR之工程改造T細胞(圖11,下部圖)。因此,電穿孔介導之HR編輯產生類似於或大於慢病毒轉導之工程改造T細胞百分比。

【0363】 評定工程改造T細胞的抗原特異性T細胞介導之殺傷。如圖12中所示,以構成方式表現MART-1同源抗原肽(圖12,各組中之底部柱)或用MART-1同源抗原肽脈衝(圖12,各組中自底部之第二柱)之HLA-A02標靶細胞在與表現MART-1 neoTCR之T細胞共培育(E:T比率2:1)時可比較地經殺傷,該MART-1 neoTCR使用HR-介導之編輯(圖12,「MART1 TCR HR」)或慢病毒轉導(圖12,「MART1 TCR lenti」)進行工程改造。相比之下,在與表現非同源NY-ESO TCR (圖12,「NY-ESO TCR lenti」)之T細胞共培育或與進行假擬編輯程序但未經工程改造以表現

neoTCR (圖12,「偽處理」)之T細胞共培育時觀測到極少標靶細胞死亡。另外,在與未用同源肽(圖12,各組中之中間柱)脈衝之HLA-A02標靶細胞共培育時,或在與表現非同源MHC HLA-A01 (圖12,各組中之前兩柱,來自頂部之第二柱用10 μM MART1脈衝)之標靶細胞共培育時,以上背景層級未觀測到殺傷。資料之量化呈現於下表8中。因此,在標準電穿孔介導之HR編輯程序或慢病毒轉導程序之後經工程改造以表現neoTCR之T細胞展現類似的殺傷。

表8：在藉由電穿孔或轉導編輯之後的細胞毒性殺傷

|                     | K562 HLA-A01無肽 | K562 HLA-A01 10uM MARTI | K562 HLA-A02無肽 | K562 HLA-A02 10uM MART1 | K562 HLA-A02 /MART1 |
|---------------------|----------------|-------------------------|----------------|-------------------------|---------------------|
| 偽處理                 | 9.8            | 9.8                     | 9.8            | 9.5                     | 9.4                 |
| NY-ESO TCR<br>lenti | 8.1            | 8.3                     | 8.6            | 8.7                     | 8.4                 |
| MARTI TCR<br>lenti  | 9.5            | 8.5                     | 8.1            | 38.1                    | 39.4                |
| MARTI TCR<br>HR     | 11.0           | 10.6                    | 10.4           | 25.6                    | 34.5                |

實例6：比較使用環狀或線性HR模板之編輯效率

【0364】 測試使用由PCR產生的純化環狀質體DNA及線性dsDNA作為HR模板之相對HR介導之編輯效率。使用具有核酸酶受保護之5'(5'封端硫代磷酸酯主鏈鍵聯)之引子產生的標準PCR產物(圖13A頂部)以及PCR產物用以產生標準線性dsDNA及「半受保護」線性dsDNA(圖13A底部)。將Neo12 neoTCR整合至TCRα基因座中。在標準電穿孔介導之編輯程序及插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)或線性HR模板Linear\_TRAC(1k)P2A.neo12. TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 12)編碼之Neo12 neoTCR構築體之後編輯T細胞。藉由表現neoTCR之T細胞的如藉由Neo12特異性抗原決定基肽多聚體染色所測定之百分比評定編

輯效率。即使在跨一系列濃度測試時(此處展示相等質量)，質體DNA之使用產生與線性HR模板(圖13B中間及右側柱分別為14.3%及14.4%)相比明顯較高層級之編輯(47.3%，圖13B左側柱)。在單獨測試中，線性共價閉合DNA (dbDNA，Toughlight)經測試且展現與線性開端式PCR產物(資料未展示)類似的型態。因此，結果支持以下結論：攜帶與線性HR模板相同的HR靶向序列之環狀質體DNA HR模板支持相對於線性PCR產生之DNA高~3倍的編輯效率。

#### 實例7：比較由不同來源產生之環狀HR模板

【0365】 使用由不同來源產生之環狀HR模板在標準電穿孔介導之編輯程序中測試生存力。將Neo12 neoTCR整合至TCR $\alpha$ 基因座中。T細胞藉由插入由以純化形式購買(圖14「pUC57」，Nature Technology)或用DNA純化套組內部純化(圖14「內部pUC57」，Maxi套組Macherey Nagel)之環狀HR模板pUCu-Kan TRAC(1k)\_P2A.Neo12.TRBC2opt.f-P2A.TRA(Va) (SEQ ID NO: 14)編碼的Neo12 neoTCR構築體來編輯。如圖14中所示，T細胞可藉由細胞數(圖14左側圖)及如藉由生存力分析所評定(AOPI，圖14右側圖)存活，其中HR模板內部純化以達成大於60%生存力且購買HR模板以達成大於80%生存力。

【0366】 值得注意的是，此等結果與最近公佈的報告(Roth等人 [Nature. 2018年7月;559(7714):405-409])不一致，該報告描述環狀質粒HR模板在如使得T細胞生存力與線性產物相比降低之電穿孔介導之編輯中的使用。

#### 實例8：NeoTCR整合(Neo12)

【0367】 將Neo12 neoTCR整合至TCR $\alpha$ 基因座中。在標準電穿孔介

導之編輯程序及插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k) DTS\_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)編碼之Neo12 neoTCR構築體之後編輯T細胞。藉由流式細胞測量術評定工程改造T細胞的Neo12 neoTCR表現。藉由Neo12特異性抗原決定基肽多聚體染色來偵測Neo12 neoTCR之表現。值得重視地，所用Neo12構築體經修飾以使得其不與泛-TCR抗體結合。如圖15中所示，36.5%的T細胞表現Neo12 neoTCR且並不表現內源性TCR (圖15右側圖)。另外，大多數T細胞(96%)之內源性TCR表現中斷。在T細胞進行假擬編輯程序時僅偵測到neoTCR表現信號之背景層級(圖15左側圖)。

【0368】亦藉由插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k) DTS\_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)編碼之Neo12 neoTCR構築體來執行額外編輯實驗。如上評定工程改造T細胞。如圖16中所示，74.5%的T細胞表現Neo12 neoTCR且並不表現內源性TCR (圖16右側圖)。另外，大多數T細胞(98.6%)之內源性TCR表現中斷。在T細胞進行假擬處理時僅偵測到neoTCR表現信號之背景層級(圖16左側圖)。

#### 實例9：不同NeoTCR之NeoTCR整合

【0369】將各種neoTCR整合至TCR $\alpha$ 基因座中。在標準電穿孔介導之編輯程序及插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 10)編碼之MART-1 neoTCR構築體、由NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)編碼之Neo12 neoTCR構築體或由環狀HR模板NTC9385R-TRAC

(1k)DTS\_P2A.1G4.TRBOpt.f-P2A.TRAopt.BGHPA (SEQ ID NO: 11)編碼之NY-ESO neoTCR構築體之後編輯T細胞。藉由流式細胞測量術經由neoTCR特異性抗原決定基肽多聚體染色來評估經工程改造之T細胞的相應neoTCR表現。所用neoTCR構築體經修飾以使得其不與泛-TCR抗體結合。如圖17中所示，39.6%、36.5%及28.5%的T細胞分別表現neoTCR MART-1、Neo12及紐約-ESO，且並不表現內源性TCR (相應地，圖17左側圖、中間圖及右側圖)。另外，大多數T細胞(相應地，97.9%、96%及86.6%)之內源性TCR表現中斷。因此，使用不同neoTCR進行工程改造之T細胞通常產生類似編輯效率,其支持以下結論：編輯效率使用本文中所描述之T細胞編輯方法跨不同TCR表現構築體可再現。

#### 實例10：患者衍生T細胞中之NeoTCR整合

【0370】各種neoTCR經整合至健康或患者衍生之T細胞之TCR $\alpha$ 基因座中(典型地根據Bio選擇及Conversant Bio使用之黑素瘤、結腸直腸癌及肺癌)。遵循標準電穿孔法介導的編輯程序並插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.F5.TRBOpt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 10)編碼之MART-1 neoTCR構築體、由NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.neo12.TRBOpt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)編碼之Neo12 neoTCR構築體或由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.1G4.TRBOpt.f-P2A.TRAopt.BGHPA (SEQ ID NO: 11)編碼之NY-ESO neoTCR構築體來編輯T細胞。藉由流式細胞量測術經由neoTCR特定抗原決定基肽多聚體染色來評估經工程改造之T細胞的相應neoTCR之表現。

【0371】如圖18A中所展示，以針對Neo12及MART-1構築體之類似

效率來編輯來自健康樣本或患者樣本之T細胞。另外，編輯效率在所測試之各種neoTCR構築體中為類似的，以及在樣本之間展現可重複的編輯效率。如圖18B中所展示，以接近75%之效率編輯來自健康樣本的T細胞，插入Neo12 neoTCR。

【0372】 Neo12 neoTCR經另外測試且編輯效率結果呈現於表9中。特定言之，觀測到對於患者1衍生之T細胞之重複樣本的類似編輯效率(對於複本#1之36.2%及對於複本#2之36.4%)，進一步展現本文中描述之T細胞編輯方法之再現性。因此，結果展現本文所描述之T細胞編輯方法皆大體上適用於臨床環境內之多種表現構築體且可再現。

表9：對於供體衍生細胞之Neo12編輯效率

|           | 偽處理1 | 偽處理2 | 健康1  | 健康2  | 患者1 #1 | 患者1 #2 | 患者2  |
|-----------|------|------|------|------|--------|--------|------|
| 僅WT%      | 93.2 | 93.5 | 1.6  | 17.6 | 6.6    | 8.4    | 14.4 |
| WT+Neo12% | 0.7  | 0.4  | 0.6  | 0.6  | 0.7    | 1.3    | 1    |
| 無TCR%     | 6.1  | 6.1  | 58.6 | 63.8 | 56.5   | 53.9   | 60.2 |
| 僅Neo12%   | 0    | 0    | 39.2 | 17.2 | 36.2   | 36.4   | 24.4 |

假擬=進行假擬編輯程序

實例11：CD4及CD8 T細胞中之NeoTCR整合

【0373】 評估CD4及CD8 T細胞之編輯效率。將Neo12 neoTCR整合至TCRα基因座中。遵循標準電穿孔法介導的編輯程序並插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_ P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)編碼之Neo12 neoTCR構築體來編輯T細胞。值得重視地，本文所用之Neo12構築體經修飾使得其未與pan-TCR抗體結合。藉由Neo12 neoTCR (Neo12特定抗原決定基肽多聚體染色)之表現來評估CD8 T細胞之編輯。可能因MHC I類分子上存在之肽所致，抗原決定基肽多聚體染色不夠敏感以偵測CD4 T細胞上之分子neoTCR，且並不存在CD8以穩定MHC-I/TCR相互作用。因此，藉由並未結合pan-TCR抗體之

CD3複合物之偵測來評估CD4 T細胞之編輯。如圖19中所展示，以類似效率編輯CD8及CD4 T細胞兩者。因此，結果顯示本文中描述之T細胞編輯方法均廣泛適用於不同T細胞群。

### 實例12：NeoTCR表現量

【0374】在整合至TCR $\alpha$ 基因座中之後來測試多種neoTCR之表面表現量。遵循標準電穿孔法介導的編輯程序並插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 10)編碼之MART-1 neoTCR構建體、由NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)編碼之Neo12 neoTCR構建體或由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.1G4.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHpA (SEQ ID NO: 11)編碼之NY-ESO neoTCR構建體來編輯T細胞。藉由流式細胞量測術經由染色抗CD3來評估多種neoTCR及內源性TCR之表面表現。

【0375】如圖20中所展示，整合式neoTCR之表面表現與內源性TCR表面表現量相當。平均螢光強度(MFI)流動式細胞測量術曲線大部分交疊使用相同抗體(CD3)染色之內源性TCR (圖20A，左直方圖)及Neo12 neoTCR TCR (圖20A，右直方圖)。對於全部三個經測試neoTCR之MFI計算量化於圖20B中，伴隨各自展現與內源性TCR量相當之表面表現。因此，結果顯示本文中描述之T細胞編輯方法引起完整TCR (亦即，TCR $\alpha$ 及TCR $\beta$ 兩者)之表面表現以與內源性相當之量編碼插入的表現卡匣。

### 實例13：較大格式非冷凍T細胞中之NeoTCR整合

【0376】使用Prodigy平台將新分離的PBMC (亦即，未冷凍)收集於leukopak及T細胞中。藉由插入由環狀HR模板pUCu-Kan

TRAC(1k)\_P2A.Neo12.TRBC2opt.f-P2A.TRA(Va) (SEQ ID NO: 14)編碼之Neo12 neoTCR構築體來編輯T細胞。藉由Neo12特定抗原決定基肽多聚體染色來檢測Neo12 neoTCR之表現。

【0377】如圖21中所展示，41.6%之CD8陽性T細胞表現Neo12構築體。因此，結果顯示本文中描述之T細胞編輯方法可應用於臨床環境中。

#### 實例14：經編輯T細胞為功能性的

【0378】評估經編輯T細胞之T細胞功能性。更特定言之，使用藉由肽脈衝(圖22中所說明)或經工程改造以表現預成於HLA複合物中之肽(pHLA，圖23中所說明)的標靶細胞(HLA-A02表現K562細胞)來評估T細胞之細胞介素產生/分泌、T細胞增殖及抗原特異性標靶細胞殺滅。

【0379】遵循標準電穿孔法介導的編輯程序並插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 10)編碼之MART-1 neoTCR構建體、由NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)編碼之Neo12 neoTCR構建體或由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.1G4.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHpA (SEQ ID NO: 11)編碼之NY-ESO neoTCR構建體來編輯T細胞。

【0380】如所描述，評估經工程改造T細胞之抗原特異性T細胞介導的殺滅。如圖24中所展示，當標靶細胞以肽濃度依賴性方式(圖24，0-1000ng/ml)脈衝其相應同源肽，或經工程改造以表現肽/HLA複合物(圖24，pHLA) (E:T比率4:1)時，在與T細胞一起共培育時，標靶細胞經殺滅。值得注意地，可能因由HLA呈現之脈衝肽之瞬時本質所致，相比於肽脈衝細胞，經工程改造以表現肽/HLA複合物之標靶細胞顯示幾乎完全殺

滅，表明更生理學上相關情形(例如抗原肽之非瞬態呈現)可導致高水準之殺滅。另外，T細胞之抗原特異性殺滅亦展現使用肽/HLA複合物之經工程改造標靶細胞與使用磷脂結合蛋白V細胞死亡檢定之表現T細胞的Neo12一起共培育(E:T比率4:1，資料未展示)。因此，經工程改造T細胞展現標靶細胞之抗原特異性殺滅。

【0381】如所描述，評估經工程改造T細胞之抗原特異性T細胞增殖。如圖25中所展示，表現T細胞之Neo12在與經Neo12同源肽以肽濃度依賴性方式脈衝(圖25A及25B，0-1000ng/ml)或經工程改造以表現肽/HLA複合物(圖25B，pHLA)(E:T比率2:1)之標靶細胞一起共培育時增殖。圖25A展示藉由圖25B中計算之分裂細胞%展現增殖之代表性直方圖曲線。因此，經工程改造T細胞在與呈現同源肽之標靶細胞一起共培育時展現抗原特異性增殖。

【0382】評估經工程改造T細胞之抗原特異性細胞介素產生。如圖26中所展示，表現T細胞之Neo12在與經Neo12同源肽以肽濃度依賴性方式脈衝(圖26A-D，0-1000ng/ml)或經工程改造以表現肽/HLA複合物(圖26A-D，pHLA)(E:T比率4:1)之標靶細胞一起共培育時產生細胞介素。值得注意地細胞介素型態展現產生Th1促發炎細胞介素IFN $\gamma$ 、IL-2、TNF $\alpha$ 及極小IL-6 (分別地呈現於圖26A-D)中，但並未顯示產生Th2細胞介素IL-4或IL-10 (資料未示出)。因此，經工程改造T細胞在與標靶細胞一起共培育時展現抗原特異性促發炎Th1細胞介素型態。

#### 實例15：經編輯供體衍生T細胞為功能性的

【0383】在編輯之後評估衍生自供體之T細胞的T細胞功能性。將Neo12 neoTCR整合至TCR $\alpha$ 基因座中。遵循標準電穿孔法介導的編輯程

序並插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)編碼之Neo12 neoTCR構築體來編輯T細胞。藉由流式細胞量測術經由neoTCR特定抗原決定基肽多聚體染色來評估經工程改造T細胞之編輯效率。如圖27A中所展示，以類似效率編輯衍生自健康供體及患者供體之T細胞。

