202124718

(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 202124718 A

(43)公開日： 中華民