【0384】 如所描述，評估經工程改造T細胞之抗原特異性T細胞介導的殺滅。如圖27B中所展示，當標靶細胞以肽濃度依賴性方式脈衝其相應同源肽(圖27B，0-1000ng/ml)或經工程改造以表現肽/HLA複合物(圖27B，「Neo12 HLA」)(E:T比率4:1)時，標靶細胞在與表現衍生自健康供體及患者供體之T細胞的經編輯Neo12一起共培育時經殺滅。值得注意的是，經工程改造以表現非同源肽/HLA複合物之標靶細胞並未顯示顯著殺滅(圖27B，「MART1 HLA」)。另外，當使用進行假擬編輯程序之T細胞時，未觀測到殺滅。因此，經工程改造健康供體衍生及患者衍生之T細胞展現在臨床環境內展現應用性之標靶細胞之抗原特異性殺滅。

【0385】 如所描述，評估經工程改造健康及患者供體衍生之T細胞之抗原特異性T細胞增殖。如圖27C中所展示，表現T細胞之Neo12在與經Neo12同源肽以肽濃度依賴性方式脈衝(圖27B，0-1000ng/ml)或經工程改造以表現肽/HLA複合物(圖27C，「Neo12 HLA」)(E:T比率4:1)之標靶細胞一起共培育時增殖。值得注意的是，經工程改造以表現非同源肽/HLA複合物之標靶細胞並未顯示T細胞增殖(圖27C，「MART1 HLA」)。另外，當T細胞經假擬處理時，未觀測到T細胞增殖。因此，經工程改造供體衍生T細胞在與呈現同源肽之標靶細胞一起共培育時展現抗原特異性增殖。

【0386】 評估經工程改造供體衍生之T細胞的抗原特異性細胞介素

產生。如圖27D中所展示，表現T細胞之Neo12在與經100nM Neo12同源肽(E:T比率4:1)脈衝之標靶細胞一起共培育時產生細胞介素。值得注意的是，細胞介素型態展現產生Th1促發炎細胞介素IFN $\gamma$ 、IL-2、TNF $\alpha$ 及極小IL-6。因此，經工程改造供體衍生之T細胞在與標靶細胞一起共培育時展現抗原特異性促發炎Th1細胞介素型態。

【0387】 值得注意的是，在執行展現經工程改造供體衍生之T細胞為功能性之檢定且無額外富集步驟之前，未將經工程改造供體衍生T細胞進行分類。

#### 實例16：表現多種neoTCR之供體衍生T細胞為功能性的

【0388】 在編輯之後評估衍生自供體之T細胞的T細胞功能性。將Neo12 neoTCR及MART-1 neoTCR兩者整合至TCR $\alpha$ 基因座中。遵循標準電穿孔法介導的編輯程序並插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.F5.TRBOpt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 10)編碼之MART-1 neoTCR構築體或由NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.neo12.TRBOpt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)編碼之Neo12 neoTCR構築體來編輯T細胞。藉由流式細胞量測術經由neoTCR特定抗原決定基肽多聚體染色來評估經工程改造T細胞之編輯效率。如圖28A中所展示，以針對Neo12及MART-1 (「F5」)構築體兩者之類似效率來編輯供體衍生之T細胞。

【0389】 如所描述，評估經工程改造T細胞之抗原特異性T細胞介導的殺滅(4:1 E:T比率)。如圖28B中所展示，當標靶細胞以肽濃度依賴性方式脈衝其相應同源肽(0-1000ng/ml)或經工程改造以表現肽/HLA複合物(「Neo12 HLA」及「MART-1 HLA」)(E:T比率4:1)時，標靶細胞在與表

現Neo12(空心正方形)或MART-1(填充正方形)的經編輯供體衍生之T細胞一起共培育時經殺滅。值得注意地，經工程改造以表現非同源肽/HLA複合物之標靶細胞並未顯示顯著殺滅，亦即，Neo12 T細胞並未殺滅MART1 HLA表現細胞且MART-1 T細胞(「F5」)並未殺滅Neo12 HLA細胞。如所描述，評估經工程改造供體衍生之T細胞的抗原特異性T細胞增殖。如圖28C中所展示，表現供體T細胞之Neo12 (空心正方形)或MART-1 (填充正方形)在與經其相應之同源肽以肽濃度依賴性方式(0-1000 ng/ml)脈衝或經工程改造以表現肽/HLA錯合物(「Neo12 HLA」及「MART-1 HLA」)之標靶細胞一起共培育時增殖(E:T比率4:1)。值得注意地，經工程改造以表現非同源肽/HLA複合物之標靶細胞並不展現T細胞增殖，亦即，Neo12 T細胞在與MART1 HLA表現細胞一起共培育時並不增殖且MART-1 T細胞(「F5」)在與Neo12 HLA細胞一起共培育時並不增殖。因此，展現在用於多個TCR構築體之臨床環境內之應用性的經工程改造供體衍生之T細胞在與呈現同源肽之標靶細胞一起培育時展現抗原特異性增殖。

【0390】 值得注意地，在執行展現經工程改造供體衍生之T細胞為功能性之檢定且無額外富集步驟之前，未將經工程改造供體衍生T細胞進行分類。

#### 實例17：經編輯T細胞保持功能活性

【0391】 評定源自工程改造供體(健康供體)之T細胞保持其長期培養之功能性的能力。將Neo12 neoTCR及MART-1 neoTCR兩者整合至TCR $\alpha$ 基因座中。在標準電穿孔介導之編輯程序及插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 10)編碼之MART-1 neoTCR構築體或由NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_

P2A.neo12.TRBOpt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)編碼之Neo12 neoTCR構築體之後編輯T細胞。

【0392】如圖29中所示，Neo12及MART-1工程改造T細胞能夠在以類似的效率製造之後14天(圖29左側圖)及2個月(圖29右側圖)以抗原特異性方式殺傷標靶細胞。當標靶細胞以肽濃度依賴性方式脈衝其對應的同源肽(0-1000 ng/ml)或經工程改造以表現肽/HLA複合物(「Neo12 HLA」及「MART-1 HLA」)時，標靶細胞在與表現Neo12 (空心圓)或MART-1 (實心圓)的源自經編輯供體之T細胞共培育(E:T比率4:1)時經殺傷。值得注意的是，經工程改造以表現非同源肽/HLA複合物之標靶細胞並未顯示顯著殺傷，亦即，Neo12 T細胞並未殺傷MART1 HLA表現細胞且MART-1 T細胞(「F5」)並未殺傷Neo12 HLA細胞。細胞保持在含有IL7及IL-15 (無抗原)之培養基中且在培養物中係健康的。因此，源自經編輯供體之T細胞在一段延長的時間內維持TCR表現及抗原特異性活性，顯示臨床配置內之適用性。

【0393】值得注意的是，在執行顯示源自經工程改造供體之T細胞具有功能性之分析之前而無額外富集步驟，未將源自經工程改造供體之T細胞分類。

### 實例18：特徵化源自經編輯供體之T細胞

【0394】評定源自經工程改造供體(健康供體)之T細胞在編輯之後的T細胞功能性。將Neo12 neoTCR及MART-1 neoTCR兩者整合至TCR $\alpha$ 基因座中。在標準電穿孔介導之編輯程序及插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.F5.TRBOpt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 10)編碼之MART-1 neoTCR構築體或由NTC9385R-

TRAC(1k)DTS\_P2A.neo12.TRBopt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13) 編碼之Neo12 neoTCR構築體之後編輯T細胞。

【0395】 對以每細胞計(Isoplexis)之表現工程改造T細胞的neoTCR執行單一細胞分泌組分析。Isoplexis平台利用單一細胞32叢細胞介素分析微型器件(單一細胞條碼晶片)來描繪T細胞對抗原特異性刺激之應答。CD4<sup>+</sup>及CD8<sup>+</sup> T細胞亞群使用抗CD4或抗CD8微珠(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, 德國)分離。CD4及CD8細胞單獨地用特異性肽/標靶細胞(與用10或100 nM特異性肽脈衝之標靶細胞或與經工程改造以表現特異性肽/HLA複合物之標靶細胞共培養)或對照物以1:2之比率在37°C, 5% CO<sub>2</sub>下刺激19至21小時。藉由用在室溫下與抗CD4或抗CD8抗體共軛10分鐘, 用磷酸鹽緩衝鹽水沖洗一次, 且以 $1 \times 10^6$ 個細胞/毫升之密度再懸浮於培養基中之Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Cell Therapy Systems, Waltham, MA)染色來確認CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup> T細胞之存在。將大致30  $\mu$ L之細胞懸浮液負載至單細胞條碼微晶片中以用於單細胞分泌組評估。對於各樣品, 32叢分析量測來自~2000個T細胞之分泌蛋白。使用Isoplexis軟體分析負載至單細胞條碼晶片及蛋白質分泌資料上之細胞樣本的原始顯微鏡及微陣列掃描以判定各個別細胞分泌哪種蛋白質組合。

【0396】 如圖30中所示, Isoplexis分析展現CD4及CD8 T細胞兩者之多功能型態。針對表現工程改造T細胞之Neo12 neoTCR (圖30A)及表現工程改造T細胞之MART-1 neoTCR (「F5」) (圖30B)展示CD4 (左側圖)及CD8 (右側圖)之型態。CD8<sup>+</sup> T細胞展現劑量依賴型多功能型態(多種細胞介素之分泌), 其中至多40%的細胞(表示在此實驗中經TCR編輯之細胞%, 因此所有經編輯T細胞均為多功能的)針對Neo12 neoTCR (圖30A, 右

側圖)及MART-1 (「F5」)T細胞(圖30B，右側圖)兩者產生多於一種細胞介素。CD4應答整體弱於CD8應答，可能係由於不存在穩定MHC-I/TCR相互作用之CD8。值得注意的是，CD4<sup>+</sup> MART-1 neoTCR(「F5」) T細胞在用標靶細胞進行抗原刺激之後展現多功能型態,該等標靶細胞用肽脈衝(圖30B，左側圖「10 nM」及「100 nM」)或經工程改造以表現MART-1肽/HLA複合物(圖30B，左側圖「MART1 HLA」)。相比之下，CD4<sup>+</sup> Neo12 T細胞在用經工程改造以表現Neo12肽/HLA複合物之標靶細胞刺激(圖30A，左側圖「Neo12 HLA」)時展現可偵測多功能型態，但在與用肽脈衝之標靶細胞一起培育(圖30A，左側圖「10 nM」及「100 nM」)時並不展現可偵測細胞介素產生，同樣可能係由於不存在穩定MHC-I/TCR相互作用之CD8。

【0397】 另外，如圖30C中所示，儘管工程改造T細胞之最大貢獻為IFN $\gamma$ 之總體層級(圖30C，左側圖)，但產生IFN $\gamma$ 之T細胞百分比小於經編輯細胞之數目(圖30C，右側圖)此係由於此研究之neo12 neoTCR及MART-1 neoTCR (F5)基因編輯效率為~45% (資料未展示)。相比之下，產生TNF $\alpha$ 之T細胞百分比比較佳與編輯效率相關，亦即，TNF的量(~45%)與基因編輯的量(~45%)相關。(圖30C，右側圖且資料未展示)。因此，Isoplexis結果表明藉由工程改造T細胞進行之TNF $\alpha$ 分泌與IFN $\gamma$ 分泌相比可為其活體外殺傷活性之較佳預測子。

【0398】 因此，Isoplexis分析表明工程改造neoTCR表現細胞群具有多功能活性，重要的是即使在低抗原刺激(活體內功效之重要考量)存在的情況下。

### 實例19：電穿孔時序效應效率

【0399】 評定RNP複合物與細胞在電穿孔之前的培育步驟之時序。在將活化T細胞採集、離心及再懸浮於電穿孔緩衝液中之後，在電穿孔及後續培養之前將細胞與RNP複合物混合且保持在室溫下持續不同時間段(5分鐘、10分鐘、15分鐘、20分鐘、30分鐘、45分鐘、60分鐘及小於1分鐘)。藉由流式細胞測量術分析細胞的藉由neoE特異性抗原決定基肽多聚體染色經編輯之T細胞百分比及使用細胞計數器之生存力%。培育時間段45分鐘或小於45分鐘之生存力範圍為~20至~100%，而培育60分鐘幾乎為0% (資料未展示)。恰當地經編輯T細胞(detramer+/內源性TCR-)之百分比在所有測試時間點均大於20% (資料未展示)。

實例20：HSC編輯

【0400】 人類HSC (亦稱為HSPC)將編輯以插入neoTCR。HSC編輯之一般工作流程呈現於圖31中。將分離之HSC (CD34+細胞) CD34+細胞培養於預刺激培養基中48小時(X-VIVO + 50 ng/ml SCF，TPO，FL-3L及20 ng/ml的IL-3)。使用描述於下表10中之條件執行核轉染。將電穿孔細胞(亦即，經修飾初代細胞)接種於BBMM培養基(IMDM，20% FBS，35% BSA，IL3 5 ng/ml，IL6 10 ng/ml，SCF：25 ng/ml)；定期更換培養基，且在核轉染後16天採集細胞。在標準電穿孔介導之編輯程序及插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.neo12.TRBOpt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)編碼之Neo12 neoTCR構築體之後編輯T細胞。

| 表10：HSC核轉染條件 |       |       |       |                        |          |
|--------------|-------|-------|-------|------------------------|----------|
| 組別           | 細胞    | 容積    | 程式    | RNP (Cas9/sgRNA, pmol) | DNA (μg) |
| 1            | 0.5E6 | 20 uL | DZ100 | 1.33                   | 2        |
| 2            | 0.5E6 | 20 μL | DZ100 | 1.33                   | 4        |
| 3            | 0.5E6 | 20 μL | DZ100 | 1.33                   | 6        |
| 4            | 0.5E6 | 20 μL | DZ100 | 1.33                   | 0        |
| 5            | 0.5E6 | 20 μL | EK100 | 1.33                   | 2        |

|    |       |       |       |      |   |
|----|-------|-------|-------|------|---|
| 6  | 0.5E6 | 20 µL | EK100 | 1.33 | 4 |
| 7  | 0.5E6 | 20 µL | EK100 | 1.33 | 6 |
| 8  | 0.5E6 | 20 µL | EK100 | 1.33 | 0 |
| 9  | 0.5E6 | 20 µL | FA100 | 1.33 | 2 |
| 10 | 0.5E6 | 20 µL | FA100 | 1.33 | 4 |
| 11 | 0.5E6 | 20 µL | FA100 | 1.33 | 6 |
| 12 | 0.5E6 | 20 µL | FA100 | 1.33 | 0 |
| 13 | 0.5E6 | 20 µL | DZ100 | 0    | 0 |
| 14 | 0.5E6 | 20 µL | N/A   | 0    | 0 |

【0401】 為了評定編輯，萃取gDNA且執行輸入及輸出PCR。如圖32中所示，第5、6、7及10組展現指示適當整合之1Kb擴增PCR帶。因此，HSC在TCR $\alpha$ 基因座處恰當地經編輯。

【0402】 為了進一步評定HSC中之編輯，使用含有MND啟動子驅動ZsGreen及截斷LNGRF編碼序列之4 µg的HR模板如上執行編輯程序，該編碼序列藉由1 kb左側及右側同源臂(「HR臂」)側接且由P2A序列分離，在環狀質粒(pUCu-Kan TRAC(1k)\_MNDZsGreen.f-P2A.LNGFRt.P2A; SEQ ID NO: 15)中經編碼。使用程式EK100在20 µL中使用1.13 pmol之RNP (Cas9/sgRNA)將HSC (0.4x10<sup>6</sup>)電穿孔。如由亮場及螢光顯微鏡評定，甲基纖維素群落在第14天表現ZsGreen (資料未展示)。

實例21：HR臂長度編輯

【0403】 將MART-1 neoTCR整合至TCR $\alpha$ 基因座中。在標準電穿孔介導之編輯程序及插入由環狀HR模板NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.F5.TRBopt.f-P2A.TRAopt.BGHpA編碼之MART-1 neoTCR構築體，該環狀HR模板具有包括300個鹼基對、600個鹼基對、1000個鹼基對(標準)或2000個鹼基對之HR臂長度。

【0404】 藉由流式細胞測量術評定工程改造T細胞的MART-1 neoTCR (MART-1特異性抗原決定基肽多聚體染色)表現及內源性TCR表現之耗損。如表11中所概述，用於產生恰當地經編輯之T細胞

(dextramer+/內源性TCR-)的編輯效率對於所有經測試臂長度而言大於或等於17.6%，且對於所有600個鹼基對或更多的經測試臂長度而言大於20%。

表11：使用不同HR臂長度之編輯效率

|                 | TCR+ Dex- | TCR+ Dex+ | TCR- Dex+ | TCR- Dex- |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 2000 bp HR臂#1   | 3.4       | 1.04      | 26.3      | 69.3      |
| 2000 bp HR臂#2   | 5.81      | 1.18      | 25.5      | 67.5      |
| 1000 bp HR臂(標準) | 1.64      | 0.6       | 22.7      | 75.1      |
| 600 bp HR臂#1    | 3.94      | 0.84      | 20.9      | 74.3      |
| 600 bp HR臂#2    | 2.32      | 0.87      | 21.5      | 75.3      |
| 300 bp HR臂#1    | 1.59      | 0.43      | 17.6      | 80.3      |
| 300 bp HR臂#2    | 1.1       | 0.52      | 20.4      | 78        |

實例22：A151抑制劑提高生存力

【0405】在標準電穿孔介導之編輯程序及插入由環狀HR模板 NTC9385R-TRAC(1k)DTS\_P2A.neo12.TRBOpt.f-P2A.TRA(Va)opt (SEQ ID NO: 13)編碼之Neo12 neoTCR構築體之後編輯T細胞。藉由流式細胞測量術評定工程改造T細胞的Neo12 neoTCR表現。藉由Neo12特異性抗原決定基肽多聚體染色來偵測Neo12 neoTCR之表現。值得重視地，本文所用之Neo12構築體經修飾以使得其不與泛-TCR抗體結合。

【0406】在不同濃度之A151添加預培育的情況下編輯T細胞。如表12中所概述，儘管用於產生恰當地經編輯之T細胞(dextramer+/內源性TCR-)的編輯效率在A151時並未顯著變化，但在添加0.1 μM或10 μM A151的情況下細胞生存力(如藉由細胞數目評定)提高。

【0407】在編輯程序之不同階段添加0.1 μM A151的情況下編輯T細胞。如表13中所概述，儘管用於產生恰當地經編輯之T細胞(dextramer+/內源性TCR-)的編輯效率在A151時並未顯著變化，但在預培育RNP及細胞期間添加A151，以及在預培育及後電穿孔兩者期間添加A151的情況下經

編輯細胞之細胞生存力(如藉由細胞數目評定)提高。

表12：使用不同濃度之A151的編輯效率及生存力

|              | Dex- TCR+ | Dex+ TCR+ | Dex+ TCR- | Dex- TCR- | 經編輯細胞總數目 |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| SC           | 6.71      | 0.67      | 56.2      | 36.4      | 2.55     |
| 0.01 uM A151 | 3.8       | 0.63      | 57        | 38.6      | 2.47     |
| 0.1 uM A151  | 3.48      | 0.81      | 65        | 30.7      | 2.94     |
| 1 uM A151    | 5.41      | 0.88      | 60.2      | 33.5      | 2.53     |
| 10 uM A151   | 10.6      | 0.71      | 54.6      | 34.1      | 2.77     |

TCR = IP26抗體，百分比表示為CD8+細胞之百分比

表13：在A151培育之後不同時間之編輯效率及生存力

|         | Dex- TCR+ | Dex+ TCR+ | Dex+ TCR- | Dex- TCR- | 經編輯細胞總數目 |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| 標準條件    | 2.98      | 0.63      | 42.4      | 54        | 13.45    |
|         | 3.83      | 0.5       | 44.4      | 51.3      | 15.9     |
|         | 7         | 0.59      | 40.6      | 51.8      | 13.04    |
| 預培育     | 1.02      | 0.51      | 46.1      | 524       | 22.8     |
|         | 2.75      | 0.53      | 48.4      | 48.3      | 25.2     |
|         | 1.98      | 0.53      | 50.3      | 47.2      | 23.41    |
| 在EP期間   | 5.84      | 0.37      | 41.9      | 51.9      | 10.65    |
|         | 5.33      | 0.63      | 44.1      | 550       | 11.88    |
|         | 9.4       | 0.4       | 32.8      | 57.4      | 9.16     |
| 後培育     | 2.53      | 0.52      | 45        | 51.9      | 15.18    |
|         | 5.71      | 0.37      | 35.4      | 58.6      | 11.37    |
|         | 6.72      | 0.58      | 39.5      | 53.2      | 12.89    |
| 預培育+後培育 | 4.59      | 0.45      | 36.4      | 58.6      | 18.41    |
|         | 2.36      | 0.5       | 42.1      | 55        | 18.8     |

TCR = IP26抗體，百分比表示為CD8+細胞之百分比

實例23：腫瘤模型中之工程改造T細胞功效

【0408】 針對表現特異性新抗原及HLA分子之人類腫瘤細胞(諸如經轉導而以構成方式表現特異性抗原及HLA之K562)或內源表現特異性新抗原及匹配之HLA的初代人類腫瘤細胞評定TCR工程改造人類T細胞之活體內功效。在8週齡NSG小鼠(Jackson Laboratory)之側腹上皮下接種腫瘤細胞( $1 \times 10^6$ 個或 $3 \times 10^6$ 個)。藉由每週2至3次量測腫瘤尺寸(使用測徑器)來

監測腫瘤生長。藉由使用下式計算腫瘤尺寸： $(\text{長度} \times \text{寬度}^2)/2$ 。當腫瘤尺寸達至 $\sim 100 \text{ mm}^3$ 時，以 $1 \times 10^6$ 或 $5 \times 10^6$ 個TCR工程改造人類T細胞(治療組)或以PBS或假擬T細胞(不用RNP或HR模板電穿孔)對照組給藥小鼠。隨時間推移監測腫瘤生長且在腫瘤尺寸達至 $2000 \text{ mm}^3$ 時將小鼠安樂死。在較早時間點(T細胞投與之後4至7天)處死來自各組之小鼠群。收集血液、脾臟及腫瘤。藉由qPCR及流式細胞測量術評定血液中存在之經編輯人類T細胞。藉由qPCR、流式細胞測量術及藉由免疫組織化學評估腫瘤中存在/浸潤之經編輯人類T細胞。

【0409】結果表明針對人類腫瘤細胞評定TCR工程改造人類T細胞之活體內功效。

#### 實例24：NK編輯

【0410】編輯人類天然殺手細胞(NK細胞),從而將ZsGreen報導子構築體整合至TCR $\alpha$ 基因座中。NK細胞藉由首先收集來自CD4/CD8陽性選擇分離(Miltenyi, CliniMACS)之流過物來分離。使用菲科爾(標準程序)分離單核細胞，且接著使用NK細胞分離套組(Miltenyi)特異性分離NK細胞。在含有NK MACS完全培養基(Miltenyi)、5% hABS (Valley Biomedical)、200 ng/mL IL-2 (Miltenyi)、12.5 ng/mL IL-15 (Miltenyi)及Miltenyi NK活化珠粒(根據製造商之說明書，5 uL珠粒/ $10^6$ 個細胞)之培養物中活化分離之NK細胞( $1 \times 10^6$ 個)。在活化之後第3天，根據概述於下表14中之參數在100  $\mu\text{L}$ 容積中將活化NK細胞( $3 \times 10^6$ 個)電穿孔。含有MND啟動子驅動ZsGreen及截斷LNGRF編碼序列之同源修復模板藉由1 kb左側及右側同源臂(「HR臂」)側接且藉由P2A序列分離，在環狀質粒(pUCu-Kan TRAC(1k)\_MNDZsGreen.f-P2A.LNGFRt.P2A; SEQ ID NO:

15)中經編碼。

【0411】 在第4、7及11天藉由流動式細胞測量術評定各組的GFP表現。如表14中所概述，早在第4天可見ZsGreen表現(第12及13組)。在第11天之前，大於20%的細胞為使用程式EN-138及EK-100之ZsGreen (第11、12、14及15組)。展現第11天(第12組)之ZsGreen表現的代表性曲線圖展示於圖33中。

【0412】 執行對使用輸入輸出PCR技術之整合的分子分析以確認表現構築體至TCR $\alpha$ 基因座中之精確基因組整合。除了使用來自經編輯T細胞之gRNA的陽性對照及其對應的反向引子(SEQ ID NO: 2)以外，PCR使用用於先前TCR整合分析中之上游正向引子(SEQ ID NO: 1)，同時將對MND插入具有特異性之上游反向引子用作反向引子(AGGGTCATTTCAGGTCCTT，SEQ ID NO: 23)。如表14中所概述及圖34中所展示，第11至18組展現指示適當整合之1Kb擴增PCR帶。因此，NK細胞在TCR $\alpha$ 基因座處恰當地經編輯。值得注意的是，PCR帶強度與表現ZsGreen之細胞百分比相關，亦即，具有最高ZsGreen百分比之樣本產生最亮PCR帶。

表14：NK細胞編輯之概述

| 組別 | 程式     | RNP<br>(Cas9/sgRNA,<br>pmol/反應) | DNA (ug/反<br>應) | D4流 分 析%<br>ZsGreen+ | D7流 分 析%<br>ZsGreen+ | D11流 分 析%<br>ZsGreen+ | 分子分析：PCR帶強度<br>(D11) |
|----|--------|---------------------------------|-----------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| 11 | EN-138 | 100/600                         | 75              | 細胞不足                 | 18.4                 | 24.5                  | +++                  |
| 12 | EN-138 | 165/1000                        | 75              | 28.3                 | 32.8                 | 34.3                  | ++++                 |
| 13 | EN-138 | 165/1000                        | 150             | 11.8                 | NP                   | NP                    | +                    |
| 14 | EK-100 | 100/600                         | 75              | 細胞不足                 | NP                   | 45.2                  | +++                  |
| 15 | EK-100 | 165/1000                        | 75              | 細胞不足                 | NP                   | 22.7                  | ++                   |
| 16 | EK-100 | 165/1000                        | 150             | 細胞不足                 | NP                   | NP                    | +                    |
| 17 | FA-100 | 100/600                         | 75              | 細胞不足                 | NP                   | NP                    | ++                   |
| 18 | FA-100 | 165/1000                        | 75              | 0                    | NP                   | 6.14                  | ++                   |
| 19 | FA-100 | 165/1000                        | 150             | 細胞不足                 | NP                   | NP                    | -                    |
| 20 | FA-100 | no RNPs                         | 150             | 細胞不足                 | 0                    | 細胞不足                  | NP                   |
|    |        |                                 |                 |                      |                      |                       |                      |

NP =未執行；對於所有組n = 1

**實例X：預示性初代編輯**

【0413】 在上文所描述之程序之後編輯初代細胞。包括但不限制於更改電穿孔條件及試劑之程序視待編輯之確切初代細胞而定進行調節。初代細胞包括幹細胞、人類幹細胞、胚胎幹細胞及免疫細胞。免疫細胞之實例包括但不限於B細胞、T細胞、單核球、巨噬細胞、樹突狀細胞及天然殺手細胞。

**額外實施例及引用之併入內容**

【0414】 儘管本發明已參考較佳實施例及各種替代實施例加以特定顯示且描述，但應理解，在不背離本發明之精神及範疇之情況下，熟習相關技術者可在其中作出形式及細節的各種變更。

【0415】 出於所有目的，在本說明書之正文內引用之所有參考文獻、頒佈專利及專利申請案以引用之方式全文併入本文中。



201934754

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

初代細胞基因編輯

### 【英文發明名稱】

PRIMARY CELL GENE EDITING

### 【中文】

本發明提供在不使用經病毒介導的傳遞之情況下初代細胞的經核酸酶介導之基因編輯之方法及組合物。亦提供使用經編輯初代細胞治療之方法。

### 【英文】

Methods and compositions are provided for nuclease-mediated gene editing of primary cells without the use of viral mediated delivery. Methods of treatments using edited primary cells are also provided.

### 【指定代表圖】

圖1

### 【代表圖之符號簡單說明】

無

## 【發明申請專利範圍】

### 【第1項】

一種經修飾細胞，該經修飾細胞包含：

環形聚核苷酸，其包含外源性核苷酸序列，該外源性核苷酸序列包含：

a)編碼基因的至少一部分之核苷酸序列；

b)與內源性基因組標靶基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；

及

c)與該內源性基因組標靶基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，

與該內源性基因組標靶基因座中之該第一及該第二區域一致的該等核苷酸序列之取向可以便於該內源性基因組標靶基因座處之同源重組，且

其中該經修飾細胞實質上不含經病毒介導之傳遞組分。

### 【第2項】

一種包含T細胞之經修飾細胞，該T細胞包含：

a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；

b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；

c)編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列；

d)編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列；

其中編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之該核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列之該核苷酸序列及編碼該第一及該第二連接子多肽序列的該等核苷酸序列整合至內源性TCR- $\alpha$ 基因座中，

編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之該核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列之該核苷酸序列及編碼該第一及該第二連接子多肽序列的該等核苷酸序列之取向可以使得該等多肽序列中之各者能夠表現為單一多肽，其中該第二連接子多肽序列定位於該TCR- $\alpha$ 多肽序列與該TCR- $\beta$ 多肽序列之間，

該第一及該第二連接子多肽為可裂解連接子多肽，該等可裂解連接子多肽能夠在該T細胞中裂解以使得該TCR- $\alpha$ 多肽序列及該TCR- $\beta$ 多肽序列各自形成分開的多肽，其中該等分開的多肽能夠締合在一起以形成功能性TCR，

其中該經修飾細胞實質上不含經病毒介導之傳遞組分，並且其中內源性TCR- $\beta$ 基因座已瓦解。

### 【第3項】

如請求項1之經修飾細胞，其中該經修飾細胞進一步包含整合式核苷酸序列，其中該整合式核苷酸序列包含與編碼該基因之至少一部分的核苷酸序列一致之序列，該整合式核苷酸序列整合於該內源性基因組標靶基因座處，且該整合式核苷酸序列之取向可以使得能夠表現該基因的該至少一部分。

### 【第4項】

如請求項1至3中任一項之經修飾細胞，其中該經修飾細胞進一步包含核酸酶組合物，該核酸酶組合物能夠裂解該內源性基因組標靶基因座內限定核苷酸序列。

### 【第5項】

一種包含T細胞之經修飾細胞，該T細胞包含：

a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；

- b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；
- c)編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列；
- d)編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列；

其中編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之該核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列之該核苷酸序列及編碼該第一及該第二連接子多肽序列的該等核苷酸序列整合至內源性TCR基因座中，

編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之該核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列之該核苷酸序列及編碼該第一及該第二連接子多肽序列的該等核苷酸序列之取向可以使得該等多肽序列中之各者能夠表現為單一多肽，其中該第二連接子多肽序列定位於該TCR- $\alpha$ 多肽序列與該TCR- $\beta$ 多肽序列之間，且

該第一及該第二連接子多肽為可裂解連接子多肽，該等可裂解連接子多肽能夠在該T細胞中裂解，以使得該TCR- $\alpha$ 多肽序列及該TCR- $\beta$ 多肽序列各自形成分開的多肽，其中該等分開的多肽能夠締合在一起以形成功能性TCR。

#### 【第6項】

如請求項5之經修飾細胞，其中該經修飾細胞進一步包含環形聚核苷酸，該環形聚核苷酸包含外源性核苷酸序列，該外源性核苷酸序列包含：

a)編碼以下的核苷酸序列：編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之該核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列之該核苷酸序列及編碼該第一及該第二連接子多肽序列的該等核苷酸序列；

b)與該內源性TCR基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；及

c)與該內源性TCR基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，且

與該內源性TCR基因座中之該第一及該第二區域一致的該等核苷酸

序列之取向可以便於該內源性TCR基因座處之同源重組。

**【第7項】**

如請求項5或6之經修飾細胞，其中該經修飾細胞實質上不含經病毒介導之傳遞組分。

**【第8項】**

如請求項5至7中任一項之經修飾細胞，其中該經修飾細胞進一步包含核酸酶組合物，該核酸酶組合物能夠裂解該內源性TCR基因座內限定核苷酸序列。

**【第9項】**

如請求項1至8中任一項之經修飾細胞，其中該經修飾細胞進一步包含突變，該突變產生由第二限定核苷酸序列編碼之非功能性基因。

**【第10項】**

如請求項9之經修飾細胞，其中產生該非功能性基因之該突變包含選自由以下各者組成之群的基因中之編碼區域中的突變：造成所轉譯蛋白質讀框變化之讀框轉移突變、導致胺基酸被終止密碼子取代之無意義突變，及造成一個胺基酸被另一胺基酸取代的誤義突變。

**【第11項】**

如請求項9之經修飾細胞，其中產生該非功能性基因之該突變包含選自由以下各者組成之群的該基因中之非編碼區域中的突變：改變由該基因編碼之mRNA產物之表現的突變及改變由該基因編碼之mRNA產物之穩定性的突變。

**【第12項】**

如請求項9至11中任一項之經修飾細胞，其中該經修飾細胞進一步包

含第二核酸酶組合物，該第二核酸酶組合物能夠裂解該經修飾細胞內之該第二限定核苷酸序列。

**【第13項】**

如請求項4或請求項8至12中任一項之經修飾細胞，其中該核酸酶組合物包含選自由以下各者組成之群的核酸酶：成簇規律間隔短回文重複序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat，CRISPR)家族核酸酶或其衍生物、類轉錄活化因子效應子核酸酶(Transcription activator-like effector nuclease，TALEN)或其衍生物、鋅指核酸酶(zinc-finger nuclease，ZFN)或其衍生物，及歸巢核酸內切酶(homing endonuclease，HE)或其衍生物。

**【第14項】**

如請求項13之經修飾細胞，其中該CRISPR家族核酸酶為Cas9核酸酶。

**【第15項】**

如請求項4或請求項8至14中任一項之經修飾細胞，其中該核酸酶組合物包含預成型蛋白質複合物。

**【第16項】**

如請求項4或請求項8至14中任一項之經修飾細胞，其中該核酸酶組合物包含核苷酸載體，該核苷酸載體能夠在該經修飾細胞內表現該核酸酶。

**【第17項】**

如請求項4或請求項8至16中任一項之經修飾細胞，其中該核酸酶組合物包含CRISPR RNA (crRNA)及反式活化CRISPR RNA (tracrRNA)。

**【第18項】**

如請求項17之經修飾細胞，其中該crRNA包含前導RNA (gRNA)，其中該gRNA與該限定核苷酸序列互補。

**【第19項】**

如請求項18之經修飾細胞，其中該crRNA及該tracrRNA在單一聚核苷酸上。

**【第20項】**

如請求項18之經修飾細胞，其中該crRNA及該tracrRNA在分開的聚核苷酸上。

**【第21項】**

如請求項1至20中任一項之經修飾細胞，其中藉由該內源性基因組標靶基因座或內源性TCR基因座內之內源性啟動子主導編碼基因的至少一部分之核苷酸序列或該等經編碼多肽序列的表現。

**【第22項】**

如請求項1至20中任一項之經修飾細胞，其中藉由外源性啟動子主導編碼基因的至少一部分之核苷酸序列或該等經編碼多肽序列的表現。

**【第23項】**

如請求項22之經修飾細胞，其中該外源性啟動子選自由以下各者組成之群：哺乳動物啟動子、人類啟動子、病毒啟動子、來自逆轉錄病毒或慢病毒的長末端重複序列(long-terminal repeat, LTR)衍生啟動子、兩種啟動子的融合物、啟動子之兩個部分之融合物、MMLV LTR啟動子、HIV LTR啟動子、MCMV LTR啟動子、EF1a、MND、CMV、SV40、PGK1、Ubc、 $\beta$ -肌動蛋白、CAG、小分子誘導性啟動子、四環素誘導性

啟動子、小分子條件性啟動子、Cre-LoxP條件性啟動子系統、Flp-FRT條件性啟動子系統及他莫昔芬(tamoxifen)條件性啟動子系統。

**【第24項】**

如請求項1至23中任一項之經修飾細胞，其中編碼該基因的該至少一部分之該核苷酸序列、編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之該核苷酸序列或編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列的該核苷酸序列之長度大於或等於100個鹼基。

**【第25項】**

如請求項1至23中任一項之經修飾細胞，其中編碼該基因的至少一部分之核苷酸序列、編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列或編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列的核苷酸序列之長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於400個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於800個鹼基、長度大於或等於1500個鹼基、長度大於或等於2000個鹼基或長度大於或等於4000個鹼基。

**【第26項】**

如請求項1至25中任一項之經修飾細胞，其中與該內源性基因組標靶基因座或該內源性TCR基因座中之該第一區域一致的該等核苷酸序列之長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於100個鹼基、長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於300個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基或長度大於或等於2000個鹼基。

**【第27項】**

如請求項1至26中任一項之經修飾細胞，其中與該內源性基因組標靶基因座或該內源性TCR基因座中之該第二區域一致的該等核苷酸序列之長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於100個鹼基、長度大於或等於

200個鹼基、長度大於或等於300個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基或長度大於或等於2000個鹼基。

**【第28項】**

如請求項1至25中任一項之經修飾細胞，其中與該內源性基因組標靶基因座或該內源性TCR基因座中之該第一區域一致的該等核苷酸序列及與該內源性基因組標靶基因座或該內源性TCR基因座中之該第二區域一致的該等核苷酸序列之長度分別大於或等於600個鹼基。

**【第29項】**

如請求項4或請求項8至28中任一項之經修飾細胞，其中該限定核苷酸序列在該等核苷酸序列之整合之後瓦解。

**【第30項】**

如請求項1至29中任一項之經修飾細胞，其中以操作方式與該內源性基因組標靶基因座或該內源性TCR基因座相聯之內源性基因之表現已瓦解。

**【第31項】**

如請求項1至30中任一項之經修飾細胞，其進一步包含能夠提高同源重組率之額外試劑。

**【第32項】**

如請求項31之經修飾細胞，其中能夠提高同源重組率之該等額外試劑包含同源重組修復路徑之活化因子、非同源末端連接(non-homologous end joining, NHEJ)修復路徑的抑制劑或其組合。

**【第33項】**

如請求項1至32中任一項之經修飾細胞，其進一步包含能夠提高該經

修飾細胞之生存力的額外試劑。

**【第34項】**

如請求項33之經修飾細胞，其中能夠提高該經修飾細胞之生存力的額外試劑包含核酸感測路徑之抑制劑。

**【第35項】**

如請求項34之經修飾細胞，其中該等核酸感測路徑包含選自以下之群：TLR9核酸感測路徑、AIM2核酸感測路徑、IFI16核酸感測路徑、cGAS核酸感測路徑及胞溶質核酸感測路徑。

**【第36項】**

如請求項34之經修飾細胞，其中核酸感測路徑之該等抑制劑包含寡核苷酸拮抗劑。

**【第37項】**

如請求項36之經修飾細胞，其中該寡核苷酸拮抗劑包含序列TTAGGG或其串聯重複序列。

**【第38項】**

如請求項1至4中任一項或請求項6至33中任一項之經修飾細胞，其中該環形聚核苷酸包含質體或奈米質體。

**【第39項】**

如請求項38之經修飾細胞，其中該質體具有小於500個鹼基之載體主鏈，並且其中該載體主鏈為核苷酸序列，該核苷酸序列並非編碼該基因的至少一部分之核苷酸序列，並非編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列，並非編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列的核苷酸序列，並非編碼該第一及該第二連接子多肽之核苷酸序列，並非與該第一內源性標靶基因組基因座或內源性TCR

基因座一致的核苷酸序列，且並非與該第二內源性標靶基因組基因座或內源性TCR基因座一致之核苷酸序列。

**【第40項】**

如請求項1至4中任一項或請求項6至39中任一項之經修飾細胞，其中該環形聚核苷酸並非經聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)擴增之聚核苷酸。

**【第41項】**

如請求項1至40中任一項之經修飾細胞，其中該內源性基因組標靶基因座或該內源性TCR基因座包含編碼區域。

**【第42項】**

如請求項1至40中任一項之經修飾細胞，其中該內源性基因組標靶基因座或該內源性TCR基因座包含內含子。

**【第43項】**

如請求項1至42中任一項之經修飾細胞，其中該內源性基因組標靶基因座或該內源性TCR基因座包含T細胞受體(T cell receptor, TCR)- $\alpha$ 基因座。

**【第44項】**

如請求項43之經修飾細胞，其中由該第二限定核苷酸序列編碼之該非功能性基因為已瓦解之TCR- $\beta$ 基因。

**【第45項】**

如請求項1至42中任一項之經修飾細胞，其中該內源性基因組標靶基因座或該內源性TCR基因座包含該TCR- $\beta$ 基因座。

**【第46項】**

如請求項45之經修飾細胞，其中由該第二限定核苷酸序列編碼之該非功能性基因為已瓦解之TCR- $\alpha$ 基因。

**【第47項】**

如請求項1至4中任一項或請求項9至42中任一項之經修飾細胞，其中該內源性基因組標靶包含免疫檢查點基因座。

**【第48項】**

如請求項47之經修飾細胞，其中該免疫檢查點基因座選自由以下各者組成之群：PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM3、LAG3及VISTA。

**【第49項】**

如請求項1至4中任一項或請求項9至48中任一項之經修飾細胞，其中該基因的至少一部分包含連接子序列。

**【第50項】**

如請求項49之經修飾細胞，其中該連接子序列編碼可裂解連接子多肽序列，其中在表現之後，該可裂解連接子多肽裂解，因而產生僅經該基因的該至少一部分編碼之多肽。

**【第51項】**

如請求項50之經修飾細胞，其中該等可裂解連接子多肽中之任一者包含弗林(furin)裂解位點。

**【第52項】**

如請求項5至51中任一項之經修飾細胞，其中該等連接子序列中之任一者包含選自由以下各者組成之群的2A核糖體跳躍元素：T2A、E2A、P2A及F2A。

**【第53項】**

如請求項5至52中任一項之經修飾細胞，其中該等可裂解連接子多肽中之任一者包含Gly-Ser-Gly連接子，視情況其中該Gly-Ser-Gly連接子為2A核糖體跳躍元素之N端，且視情況其中該Gly-Ser-Gly連接子自N端至C端之方向為弗林裂解位點：Gly-Ser-Gly連接子：2A核糖體跳躍元素。

**【第54項】**

如請求項49之經修飾細胞，其中該連接子序列、編碼該第一連接子多肽序列之該等核苷酸序列或編碼該第二連接子多肽序列的該等核苷酸序列包含內部核糖體入口位點(internal ribosome entry site, IRES)。

**【第55項】**

如請求項49之經修飾細胞，其中該連接子序列、編碼該第一連接子多肽序列之該等核苷酸序列或編碼該第二連接子多肽序列的該等核苷酸序列包含外源性啟動子。

**【第56項】**

如請求項5至55中任一項之經修飾細胞，其中該連接子序列、編碼該第一連接子多肽序列之該等核苷酸序列或編碼該第二連接子多肽序列的該等核苷酸序列包含剪接受體序列。

**【第57項】**

如請求項5至56中任一項之經修飾細胞，其中該基因的至少一部分、編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列或編碼該TCR基因的至少一部分之核苷酸序列包含編碼訊息肽之核苷酸序列，其中該訊息肽以操作方式連接至由該基因的至少一部分編碼之多肽、該TCR- $\alpha$ 多肽序列、該TCR- $\beta$ 多肽序列或由該TCR基因的至少一部分編碼之多肽。

**【第58項】**

如請求項57之經修飾細胞，其中該訊息肽為外源性訊息肽，視情況其中該外源性訊息肽為人類生長激素訊息肽。

**【第59項】**

如請求項5至58中任一項之經修飾細胞，其中該第一連接子多肽序列及該第二連接子多肽序列包含相同連接子多肽序列。

**【第60項】**

如請求項59之經修飾細胞，其中編碼相同連接子多肽序列之編碼該第一連接子多肽序列的核苷酸序列及編碼該第二連接子多肽序列之核苷酸序列包含密碼子編碼分歧核苷酸序列，並且其中編碼該第一連接子多肽序列之核苷酸序列及編碼該第二連接子多肽的核苷酸序列具有彼此相對編碼分歧之密碼子。

**【第61項】**

如請求項1至4中任一項或請求項9至56中任一項之經修飾細胞，其中該基因的至少一部分編碼編碼區域。

**【第62項】**

如請求項61之經修飾細胞，其中該編碼區域選自由以下各者組成之群：調節免疫系統之因子、細胞介素、調節T細胞功能的因子、提高T細胞存活之因子、增強T細胞功能之因子，及免疫檢查點抑制劑。

**【第63項】**

如請求項1至4中任一項或請求項9至56中任一項之經修飾細胞，其中該基因的至少一部分編碼非編碼區域。

**【第64項】**

如請求項63之經修飾細胞，其中該非編碼區域選自由以下各者組成之群：shRNA、siRNA、miRNA、調節免疫系統之因子、細胞介素、調節T細胞功能的因子、提高T細胞存活之因子，及增強T細胞功能的因子。

**【第65項】**

如請求項1至4中任一項或請求項9至56中任一項之經修飾細胞，其中該基因的至少一部分包含TCR基因之至少一部分。

**【第66項】**

如請求項65之經修飾細胞，其中該TCR基因的至少一部分包含：

- a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；
- b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；及
- c)編碼第二連接子序列之核苷酸序列。

**【第67項】**

如請求項5至66中任一項之經修飾細胞，其中編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列或該TCR基因的至少一部分選自由以下各者組成之群的至少一部分：鼠化TCR、人類化TCR、結構域調換TCR、點突變之TCR、使用能夠形成二硫鍵聯的經工程改造半胱氨酸之經工程改造TCR、優化人體內表現之密碼子優化TCR、優化密碼子使用度及移除RNA不穩定性元素之序列優化TCR、該TCR基因的可變區域序列、嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor, CAR)及單鏈TCR。

**【第68項】**

如請求項5至67中任一項之經修飾細胞，其中該TCR- $\alpha$ 多肽序列、該TCR- $\beta$ 多肽序列或由該TCR基因的至少一部分編碼之多肽係經工程改造，可以相對於內源性TCR多肽序列，展現與第二外源性TCR多肽序列的更大

相聯性，視情況其中該TCR- $\alpha$ 多肽序列及該TCR- $\beta$ 多肽序列經工程改造，可以相對於內源性TCR多肽序列，展現彼此有更大相聯性。

**【第69項】**

如請求項5至68中任一項之經修飾細胞，其中該等經編碼多肽序列自N端至C端之方向為連接子：TCR- $\alpha$ ：第二連接子：TCR- $\beta$ 。

**【第70項】**

如請求項5至68中任一項之經修飾細胞，其中該等經編碼多肽序列自N端至C端之方向為連接子：TCR- $\beta$ ：第二連接子：TCR- $\alpha$ 。

**【第71項】**

如請求項1至70中任一項之經修飾細胞，其中該基因之至少一部分編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列的核苷酸序列或編碼該TCR基因之至少一部分之核苷酸序列包含密碼子編碼分歧核苷酸序列，並且其中該密碼子編碼分歧核苷酸序列具有相對於內源性核苷酸序列編碼分歧之密碼子。

**【第72項】**

如請求項1至71中任一項之經修飾細胞，其中該經修飾細胞包含免疫細胞。

**【第73項】**

如請求項72之經修飾細胞，其中該免疫細胞包含T細胞。

**【第74項】**

如請求項73之經修飾細胞，其中該T細胞選自由以下各者組成之群：細胞毒素T淋巴球(cytotoxic T lymphocyte, CTL)、CD8<sup>+</sup> T細胞、CD4<sup>+</sup> T細胞、初代T細胞、腫瘤浸潤性T細胞、工程改造T細胞、調節T細胞

(Treg)、輔助T細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞、 $\alpha$ - $\beta$  T細胞及 $\gamma$ - $\delta$  T細胞。

**【第75項】**

如請求項72之經修飾細胞，其中該免疫細胞包含天然殺手細胞。

**【第76項】**

如請求項72之經修飾細胞，其中該免疫細胞選自由以下各者組成之群：B細胞、單核球、巨噬細胞、樹突狀細胞及天然殺手T細胞。

**【第77項】**

如請求項1至71中任一項之經修飾細胞，其中該經修飾細胞包含幹細胞。

**【第78項】**

如請求項78之經修飾細胞，其中該幹細胞包含造血幹細胞。

**【第79項】**

如請求項78之經修飾細胞，其中該幹細胞包含胚胎幹細胞。

**【第80項】**

如請求項1至79中任一項之經修飾細胞，其中該經修飾細胞為初代細胞。

**【第81項】**

如請求項1至81中任一項之經修飾細胞，其中該經修飾細胞為經分離細胞，其中該經分離細胞自個體分離。

**【第82項】**

如請求項81之經修飾細胞，其中該個體已知或疑似患有癌症。

**【第83項】**

如請求項1至82中任一項之經修飾細胞，其中該經修飾細胞包含人類細胞或源自人類之細胞。

**【第84項】**

如請求項1至83中任一項之經修飾細胞，其中該經修飾細胞為經活體外培養細胞。

**【第85項】**

如請求項84之經修飾細胞，其中該經活體外培養細胞包含受刺激細胞。

**【第86項】**

如請求項85之經修飾細胞，其中該受刺激細胞包含受細胞介素刺激T細胞，視情況其中該受細胞介素刺激T細胞包含受CD3刺激T細胞、受CD28刺激T細胞或受CD3及CD28刺激T細胞。

**【第87項】**

如請求項86之經修飾細胞，其中在IL7、IL15或其組合存在下培養該受細胞介素刺激T細胞。

**【第88項】**

如請求項86或87之經修飾細胞，其中在IL2存在下培養該受細胞介素刺激T細胞。

**【第89項】**

如請求項86或87之經修飾細胞，其中在實質上不含IL2之培養基中培養該受細胞介素刺激T細胞。

**【第90項】**

如請求項1至89中任一項之經修飾細胞，其中該經修飾細胞不含整合

式病毒，其中該整合式病毒以操作方式與該經病毒介導之傳遞組分相聯。

**【第91項】**

如請求項1至89中任一項之經修飾細胞，其中該經修飾細胞之表面上之I類MHC不含源自經病毒介導之傳遞組分或整合式病毒的肽，其中該整合式病毒以操作方式與該等經病毒介導之傳遞組分相聯。

**【第92項】**

如請求項1至89中任一項之經修飾細胞，其中該經修飾細胞進一步包含第二環形聚核苷酸，該第二環形聚核苷酸包含第二外源性核苷酸組合物，該第二外源性核苷酸組合物包含：

a)編碼第二基因的至少一部分之核苷酸序列；

b)與第二內源性基因組標靶基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；及

c)與該第二內源性基因組標靶基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，及

與該第二內源性基因組標靶基因座中之該第一及該第二區域一致的該等核苷酸序列之取向可以便於該第二內源性基因組標靶基因座處之同源重組。

**【第93項】**

如請求項92之經修飾細胞，其中該經修飾細胞進一步包含第二整合式核苷酸序列，其中該第二整合式核苷酸序列包含與編碼該第二基因之至少該部分的核苷酸序列一致之序列，該第二整合式核苷酸序列整合於該第二內源性基因組標靶基因座處，且該第二整合式核苷酸序列之取向可以使得能夠表現該第二基因的該至少一部分。

【第94項】

一種包含如請求項3至93之經修飾細胞中之任一者的細胞群，其中該群中之大於10%、大於20%、大於30%、大於40%、大於50%、大於60%或大於70%包含該整合式核苷酸序列。

【第95項】

如請求項94之細胞群，其中該等經修飾細胞在該整合式核苷酸序列的整合之後尚未進行分類、選拔或分離。

【第96項】

一種細胞群，其包含：

整合式核苷酸序列，

其中該整合式核苷酸序列包含基因的至少一部分，該整合式核苷酸序列整合於內源性基因組標靶基因座處，且該整合式核苷酸序列之取向可以使得能夠表現該基因的該至少一部分，

其中該細胞群實質上不含經病毒介導之傳遞組分，且

其中該群中的大於10%、大於20%、大於30%、大於40%、大於50%、大於60%或大於70%之該等T細胞包含該整合式核苷酸序列。

【第97項】

如請求項96之細胞群，其中該等T細胞在該整合式核苷酸序列的整合之後尚未進行分類、選拔或分離。

【第98項】

如請求項96或97之細胞群，其中該細胞群進一步包含能夠裂解該內源性TCR基因座內限定核苷酸序列的核酸酶組合物。

【第99項】

如請求項96至98中任一項之細胞群，其中該細胞群進一步包含環形聚核苷酸，該環形聚核苷酸包含外源性核苷酸序列，該外源性核苷酸序列包含：

- a)編碼基因的該至少一部分之核苷酸序列；
- b)與該內源性基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；及
- c)與該內源性基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，且

與該內源性基因座中之該第一及該第二區域一致的該等核苷酸序列之取向可以便於該內源性基因座處之同源重組。

#### 【第100項】

如請求項96至99中任一項之細胞群，其中該細胞群為至少 $1 \times 10^6$ 個T細胞、至少 $2 \times 10^6$ 個T細胞、至少 $5 \times 10^6$ 個T細胞、至少 $1 \times 10^7$ 個T細胞或至少 $5 \times 10^7$ 個T細胞。

#### 【第101項】

如請求項96至100中任一項之細胞群，其中該細胞群進一步包含產生由第二限定核苷酸序列編碼之非功能性基因的突變。

#### 【第102項】

如請求項101之細胞群，其中產生該非功能性基因的該突變包含選自由以下各者組成之群的該基因之編碼區域中的突變：造成所轉譯蛋白質讀框變化之讀框轉移突變、導致胺基酸被終止密碼子取代之無意義突變，及造成一個胺基酸被另一胺基酸取代的誤義突變。

#### 【第103項】

如請求項101之細胞群，其中產生該非功能性基因之該突變包含選自由以下各者組成之群的該基因之非編碼區域中的突變：改變由該基因編碼

之mRNA產物之表現的突變及改變由該基因編碼之mRNA產物之穩定性的突變。

**【第104項】**

如請求項101至103中任一項之細胞群，其中該細胞群進一步包含能夠裂解該細胞群內之該第二限定核苷酸序列的第二核酸酶組合物。

**【第105項】**

如請求項98至104中任一項之細胞群，其中該核酸酶組合物包含選自由以下各者組成之群的核酸酶：成簇規律間隔短回文重複序列(CRISPR)家族核酸酶、類轉錄活化因子效應子核酸酶(TALEN)或其衍生物、鋅指核酸酶(ZFN)或其衍生物，及歸巢核酸內切酶(HE)或其衍生物。

**【第106項】**

如請求項105之細胞群，其中該CRISPR家族核酸酶為Cas9核酸酶。

**【第107項】**

如請求項98至106中任一項之細胞群，其中該核酸酶組合物包含預成型蛋白質複合物。

**【第108項】**

如請求項98至106中任一項之細胞群，其中該核酸酶組合物包含能夠在該細胞群內表現該核酸酶之核苷酸載體。

**【第109項】**

如請求項98至108中任一項之細胞群，其中該核酸酶組合物包含主導在該限定核苷酸序列處之經核酸酶介導裂解之前導RNA。

**【第110項】**

如請求項109之細胞群，其中該前導RNA包含CRISPR RNA

(crRNA)及反式活化CRISPR RNA (tracrRNA)。

【第111項】

如請求項110之細胞群，其中該crRNA及該tracrRNA在單一聚核苷酸上。

【第112項】

如請求項110之細胞群，其中該crRNA及該tracrRNA在分開的聚核苷酸上。

【第113項】

如請求項96至112中任一項之細胞群，其中藉由該內源性基因組標靶基因座內之內源性啟動子主導該等經編碼多肽序列的表現。

【第114項】

如請求項96至112中任一項之細胞群，其中藉由外源性啟動子主導該等經編碼多肽序列之表現。

【第115項】

如請求項114之細胞群，其中該外源性啟動子選自由以下各者組成之群：哺乳動物啟動子、人類啟動子、病毒啟動子、來自逆轉錄病毒或慢病毒的長末端重複序列(LTR)衍生啟動子、兩種啟動子的融合物、啟動子之兩個部分之融合物、MMLV LTR啟動子、HIV LTR啟動子、MCMV LTR啟動子、EF1a、MND、CMV、SV40、PGK1、Ubc、 $\beta$ -肌動蛋白、CAG、小分子誘導性啟動子、四環素誘導性啟動子、小分子條件性啟動子、Cre-LoxP條件性啟動子系統、Flp-FRT條件性啟動子系統及他莫昔芬條件性啟動子系統。

【第116項】

如請求項96至115中任一項之細胞群，其中編碼該基因的該至少一部分之核苷酸序列之長度大於或等於100個鹼基。

**【第117項】**

如請求項96至115中任一項之細胞群，其中編碼該基因的該至少一部分之核苷酸序列之長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於400個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於800個鹼基、長度大於或等於1500個鹼基、長度大於或等於2000個鹼基或長度大於或等於4000個鹼基。

**【第118項】**

如請求項99至117中任一項之細胞群，其中與該內源性基因組標靶基因座中之該第一區域一致的該等核苷酸序列之長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於100個鹼基、長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於300個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基或長度大於或等於2000個鹼基。

**【第119項】**

如請求項99至118中任一項之細胞群，其中與該內源性基因組標靶基因座中之該第二區域一致的該等核苷酸序列之長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於100個鹼基、長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於300個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基或長度大於或等於2000個鹼基。

**【第120項】**

如請求項99至119中任一項之細胞群，其中與該內源性基因組標靶基因座中之該第一區域一致的該等核苷酸序列及與該內源性基因組標靶基因

座中之該第二區域一致的該等核苷酸序列之長度分別大於或等於600個鹼基。

**【第121項】**

如請求項98至120中任一項之細胞群，其中該限定核苷酸序列在該等核苷酸序列的整合之後瓦解。

**【第122項】**

如請求項96至121中任一項之細胞群，其中以操作方式與該內源性基因組標靶基因座或該內源性TCR基因座相聯的內源性基因之表現已瓦解。

**【第123項】**

如請求項96至122中任一項之細胞群，其進一步包含能夠提高同源重組率之額外試劑。

**【第124項】**

如請求項96至123中任一項之細胞群，其進一步包含能夠提高該細胞群之生存力的額外試劑。

**【第125項】**

如請求項99至124中任一項之細胞群，其中該環形聚核苷酸包含質體或奈米質體。

**【第126項】**

如請求項125之細胞群，其中該質體具有小於500個鹼基之載體主鏈，並且其中該載體主鏈為核苷酸序列，該核苷酸序列並非編碼該基因的該至少一部分之核苷酸序列，並非編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列，並非編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列的核苷酸序列，並非編碼該第一及該第二連接子多肽之核苷酸序列，並非與該第一內源性標靶基因組基因座或內源性

TCR基因座一致的核苷酸序列，且並非與該第二內源性標靶基因組基因座或內源性TCR基因座一致之核苷酸序列。

**【第127項】**

如請求項99至126中任一項之細胞群，其中該環形聚核苷酸並非經聚合酶鏈反應(PCR)擴增之聚核苷酸。

**【第128項】**

如請求項96至127中任一項之細胞群，其中該內源性基因組標靶基因座包含編碼區域。

**【第129項】**

如請求項96至127中任一項之細胞群，其中該內源性基因組標靶基因座包含內含子。

**【第130項】**

如請求項96至129中任一項之細胞群，其中該內源性基因組標靶基因座包含該T細胞受體(TCR)- $\alpha$ 基因座。

**【第131項】**

如請求項130之細胞群，其中由該第二限定核苷酸序列編碼之非功能性基因為已瓦解之TCR- $\beta$ 基因。

**【第132項】**

如請求項96至129中任一項之細胞群，其中該內源性基因組標靶基因座包含該TCR- $\beta$ 基因座。

**【第133項】**

如請求項132之細胞群，其中由該第二限定核苷酸序列編碼之非功能性基因為已瓦解之TCR- $\alpha$ 基因。

**【第134項】**

如請求項96至129中任一項之細胞群，其中該內源性基因組標靶包含免疫檢查點基因座。

**【第135項】**

如請求項134之細胞群，其中該免疫檢查點基因座選自由以下各者組成之群：PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM3、LAG3及VISTA。

**【第136項】**

如請求項96至135中任一項之細胞群，其中該基因的該至少一部分包含連接子序列。

**【第137項】**

如請求項136之細胞群，其中該連接子序列編碼可裂解連接子多肽序列，其中在表現之後，該可裂解連接子多肽裂解，因而產生僅經該基因的該至少一部分編碼之多肽。

**【第138項】**

如請求項137之細胞群，其中該可裂解連接子多肽包含選自由以下各者組成之群的2A核糖體跳躍元素：T2A、E2A、P2A及F2A。

**【第139項】**

如請求項137至138中任一項之細胞群，其中該等可裂解連接子多肽包含弗林裂解位點。

**【第140項】**

如請求項137至139中任一項之細胞群，其中該等可裂解連接子多肽包含Gly-Ser-Gly連接子，視情況其中該Gly-Ser-Gly連接子為2A核糖體跳躍元素之N端，且視情況其中該Gly-Ser-Gly連接子自N端至C端之方向為

弗林裂解位點：Gly-Ser-Gly連接子：2A核糖體跳躍元素。

**【第141項】**

如請求項136之細胞群，其中該連接子序列包含內部核糖體入口位點(IRES)。

**【第142項】**

如請求項136之細胞群，其中該連接子序列包含外源性啟動子序列。

**【第143項】**

如請求項136至142中任一項之細胞群，其中該連接子序列包含剪接受體序列。

**【第144項】**

如請求項96至135中任一項之細胞群，其中該基因的該至少一部分包含第一連接子多肽序列及第二連接子多肽序列。

**【第145項】**

如請求項144之細胞群，其中該第一連接子多肽序列及該第二連接子多肽序列包含相同連接子多肽序列。

**【第146項】**

如請求項145之細胞群，其中編碼相同連接子多肽序列之編碼該第一連接子多肽序列的核苷酸序列及編碼該第二連接子多肽序列之核苷酸序列包含密碼子編碼分歧核苷酸序列，並且其中編碼該第一連接子多肽序列之該等核苷酸序列及編碼該第二連接子多肽的該核苷酸序列具有彼此相對編碼分歧之密碼子。

**【第147項】**

如請求項96至146中任一項之細胞群，其中該基因的該至少一部分編

碼編碼區域。

【第148項】

如請求項147之細胞群，其中該編碼區域選自由以下各者組成之群：調節免疫系統的因子、細胞介素、調節T細胞功能之因子、提高T細胞存活之因子、增強T細胞功能的因子，及免疫檢查點抑制劑。

【第149項】

如請求項96至146中任一項之細胞群，其中該基因的該至少一部分編碼非編碼區域。

【第150項】

如請求項149之細胞群，其中該非編碼區域選自由以下各者組成之群：shRNA、siRNA、miRNA、調節免疫系統的因子、細胞介素、調節T細胞功能之因子、提高T細胞存活之因子，及增強T細胞功能的因子。

【第151項】

如請求項96至146中任一項之細胞群，其中該基因的該至少一部分包含TCR基因之至少一部分。

【第152項】

如請求項151之細胞群，其中該TCR基因的該至少一部分包含：

- a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；
- b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；及
- c)編碼第二連接子序列之核苷酸序列。

【第153項】

如請求項151或152之細胞群，其中編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列的核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列或該TCR基因的該至少一部分

選自由以下各者組成之群的至少一部分：鼠化TCR、人類化TCR、結構域調換TCR、點突變之TCR、使用能夠形成二硫鍵聯的經工程改造半胱胺酸之經工程改造TCR、優化人體內表現之密碼子優化TCR、優化密碼子使用度及移除RNA不穩定性元素之序列優化TCR、該TCR基因的可變區域序列、嵌合抗原受體(CAR)及單鏈TCR。

**【第154項】**

如請求項151至153中任一項之細胞群，其中該TCR- $\alpha$ 多肽序列、該TCR- $\beta$ 多肽序列或由該TCR基因的該至少一部分編碼之多肽係經工程改造，可以相對於內源性TCR多肽序列，展現與第二外源性TCR多肽序列的更大相聯性，視情況其中該TCR- $\alpha$ 多肽序列及該TCR- $\beta$ 多肽序列經工程改造，可以相對於內源性TCR多肽序列，展現彼此有更大相聯性。

**【第155項】**

如請求項152至154中任一項之細胞群，其中該等經編碼多肽序列之方向為連接子：TCR- $\alpha$ ：第二連接子：TCR- $\beta$ 。

**【第156項】**

如請求項152至154中任一項之細胞群，其中該等經編碼多肽序列之方向為連接子：TCR- $\beta$ ：第二連接子：TCR- $\alpha$ 。

**【第157項】**

如請求項151至156中任一項之細胞群，其中編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列的核苷酸序列或編碼該TCR基因之該至少一部分的核苷酸序列包含密碼子編碼分歧核苷酸序列，並且其中該密碼子編碼分歧核苷酸序列具有相對於內源性核苷酸序列編碼分歧的密碼子。

**【第158項】**

如請求項96至157中任一項之細胞群，其中該細胞群包含人類細胞或源自人類之細胞。

**【第159項】**

如請求項96至158中任一項之細胞群，其中該細胞群包含免疫細胞群。

**【第160項】**

如請求項159之細胞群，其中該免疫細胞群包含T細胞群。

**【第161項】**

如請求項160之細胞群，其中該T細胞群選自由以下各者組成之群：細胞毒素T淋巴球(CTL)、CD8<sup>+</sup> T細胞、CD4<sup>+</sup> T細胞、初代T細胞、腫瘤浸潤性T細胞、經工程改造T細胞、調節T細胞(Treg)、輔助T細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞、 $\alpha$ - $\beta$  T細胞及 $\gamma$ - $\delta$  T細胞。

**【第162項】**

如請求項159之細胞群，其中該細胞群包含選自由以下各者組成之群的群：B細胞、單核球、巨噬細胞、樹突狀細胞及天然殺手T細胞。

**【第163項】**

如請求項96至158中任一項之細胞群，其中該細胞群包含幹細胞群。

**【第164項】**

如請求項163之細胞群，其中該幹細胞群包含造血幹細胞群。

**【第165項】**

如請求項163之細胞群，其中該幹細胞群包含胚胎幹細胞群。

**【第166項】**

如請求項96至165中任一項之細胞群，其中該細胞群為初代細胞。

**【第167項】**

如請求項96至166中任一項之細胞群，其中該細胞群為經分離細胞群，其中該經分離細胞群係自個體分離。

**【第168項】**

如請求項167之細胞群，其中該個體已知或疑似患有癌症。

**【第169項】**

如請求項96至168中任一項之細胞群，其中該細胞群包含活體外培養細胞。

**【第170項】**

如請求項169之細胞群，其中該等經活體外培養細胞包含受刺激細胞。

**【第171項】**

如請求項170之細胞群，其中該等受刺激細胞包含受細胞介素刺激T細胞，視情況其中該等受細胞介素刺激T細胞包含受CD3刺激T細胞、受CD28刺激T細胞或受CD3及CD28刺激T細胞。

**【第172項】**

如請求項171之細胞群，其中在IL7、IL15或其組合存在下培養該等受細胞介素刺激T細胞。

**【第173項】**

如請求項171或172之細胞群，其中在IL2存在下培養該等受細胞介素刺激T細胞。

**【第174項】**

如請求項171或172之細胞群，其中在實質上不含IL2的培養基中培養該等受細胞介素刺激T細胞。

**【第175項】**

如請求項96至174中任一項之細胞群，其中該細胞群進一步包含第二整合式核苷酸序列，其中該第二整合式核苷酸序列包含與編碼第二基因之至少一部分的該核苷酸序列一致之序列，該第二整合式核苷酸序列在第二內源性基因組標靶基因座處整合，且該第二整合式核苷酸序列之取向可以使得能夠表現該第二基因的該至少一部分。

**【第176項】**

如請求項175之細胞群，其中該細胞群進一步包含第二環形聚核苷酸，該第二環形聚核苷酸包含第二外源性核苷酸組合物，該第二外源性核苷酸組合物包含：

a)編碼該第二基因的該至少一部分之核苷酸序列；

b)與該第二內源性基因組標靶基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；及

c)與該第二內源性基因組標靶基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，

其中與該第二內源性基因組標靶基因座中之該第一及該第二區域一致的該等核苷酸序列之取向可以便於該第二內源性基因組標靶基因座處之同源重組。

**【第177項】**

一種為有需要之個體治療之方法，其中該治療包含投與治療有效劑量的如請求項1至176中任一項之經修飾細胞或細胞群。

**【第178項】**

如請求項177之治療方法，其中該等經修飾細胞或細胞群源自該個體。

**【第179項】**

如請求項177之治療方法，其中參照該個體，該等經修飾細胞或細胞群為同種異體。

**【第180項】**

一種基因修飾細胞之方法，該方法包含以下步驟：

1)提供包含單一聚核苷酸之核苷酸組合物，該單一聚核苷酸包含：

a)編碼基因的至少一部分之核苷酸序列；

b)與內源性基因組標靶基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；

及

c)與該內源性基因組標靶基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，

與該內源性基因組標靶基因座中之該第一及該第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於該內源性基因組標靶基因座處之同源重組，

編碼該基因的該至少一部分之核苷酸序列之取向可以使得該組合物在整合至該內源性基因組標靶基因座中之後，能夠表現該基因的該至少一部分；且

2)提供能夠裂解該內源性基因組標靶基因座內限定核苷酸序列的核酸酶組合物；

3)使該細胞與該核苷酸組合物及該核酸酶組合物接觸，

4)藉由不同於使用病毒感染細胞之手段，將該核苷酸組合物及該核酸酶組合物傳遞至該細胞中。

**【第181項】**

如請求項180之方法，其進一步包含提供能夠裂解該細胞內之第二限定核苷酸序列的第二核酸酶組合物，其中該第二核酸酶組合物在該接觸步驟中與該細胞接觸且在該傳遞步驟中傳遞至該細胞中。

**【第182項】**

如請求項181之方法，其中該裂解造成突變，該突變產生由該第二限定核苷酸序列編碼之非功能性基因。

**【第183項】**

如請求項182之方法，其中該產生該非功能性基因之突變包含選自由以下各者組成之群的基因編碼區域中的突變：造成所轉譯蛋白質讀框變化之讀框轉移突變、導致胺基酸被終止密碼子取代之無意義突變及造成一個胺基酸被另一胺基酸取代的誤義突變。

**【第184項】**

如請求項182之方法，其中產生該非功能性基因之該突變包含選自由以下各者組成之群的該基因之非編碼區域中的突變：改變由該基因編碼之mRNA產物之表現的突變及改變由該基因編碼之mRNA產物之穩定性的突變。

**【第185項】**

如請求項181之方法，其進一步包含：

提供第二核苷酸組合物，該第二組合物包含：

a)編碼第二基因的至少一部分之核苷酸序列；

b)與第二內源性基因組標靶基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；及

c)與該第二內源性基因組標靶基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，

其中所有該等核苷酸序列在單一聚核苷酸上，

與該第二內源性基因組標靶基因座中之該第一及該第二區域一致的該等核苷酸序列之取向可以便於該第二內源性基因組標靶基因座處之同源重組，

編碼該基因的該至少一部分之該核苷酸序列之取向可以使得該組合物在整合至該第二內源性基因組標靶基因座中之後，能夠表現該第二基因的該至少一部分，且

該第二核苷酸組合物在該接觸步驟中與該細胞接觸且在該傳遞步驟中傳遞至該細胞中。

#### 【第186項】

如請求項180至185中任一項之方法，其中該核酸酶組合物包含選自由以下各者組成之群的核酸酶：成簇規律間隔短回文重複序列(CRISPR)家族核酸酶、類轉錄活化因子效應子核酸酶(TALEN)或其衍生物、鋅指核酸酶(ZFN)或其衍生物及歸巢核酸內切酶(HE)或其衍生物。

#### 【第187項】

如請求項186之方法，其中該CRISPR家族核酸酶為Cas9核酸酶。

#### 【第188項】

如請求項180至187中任一項之方法，其中該核酸酶組合物包含預成型蛋白質複合物。

【第189項】

如請求項180至187中任一項之方法，其中該核酸酶組合物包含能夠在該細胞內表現該核酸酶的核苷酸載體。

【第190項】

如請求項180至189中任一項之方法，其中由該細胞與該核苷酸組合物及該核酸酶組合物接觸到該傳遞步驟之間之接觸步驟小於60分鐘、小於45分鐘、小於30分鐘、小於20分鐘、小於15分鐘、小於10分鐘、小於5分鐘或小於1分鐘。

【第191項】

如請求項180至190中任一項之方法，其中該傳遞步驟選自由以下各者組成之群：電穿孔、轉染、藉由物理方式的細胞膜變形、脂質奈米粒子(lipid nanoparticle，LNP)、類病毒粒子(virus like particle，VLP)及音波處理。

【第192項】

如請求項180至190中任一項之方法，其中該傳遞步驟包含電穿孔。

【第193項】

如請求項180至192中任一項之方法，其中藉由該內源性基因組標靶基因座內之內源性啟動子主導該等經編碼多肽序列的表現。

【第194項】

如請求項180至192中任一項之方法，其中藉由外源性啟動子主導該等經編碼多肽序列之表現。

【第195項】

如請求項194之方法，其中該外源性啟動子選自由以下各者組成之

群：哺乳動物啟動子、人類啟動子、病毒啟動子、來自逆轉錄病毒或慢病毒的長末端重複序列(LTR)衍生啟動子、兩種啟動子的融合物、啟動子之兩個部分之融合物、MMLV LTR啟動子、HIV LTR啟動子、MCMV LTR啟動子、EF1a、MND、CMV、SV40、PGK1、Ubc、 $\beta$ -肌動蛋白、CAG、小分子誘導性啟動子、四環素誘導性啟動子、小分子條件性啟動子、Cre-LoxP條件性啟動子系統、Flp-FRT條件性啟動子系統及他莫昔芬條件性啟動子系統。

**【第196項】**

如請求項180至195中任一項之方法，其中該基因的該至少一部分之長度大於或等於100個鹼基。

**【第197項】**

如請求項180至195中任一項之方法，其中該基因的該至少一部分之長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於400個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於800個鹼基、長度大於或等於1500個鹼基、長度大於或等於2000個鹼基或長度大於或等於4000個鹼基。

**【第198項】**

如請求項180至197中任一項之方法，其中與該內源性基因組標靶基因座中之該第一區域或該第二區域一致的該等核苷酸序列之長度為50個鹼基、長度為100個鹼基、長度為200個鹼基、長度為400個鹼基、長度為600個鹼基、長度為800個鹼基、長度為1500個鹼基、長度為2000個鹼基或長度為4000個鹼基。

**【第199項】**

如請求項180至198中任一項之方法，其中該限定核苷酸序列在整合

之後瓦解。

**【第200項】**

如請求項180至199中任一項之方法，其中以操作方式與該內源性基因組標靶基因座相聯之內源性基因的表現已瓦解。

**【第201項】**

如請求項180至200中任一項之方法，其進一步包含能夠提高同源重組率之額外試劑。

**【第202項】**

如請求項180至201中任一項之方法，其中該單一聚核苷酸選自由以下各者組成之群：環形質體、直鏈DNA片段、小環及ssDNA。

**【第203項】**

如請求項202之方法，其中該環形質體具有小於500個鹼基之載體主鏈，其中該載體主鏈包含核苷酸序列，該核苷酸序列並非編碼該基因的該至少一部分之核苷酸序列，並非與該第一內源性基因組標靶基因座一致之核苷酸序列，亦非與該第二內源性基因組標靶基因座一致的核苷酸序列。

**【第204項】**

如請求項180至203中任一項之方法，其中該單一聚核苷酸並非經聚合酶鏈反應(PCR)擴增之聚核苷酸。

**【第205項】**

如請求項180至204中任一項之方法，其中該單一聚核苷酸實質上不含污染物。

**【第206項】**

如請求項180至205中任一項之方法，其中該單一聚核苷酸實質上不

含降低細胞生存力之組分。

**【第207項】**

如請求項180至206中任一項之方法，其中該內源性基因組標靶基因座包含編碼區域。

**【第208項】**

如請求項180至206中任一項之方法，其中該內源性基因組標靶基因座包含內含子。

**【第209項】**

如請求項180至208中任一項之方法，其中該內源性基因組標靶基因座為T-細胞受體(TCR)- $\alpha$ 基因座。

**【第210項】**

如請求項180至208中任一項之方法，其中該內源性基因組標靶基因座為TCR- $\beta$ 基因座。

**【第211項】**

如請求項180至208中任一項之方法，其中該內源性基因組標靶基因座為免疫檢查點基因座。

**【第212項】**

如請求項211之方法，其中該免疫檢查點基因座選自由以下各者組成之群：PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM3、LAG3及VISTA。

**【第213項】**

如請求項180至212中任一項之方法，其中該基因的該至少一部分包含連接子序列。

**【第214項】**

如請求項213之方法，其中該連接子序列編碼可裂解連接子多肽序列，其中在表現之後，該可裂解連接子多肽裂解，因而產生僅經該基因的該至少一部分編碼之多肽。

**【第215項】**

如請求項214之方法，其中該可裂解連接子多肽序列包含選自由以下各者組成之群的2A核糖體跳躍元素：T2A、E2A、P2A及F2A。

**【第216項】**

如請求項214或215之方法，其中該可裂解連接子多肽序列包含弗林裂解位點序列。

**【第217項】**

如請求項213之方法，其中該連接子序列包含內部核糖體入口位點(IRES)。

**【第218項】**

如請求項213之方法，其中該連接子序列包含外源性啟動子。

**【第219項】**

如請求項213至218中任一項之方法，其中該連接子序列進一步包含剪接受體序列。

**【第220項】**

如請求項180至219中任一項之方法，其中該基因的該至少一部分編碼編碼區域。

**【第221項】**

如請求項220之方法，其中該編碼區域選自由以下各者組成之群：調節免疫系統之因子、細胞介素、調節T細胞功能的因子、提高T細胞存活

之因子、增強T細胞功能之因子及免疫檢查點抑制劑。

【第222項】

如請求項180至219中任一項之方法，其中該基因的該至少一部分編碼非編碼區域。

【第223項】

如請求項222之方法，其中該非編碼區域選自由以下各者組成之群：shRNA、siRNA、miRNA、調節免疫系統之因子、細胞介素、調節T細胞功能的因子、提高T細胞存活之因子及增強T細胞功能的因子。

【第224項】

如請求項180至219中任一項之方法，其中該基因的該至少一部分包含TCR基因之至少一部分。

【第225項】

如請求項224之方法，其中該TCR基因的該至少一部分選自由以下各者組成之群的至少一部分：鼠化TCR、人類化TCR、結構域調換TCR、點突變TCR、使用能夠形成二硫鍵聯的經工程改造半胱胺酸之經工程改造TCR、優化人體內表現之密碼子優化TCR、優化密碼子使用度及移除RNA不穩定性元素之序列優化TCR、TCR基因的可變區域序列、嵌合抗原受體(CAR)及單鏈TCR。

【第226項】

如請求項224之方法，其中該TCR基因的該至少一部分包含：

- a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；
- b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；及
- c)編碼第二連接子序列之核苷酸序列。

**【第227項】**

如請求項226之方法，其中該TCR- $\alpha$ 多肽序列選自由以下各者組成之群：鼠化TCR- $\alpha$ 、人類化TCR- $\alpha$ 、結構域調換TCR- $\alpha$ 、點突變TCR- $\alpha$ 、使用能夠形成二硫鍵聯之經工程改造半胱胺酸之經工程改造TCR- $\alpha$ 、優化人體內表現之密碼子優化TCR- $\alpha$ 、嵌合抗原受體(CAR)及優化密碼子使用度及移除RNA不穩定性元素的序列優化TCR- $\alpha$ 。

**【第228項】**

如請求項226或227之方法，其中該TCR- $\beta$ 多肽序列選自由以下各者組成之群：鼠化TCR- $\beta$ 、人類化TCR- $\beta$ 、結構域調換TCR- $\beta$ 、點突變TCR- $\beta$ 、使用能夠形成二硫鍵聯之經工程改造半胱胺酸之經工程改造TCR- $\beta$ 、優化人體內表現之密碼子優化TCR- $\beta$ 、嵌合抗原受體(CAR)及優化密碼子使用度及移除RNA不穩定性元素的序列優化TCR- $\beta$ 。

**【第229項】**

如請求項226至228中任一項之方法，其中該等經編碼多肽序列之方向為連接子：TCR- $\alpha$ ：第二連接子：TCR- $\beta$ 。

**【第230項】**

如請求項226至228中任一項之方法，其中該等經編碼多肽序列之方向為連接子：TCR- $\beta$ ：第二連接子：TCR- $\alpha$ 。

**【第231項】**

如請求項226至230中任一項之方法，其中該第二連接子序列包含可裂解連接子多肽序列。

**【第232項】**

如請求項231之方法，其中該可裂解連接子多肽序列包含選自由以下

各者組成之群的2A核糖體跳躍元素：T2A、E2A、P2A及F2A。

【第233項】

如請求項231或232之方法，其中該可裂解連接子多肽序列包含弗林裂解位點序列。

【第234項】

如請求項226至230中任一項之方法，其中該第二連接子序列包含內部核糖體入口位點(IRES)。

【第235項】

如請求項226至230中任一項之方法，其中該第二連接子序列包含外源性啟動子。

【第236項】

如請求項185至235中任一項之方法，其中該基因的該至少一部分選自由以下各者組成之群：shRNA、siRNA、miRNA、調節免疫系統之因子、細胞介素、調節T細胞功能的因子、提高T細胞存活之因子、增強T細胞功能之因子及免疫檢查點抑制劑。

【第237項】

如請求項185至235中任一項之方法，其中該第二基因的該至少一部分包含TCR基因之至少一部分。

【第238項】

一種由如請求項180至237中任一項之方法產生之經修飾細胞，其中該細胞包含整合式核苷酸序列，其中該整合式核苷酸序列包含與編碼該基因之該至少一部分之核苷酸序列一致的序列，該整合式核苷酸序列在該內源性基因組標靶基因座處整合，且該整合式核苷酸序列之取向可以使得能

夠表現該基因的該至少一部分。

**【第239項】**

一種由如請求項180至237中任一項之方法產生之細胞群，其中該群中的超過10%、超過20%、超過30%、超過40%、超過50%、超過60%或超過70%之該等細胞包含整合式核苷酸序列，其中該整合式核苷酸序列包含與編碼該基因的該至少一部分之核苷酸序列一致的序列，該整合式核苷酸序列在該內源性基因組標靶基因座處整合，且該整合式核苷酸序列之取向可以使得能夠表現該基因的該至少一部分。

**【第240項】**

如請求項238或239之經修飾細胞或細胞群，其中該等細胞在該整合式核苷酸序列之整合之後尚未進行分類、選拔或分離。

**【第241項】**

如請求項238至240中任一項之細胞群，其中在該傳遞步驟之後該細胞群的生存力為至少10%、至少20%、至少40%、至少60%或至少80%。

**【第242項】**

如請求項241之細胞群，其中在該傳遞步驟之後4天評估該生存力。

**【第243項】**

一種為有需要之個體治療之方法，其中該治療包含投與治療有效劑量的如請求項238至240中任一項之該等細胞或細胞群。

**【第244項】**

如請求項243之治療方法，其中該等細胞或細胞群源自該個體。

**【第245項】**

如請求項243之治療方法，其中參照該個體，該等細胞或細胞群為同

種異體。

【第246項】

一種基因修飾細胞之方法，該方法包含以下步驟：

1)提供核苷酸組合物，其包含：

a)編碼基因的至少一部分之核苷酸序列；

b)與內源性基因組標靶基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；

及

c)與內源性基因組標靶基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，

其中該基因的該至少一部分之長度為100個鹼基，

所有該等核苷酸序列在單一聚核苷酸上，

與該內源性基因組標靶基因座中之該第一及該第二區域一致的該等核苷酸序列之取向可以便於該內源性基因組標靶基因座處之同源重組，

編碼該基因的該至少一部分之該核苷酸序列之取向可以使得該組合物在整合至該內源性基因組標靶基因座中之後，能夠表現該基因的該至少一部分；且

2)提供能夠裂解該內源性基因組標靶基因座內限定核苷酸序列的CRISPR/Cas9核酸酶組合物；

3)使該細胞與該核苷酸組合物及該CRISPR/Cas9核酸酶組合物接觸，且

4)藉由電穿孔將該核苷酸組合物及該CRISPR/Cas9核酸酶組合物傳遞至該細胞中。

【第247項】

一種使用限定T細胞受體產生經修飾的T細胞之方法，該方法包含以下步驟：

1)提供核苷酸組合物，其包含：

- a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列的至少一部分之核苷酸序列；
- b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列的至少一部分之核苷酸序列；
- c)編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列；
- d)編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列；
- e)與內源性TCR基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；及
- f)與內源性TCR基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，

其中所有該等核苷酸序列在單一聚核苷酸上，

與該內源性TCR基因座中之該第一及該第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於該內源性TCR基因座處之同源重組，

編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列的該至少一部分之核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列的該至少一部分之核苷酸序列及編碼該第一及該第二連接子多肽序列的核苷酸序列之取向可以使得該等多肽序列中之各者在將該組合物整合至該內源性TCR基因座中之後，能夠表現為單一多肽，

該第一連接子多肽序列位在該TCR- $\alpha$ 多肽序列之該至少一部分、該TCR- $\beta$ 多肽序列的該至少一部分及該第二連接子多肽序列之前，

該第二連接子多肽序列位在該TCR- $\alpha$ 多肽序列與該TCR- $\beta$ 多肽序列之間，及

該TCR- $\alpha$ 多肽序列及該TCR- $\beta$ 多肽序列各自形成分開的多肽，其中該等分開的多肽能夠締合在一起以形成功能性TCR；

2)提供能夠裂解該內源性TCR基因座內限定核苷酸序列的核酸酶組合物；

3)使該T細胞與該核苷酸組合物及該核酸酶組合物接觸，且

4)將該核苷酸組合物及該核酸酶組合物傳遞至該T細胞中。

**【第248項】**

如請求項247之方法，其進一步包含提供能夠裂解該T細胞內之第二限定核苷酸序列的第二核酸酶組合物，其中該第二核酸酶組合物在該接觸步驟中與該T細胞接觸且在該傳遞步驟中傳遞至該T細胞中。

**【第249項】**

如請求項248之方法，其中該裂解造成突變，該突變產生由該第二限定核苷酸序列編碼之非功能性基因。

**【第250項】**

如請求項249之方法，其中產生該非功能性基因之該突變包含選自由以下各者組成之群的該基因之編碼區域中的突變：造成所轉譯蛋白質讀框變化之讀框轉移突變、導致胺基酸被終止密碼子取代之無意義突變及造成一個胺基酸被另一胺基酸取代的誤義突變。

**【第251項】**

如請求項249之方法，其中該產生該非功能性基因之突變包含選自由以下各者組成之群的該基因之非編碼區域中的突變：改變由該基因編碼之mRNA產物之表現的突變及改變由該基因編碼之mRNA產物之穩定性的突變。

**【第252項】**

如請求項249之方法，其進一步包含：

提供第二核苷酸組合物，該第二組合物包含：

- a)編碼基因的至少一部分之核苷酸序列；
- b)與內源性基因組標靶基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；

及

- c)與內源性基因組標靶基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，
- 其中所有該等核苷酸序列在單一聚核苷酸上，

與該內源性基因組標靶基因座中之該第一及該第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於該內源性基因組標靶基因座處之同源重組，

編碼該基因的該至少一部分之核苷酸序列之取向可以使得該組合物在整合至該內源性基因組標靶基因座中之後，能夠表現該基因的該至少一部分，且

該第二核苷酸組合物在該接觸步驟中與該T細胞接觸且在該傳遞步驟中傳遞至該T細胞中。

#### 【第253項】

如請求項247至252中任一項之方法，其中該核酸酶組合物包含選自由以下各者組成之群的核酸酶：成簇規律間隔短回文重複序列(CRISPR)家族核酸酶、類轉錄活化因子效應子核酸酶(TALEN)或其衍生物、鋅指核酸酶(ZFN)或其衍生物及歸巢核酸內切酶(HE)或其衍生物。

#### 【第254項】

如請求項253之方法，其中該CRISPR家族核酸酶為Cas9核酸酶。

#### 【第255項】

如請求項247至254中任一項之方法，其中該核酸酶組合物包含預成

型蛋白質複合物。

**【第256項】**

如請求項247至254中任一項之方法，其中該核酸酶組合物包含能夠在T細胞內表現該核酸酶的核苷酸載體。

**【第257項】**

如請求項247至256中任一項之方法，其中在該T細胞與該核苷酸組合物及該核酸酶組合物接觸到該傳遞步驟之間之接觸步驟小於60分鐘、小於45分鐘、小於30分鐘、小於20分鐘、小於15分鐘、小於10分鐘或小於5分鐘。

**【第258項】**

如請求項247至257中任一項之方法，其中該傳遞步驟選自由以下各者組成之群：電穿孔、轉染、藉由物理方式的細胞膜變形、脂質奈米粒子(LNP)、類病毒粒子(VLP)及音波處理。

**【第259項】**

如請求項247至257中任一項之方法，其中該傳遞步驟包含電穿孔。

**【第260項】**

如請求項247至259中任一項之方法，其中藉由該內源性基因組標靶基因座內之內源性啟動子主導該等經編碼多肽序列的表現。

**【第261項】**

如請求項247至260中任一項之方法，其中藉由外源性啟動子主導該等經編碼多肽序列之表現。

**【第262項】**

如請求項261之方法，其中該外源性啟動子選自由以下各者組成之

群：哺乳動物啟動子、人類啟動子、病毒啟動子、來自逆轉錄病毒或慢病毒的長末端重複序列(LTR)衍生啟動子、兩種啟動子的融合物、啟動子之兩個部分之融合物、MMLV LTR啟動子、HIV LTR啟動子、MCMV LTR啟動子、EF1a、MND、CMV、SV40、PGK1、Ubc、 $\beta$ -肌動蛋白、CAG、小分子誘導性啟動子、四環素誘導性啟動子、小分子條件性啟動子、Cre-LoxP條件性啟動子系統、Flp-FRT條件性啟動子系統及他莫昔芬條件性啟動子系統。

#### 【第263項】

如請求項247至262中任一項之方法，其中編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列的該至少一部分之核苷酸序列或編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列的該至少一部分之核苷酸序列之長度大於或等於100個鹼基。

#### 【第264項】

如請求項247至262中任一項之方法，其中編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列的該至少一部分之核苷酸序列或編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列的該至少一部分之核苷酸序列之長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於400個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於800個鹼基、長度大於或等於1500個鹼基、長度大於或等於2000個鹼基或長度大於或等於4000個鹼基。

#### 【第265項】

如請求項247至264中任一項之方法，其中與該內源性TCR基因座中之該第一區域或該第二區域一致的核苷酸序列之長度為50個鹼基、長度為100個鹼基、長度為200個鹼基、長度為400個鹼基、長度為600個鹼基、長度為800個鹼基、長度為1500個鹼基、長度為2000個鹼基或長度為4000

個鹼基。

【第266項】

如請求項247至265中任一項之方法，其中該限定核苷酸序列在整合之後瓦解。

【第267項】

如請求項247至266中任一項之方法，其中以操作方式與該內源性TCR基因座相聯之內源性基因的表現已瓦解。

【第268項】

如請求項247至267中任一項之方法，其進一步包含能夠提高同源重組率之額外試劑。

【第269項】

如請求項247至268中任一項之方法，其中該單一聚核苷酸選自由以下各者組成之群：環形質體、直鏈DNA片段、小環及ssDNA。

【第270項】

如請求項269之方法，其中該環形質體具有小於500個鹼基之載體主鏈，其中該載體主鏈為核苷酸序列，該核苷酸序列並非編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列的該至少一部分之核苷酸序列，並非編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列的該至少一部分之核苷酸序列，亦非編碼該第一及該第二連接子多肽序列的核苷酸序列。

【第271項】

如請求項247至270中任一項之方法，其中該單一聚核苷酸並非經聚合酶鏈反應(PCR)擴增之聚核苷酸。

【第272項】

如請求項247至271中任一項之方法，其中該單一聚核苷酸實質上不含污染物。

**【第273項】**

如請求項247至272中任一項之方法，其中該內源性TCR基因座包含編碼區域。

**【第274項】**

如請求項247至272中任一項之方法，其中該內源性TCR基因座包含內含子。

**【第275項】**

如請求項247至274中任一項之方法，其中該內源性TCR基因座包含該TCR- $\alpha$ 基因座。

**【第276項】**

如請求項247至274中任一項之方法，其中該內源性TCR基因座包含該TCR- $\beta$ 基因座。

**【第277項】**

如請求項247至276中任一項之方法，其中該第一連接子序列包含可裂解連接子多肽序列，其中在表現之後，該可裂解連接子多肽裂解，因而產生僅藉由編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列的該至少一部分、該TCR- $\beta$ 多肽序列之該至少一部分及該第二連接子多肽序列所編碼之多肽。

**【第278項】**

如請求項277之方法，其中該可裂解連接子多肽序列包含選自由以下各者組成之群的2A核糖體跳躍元素：T2A、E2A、P2A及F2A。

**【第279項】**

如請求項278或279之方法，其中該可裂解連接子多肽序列包含弗林裂解位點序列。

**【第280項】**

如請求項247至276中任一項之方法，其中該第一連接子多肽序列包含IRES。

**【第281項】**

如請求項247至280中任一項之方法，其中該第一連接子序列包含剪接受體序列。

**【第282項】**

如請求項247至281中任一項之方法，其中該第二連接子序列包含可裂解連接子多肽序列，其中在表現之後，該可裂解連接子多肽裂解，因而使得該TCR- $\alpha$ 多肽序列及該TCR- $\beta$ 多肽序列各自形成分開的多肽，其中該等分開的多肽能夠締合在一起以形成功能性TCR。

**【第283項】**

如請求項277之方法，其中該可裂解連接子多肽序列包含選自由以下各者組成之群的2A核糖體跳躍元素：T2A、E2A、P2A及F2A。

**【第284項】**

如請求項282或283之方法，其中該可裂解連接子多肽序列包含弗林裂解位點序列。

**【第285項】**

如請求項247至281中任一項之方法，其中該第二連接子序列包含內部核糖體入口位點(IRES)。

**【第286項】**

如請求項247至281中任一項之方法，其中該第二連接子序列包含外源性啟動子。

**【第287項】**

如請求項247至286中任一項之方法，其中該TCR- $\alpha$ 多肽序列選自由以下各者組成之群：鼠化TCR- $\alpha$ 、人類化TCR- $\alpha$ 、結構域調換TCR- $\alpha$ 、點突變TCR- $\alpha$ 、使用能夠形成二硫鍵聯之經工程改造半胱胺酸之經工程改造TCR- $\alpha$ 、優化人體內表現之密碼子優化TCR- $\alpha$ 、嵌合抗原受體(CAR)及優化密碼子使用度及移除RNA不穩定性元素的序列優化TCR- $\alpha$ 。

**【第288項】**

如請求項247至287中任一項之方法，其中該TCR- $\beta$ 多肽序列選自由以下各者組成之群：鼠化TCR- $\beta$ 、人類化TCR- $\beta$ 、結構域調換TCR- $\beta$ 、點突變TCR- $\beta$ 、使用能夠形成二硫鍵聯之經工程改造半胱胺酸之經工程改造TCR- $\beta$ 、優化人體內表現之密碼子優化TCR- $\beta$ 、嵌合抗原受體(CAR)及優化密碼子使用度及移除RNA不穩定性元素的序列優化TCR- $\beta$ 。

**【第289項】**

如請求項247至288中任一項之方法，其中該等經編碼多肽序列之方向為第一連接子：TCR- $\alpha$ ；第二連接子：TCR- $\beta$ 。

**【第290項】**

如請求項247至288中任一項之方法，其中該等經編碼多肽序列之方向為連接子：TCR- $\beta$ ；第二連接子：TCR- $\alpha$ 。

**【第291項】**

如請求項248至290中任一項之方法，其中若該限定核苷酸序列在內源性TCR- $\alpha$ 基因座內，則該第二限定核苷酸序列在內源性TCR- $\beta$ 基因座

內。

【第292項】

如請求項248至290中任一項之方法，其中若該限定核苷酸序列在內源性TCR- $\beta$ 基因座內，則該第二限定核苷酸序列在內源性TCR- $\alpha$ 基因座內。

【第293項】

如請求項248至290中任一項之方法，其中該第二限定核苷酸序列在免疫檢查點基因座內。

【第294項】

如請求項252至293中任一項之方法，其中該基因的該至少一部分選自由以下各者組成之群：shRNA、siRNA、miRNA、細胞介素、提高T細胞存活之因子、增強T細胞功能的因子及免疫檢查點抑制劑。

【第295項】

一種用於主導在內源性基因組標靶基因座處之同源重組之核苷酸組合物，該核苷酸組合物包含環形聚核苷酸，該環形聚核苷酸包含：

- a)編碼基因的至少一部分之核苷酸序列；
- b)與內源性基因組標靶基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；及
- c)與內源性基因組標靶基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，

其中所有該等核苷酸序列在單一聚核苷酸上，

與該內源性基因組標靶基因座中之該第一及該第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於該內源性基因組標靶基因座處之同源重組，

編碼該基因的該至少一部分之該核苷酸序列之取向可以使得該組合物在整合至該內源性基因組標靶基因座中之後，能夠表現該基因的該至少

一部分。

**【第296項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中編碼該基因的該至少一部分之該核苷酸序列之長度大於或等於100個鹼基。

**【第297項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中編碼該基因的該至少一部分之該核苷酸序列之長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於400個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於800個鹼基、長度大於或等於1500個鹼基、長度大於或等於2000個鹼基或長度大於或等於4000個鹼基。

**【第298項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中與該內源性基因組標靶基因座中之該第一區域一致的該等核苷酸序列之長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於100個鹼基、長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於300個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基或長度大於或等於2000個鹼基。

**【第299項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中與該內源性基因組標靶基因座中之該第二區域一致的該等核苷酸序列之長度大於或等於50個鹼基、長度大於或等於100個鹼基、長度大於或等於200個鹼基、長度大於或等於300個鹼基、長度大於或等於600個鹼基、長度大於或等於1000個鹼基或長度大於或等於2000個鹼基。

**【第300項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中與該內源性基因組標靶基因座中之該第一區域一致的該等核苷酸序列及與該內源性基因組標靶基因座中之該第二區域一致的該等核苷酸序列之長度分別大於或等於600個鹼基。

**【第301項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該環形聚核苷酸包含質體或奈米質體。

**【第302項】**

如請求項301之核苷酸組合物，其中該質體具有小於500個鹼基之載體主鏈，並且其中該載體主鏈為核苷酸序列，該核苷酸序列並非編碼該基因的該至少一部分之該核苷酸序列且並非與該第一內源性標靶基因組基因座一致之該核苷酸序列。

**【第303項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該環形聚核苷酸並非經聚合酶鏈反應(PCR)擴增之聚核苷酸。

**【第304項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該內源性基因組標靶基因座包含編碼區域。

**【第305項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該內源性基因組標靶基因座包含內含子。

**【第306項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該內源

性基因組標靶基因座或該內源性TCR基因座包含該T細胞受體(TCR)- $\alpha$ 基因座。

**【第307項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該內源性基因組標靶基因座或該內源性TCR基因座包含該TCR- $\beta$ 基因座。

**【第308項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該內源性基因組標靶包含免疫檢查點基因座。

**【第309項】**

如請求項308之核苷酸組合物，其中該免疫檢查點基因座選自由以下各者組成之群：PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM3、LAG3及VISTA。

**【第310項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該基因的該至少一部分包含連接子序列。

**【第311項】**

如請求項310之核苷酸組合物，其中該連接子序列編碼可裂解連接子多肽序列，其中在表現之後，該可裂解連接子多肽裂解，因而產生僅經該基因的該至少一部分編碼之多肽。

**【第312項】**

如請求項311之核苷酸組合物，其中該等可裂解連接子多肽中之任一者包含弗林裂解位點。

**【第313項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該等連

接子序列中的任一者包含選自由以下各者組成之群的2A核糖體跳躍元素：T2A、E2A、P2A及F2A。

**【第314項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該等可裂解連接子多肽中之任一者包含Gly-Ser-Gly連接子，視情況其中該Gly-Ser-Gly連接子為2A核糖體跳躍元素的N端，且視情況其中該Gly-Ser-Gly連接子自N端至C端之方向為弗林裂解位點：Gly-Ser-Gly連接子：2A核糖體跳躍元素。

**【第315項】**

如請求項310之核苷酸組合物，其中該連接子序列、編碼該第一連接子多肽序列之核苷酸序列或編碼該第二連接子多肽序列的核苷酸序列包含內部核糖體入口位點(IRES)。

**【第316項】**

如請求項310之核苷酸組合物，其中該連接子序列、編碼該第一連接子多肽序列之核苷酸序列或編碼該第二連接子多肽序列的核苷酸序列包含外源性啟動子。

**【第317項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該連接子序列、編碼該第一連接子多肽序列之核苷酸序列或編碼該第二連接子多肽序列的核苷酸序列包含剪接受體序列。

**【第318項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該基因的該至少一部分包含編碼訊息肽之核苷酸序列，其中該訊息肽以操作方式

連接至由該基因的該至少一部分編碼之多肽、該TCR- $\alpha$ 多肽序列、該TCR- $\beta$ 多肽序列或由該TCR基因的該至少一部分編碼之多肽。

**【第319項】**

如請求項318之核苷酸組合物，其中該訊息肽為外源性訊息肽，視情況其中該外源性訊息肽為人類生長激素訊息肽。

**【第320項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該第一連接子多肽序列及該第二連接子多肽序列包含相同連接子多肽序列。

**【第321項】**

如請求項320之核苷酸組合物，其中編碼相同連接子多肽序列之編碼該第一連接子多肽序列的該等核苷酸序列及編碼該第二連接子多肽序列之該核苷酸序列包含密碼子編碼分歧核苷酸序列，並且其中編碼該第一連接子多肽序列之該等核苷酸序列及編碼該第二連接子多肽的該核苷酸序列具有彼此相對編碼分歧之密碼子。

**【第322項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該基因的該至少一部分編碼編碼區域。

**【第323項】**

如請求項322之核苷酸組合物，其中該編碼區域選自由以下各者組成之群：調節免疫系統的因子、細胞介素、調節T細胞功能之因子、提高T細胞存活之因子、增強T細胞功能的因子及免疫檢查點抑制劑。

**【第324項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該基因

的該至少一部分編碼非編碼區域。

**【第325項】**

如請求項324之核苷酸組合物，其中該非編碼區域選自由以下各者組成之群：shRNA、siRNA、miRNA、調節免疫系統的因子、細胞介素、調節T細胞功能之因子、提高T細胞存活之因子及增強T細胞功能的因子。

**【第326項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該基因的該至少一部分包含TCR基因的至少一部分。

**【第327項】**

如請求項326之核苷酸組合物，其中該TCR基因的該至少一部分包含：

- a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；
- b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；及
- c)編碼第二連接子序列之核苷酸序列。

**【第328項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列或該TCR基因的該至少一部分選自由以下各者組成之群的至少一部分：鼠化TCR、人類化TCR、結構域調換TCR、點突變TCR、使用能夠形成二硫鍵聯的經工程改造半胱胺酸之經工程改造TCR、優化人體內表現之密碼子優化TCR、優化密碼子使用度及移除RNA不穩定性元素之序列優化TCR、該TCR基因的可變區域序列、嵌合抗原受體(CAR)及單鏈TCR。

**【第329項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該TCR- $\alpha$ 多肽序列、該TCR- $\beta$ 多肽序列或由該TCR基因的該至少一部分編碼之多肽係經工程改造，可相對於內源性TCR多肽序列，展現與第二外源性TCR多肽序列更大相聯性，視情況其中該TCR- $\alpha$ 多肽序列及該TCR- $\beta$ 多肽序列經工程改造，可相對於內源性TCR多肽序列，展現彼此有更大相聯性。

**【第330項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該等經編碼多肽序列自N端至C端之方向為連接子：TCR- $\alpha$ ：第二連接子：TCR- $\beta$ 。

**【第331項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該等經編碼多肽序列自N端至C端之方向為連接子：TCR- $\beta$ ：第二連接子：TCR- $\alpha$ 。

**【第332項】**

如前述核苷酸組合物請求項中任一項之核苷酸組合物，其中該基因的該至少一部分、編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列或編碼該TCR基因的該至少一部分之核苷酸序列包含密碼子編碼分歧核苷酸序列，並且其中該密碼子編碼分歧核苷酸序列具有相對於內源性核苷酸序列編碼分歧之密碼子。



























































































## 【發明申請專利範圍】

### 【第1項】

一種經修飾細胞，該經修飾細胞包含：

環形聚核苷酸，其包含外源性核苷酸序列，該外源性核苷酸序列包含：

a)編碼基因的至少一部分之核苷酸序列；

b)與內源性基因組標靶基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；

及

c)與該內源性基因組標靶基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，

與該內源性基因組標靶基因座中之該第一及該第二區域一致的該等核苷酸序列之取向可以便於該內源性基因組標靶基因座處之同源重組，且

其中該經修飾細胞實質上不含經病毒介導之傳遞組分。

### 【第2項】

一種包含T細胞之經修飾細胞，該T細胞包含：

a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；

b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；

c)編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列；

d)編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列；

其中編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之該核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列之該核苷酸序列及編碼該第一及該第二連接子多肽序列的該等核苷酸序列整合至內源性TCR- $\alpha$ 基因座中，

編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之該核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列之該核苷酸序列及編碼該第一及該第二連接子多肽序列的該等核苷酸序列之取向可以使得該等多肽序列中之各者能夠表現為單一多肽，其中該第二連接子多肽序列定位於該TCR- $\alpha$ 多肽序列與該TCR- $\beta$ 多肽序列之間，

該第一及該第二連接子多肽為可裂解連接子多肽，該等可裂解連接子多肽能夠在該T細胞中裂解以使得該TCR- $\alpha$ 多肽序列及該TCR- $\beta$ 多肽序列各自形成分開的多肽，其中該等分開的多肽能夠締合在一起以形成功能性TCR，

其中該經修飾細胞實質上不含經病毒介導之傳遞組分，並且其中內源性TCR- $\beta$ 基因座已瓦解。

### 【第3項】

一種包含T細胞之經修飾細胞，該T細胞包含：

- a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列之核苷酸序列；
- b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列之核苷酸序列；
- c)編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列；
- d)編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列；

其中編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之該核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列之該核苷酸序列及編碼該第一及該第二連接子多肽序列的該等核苷酸序列整合至內源性TCR基因座中，

編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列之該核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列之該核苷酸序列及編碼該第一及該第二連接子多肽序列的該等核苷酸序列之取向可以使得該等多肽序列中之各者能夠表現為單一多肽，其中該第二連接子多肽序列定位於該TCR- $\alpha$ 多肽序列與該TCR- $\beta$ 多肽序列之間，且

該第一及該第二連接子多肽為可裂解連接子多肽，該等可裂解連接子多肽能夠在該T細胞中裂解，以使得該TCR- $\alpha$ 多肽序列及該TCR- $\beta$ 多肽序列各自形成分開的多肽，其中該等分開的多肽能夠締合在一起以形成功能性TCR。

**【第4項】**

一種包含如請求項3之經修飾細胞的細胞群，其中該群中之大於10%、大於20%、大於30%、大於40%、大於50%、大於60%或大於70%包含該整合式核苷酸序列。

**【第5項】**

一種細胞群，其包含：

整合式核苷酸序列，

其中該整合式核苷酸序列包含基因的至少一部分，該整合式核苷酸序列整合於內源性基因組標靶基因座處，且該整合式核苷酸序列之取向可以使得能夠表現該基因的該至少一部分，

其中該細胞群實質上不含經病毒介導之傳遞組分，且

其中該群中的大於10%、大於20%、大於30%、大於40%、大於50%、大於60%或大於70%之該等T細胞包含該整合式核苷酸序列。

**【第6項】**

一種為有需要之個體治療之方法，其中該治療包含投與治療有效劑量的如請求項1至5中任一項之經修飾細胞或細胞群。

**【第7項】**

一種基因修飾細胞之方法，該方法包含以下步驟：

1)提供包含單一聚核苷酸之核苷酸組合物，該單一聚核苷酸包含：

- a)編碼基因的至少一部分之核苷酸序列；
  - b)與內源性基因組標靶基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；
- 及
- c)與該內源性基因組標靶基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，

與該內源性基因組標靶基因座中之該第一及該第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於該內源性基因組標靶基因座處之同源重組，

編碼該基因的該至少一部分之核苷酸序列之取向可以使得該組合物在整合至該內源性基因組標靶基因座中之後，能夠表現該基因的該至少一部分；且

- 2)提供能夠裂解該內源性基因組標靶基因座內限定核苷酸序列的核酸酶組合物；
- 3)使該細胞與該核苷酸組合物及該核酸酶組合物接觸，
- 4)藉由不同於使用病毒感染細胞之手段，將該核苷酸組合物及該核酸酶組合物傳遞至該細胞中。

### 【第8項】

一種由如請求項7之方法產生之經修飾細胞，其中該細胞包含整合式核苷酸序列，其中該整合式核苷酸序列包含與編碼該基因之該至少一部分之核苷酸序列一致的序列，該整合式核苷酸序列在該內源性基因組標靶基因座處整合，且該整合式核苷酸序列之取向可以使得能夠表現該基因的該至少一部分。

### 【第9項】

一種由如請求項7之方法產生之細胞群，其中該群中的超過10%、超過20%、超過30%、超過40%、超過50%、超過60%或超過70%之該等細胞包含整合式核苷酸序列，其中該整合式核苷酸序列包含與編碼該基因的該至少一部分之核苷酸序列一致的序列，該整合式核苷酸序列在該內源性基因組標靶基因座處整合，且該整合式核苷酸序列之取向可以使得能夠表現該基因的該至少一部分。

**【第10項】**

一種為有需要之個體治療之方法，其中該治療包含投與治療有效劑量的如請求項8或9之該等細胞或細胞群。

**【第11項】**

一種基因修飾細胞之方法，該方法包含以下步驟：

1)提供核苷酸組合物，其包含：

a)編碼基因的至少一部分之核苷酸序列；

b)與內源性基因組標靶基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；

及

c)與內源性基因組標靶基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，

其中該基因的該至少一部分之長度為100個鹼基，

所有該等核苷酸序列在單一聚核苷酸上，

與該內源性基因組標靶基因座中之該第一及該第二區域一致的該等核苷酸序列之取向可以便於該內源性基因組標靶基因座處之同源重組，

編碼該基因的該至少一部分之該核苷酸序列之取向可以使得該組合物在整合至該內源性基因組標靶基因座中之後，能夠表現該基因

的該至少一部分；且

2)提供能夠裂解該內源性基因組標靶基因座內限定核苷酸序列的CRISPR/Cas9核酸酶組合物；

3)使該細胞與該核苷酸組合物及該CRISPR/Cas9核酸酶組合物接觸，且

4)藉由電穿孔將該核苷酸組合物及該CRISPR/Cas9核酸酶組合物傳遞至該細胞中。

### 【第12項】

一種使用限定T細胞受體產生經修飾的T細胞之方法，該方法包含以下步驟：

1)提供核苷酸組合物，其包含：

a)編碼TCR- $\alpha$ 多肽序列的至少一部分之核苷酸序列；

b)編碼TCR- $\beta$ 多肽序列的至少一部分之核苷酸序列；

c)編碼第一連接子多肽序列之核苷酸序列；

d)編碼第二連接子多肽序列之核苷酸序列；

e)與內源性TCR基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；及

f)與內源性TCR基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，

其中所有該等核苷酸序列在單一聚核苷酸上，

與該內源性TCR基因座中之該第一及該第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於該內源性TCR基因座處之同源重組，

編碼該TCR- $\alpha$ 多肽序列的該至少一部分之核苷酸序列、編碼該TCR- $\beta$ 多肽序列的該至少一部分之核苷酸序列及編碼該第一及該第二連接子多肽序列的核苷酸序列之取向可以使得該等多肽序列中之

各者在將該組合物整合至該內源性TCR基因座中之後，能夠表現為單一多肽，

該第一連接子多肽序列位在該TCR- $\alpha$ 多肽序列之該至少一部分、該TCR- $\beta$ 多肽序列的該至少一部分及該第二連接子多肽序列之前，

該第二連接子多肽序列位在該TCR- $\alpha$ 多肽序列與該TCR- $\beta$ 多肽序列之間，及

該TCR- $\alpha$ 多肽序列及該TCR- $\beta$ 多肽序列各自形成分開的多肽，其中該等分開的多肽能夠締合在一起以形成功能性TCR；

2)提供能夠裂解該內源性TCR基因座內限定核苷酸序列的核酸酶組合物；

3)使該T細胞與該核苷酸組合物及該核酸酶組合物接觸，且

4)將該核苷酸組合物及該核酸酶組合物傳遞至該T細胞中。

### 【第13項】

一種用於主導在內源性基因組標靶基因座處之同源重組之核苷酸組合物，該核苷酸組合物包含環形聚核苷酸，該環形聚核苷酸包含：

a)編碼基因的至少一部分之核苷酸序列；

b)與內源性基因組標靶基因座中之第一區域一致的核苷酸序列；及

c)與內源性基因組標靶基因座中之第二區域一致的核苷酸序列，

其中所有該等核苷酸序列在單一聚核苷酸上，

與該內源性基因組標靶基因座中之該第一及該第二區域一致的核苷酸序列之取向可以便於該內源性基因組標靶基因座處之同源重組，

編碼該基因的該至少一部分之該核苷酸序列之取向可以使得該組合物在整合至該內源性基因組標靶基因座中之後，能夠表現該基因的該至少一部分。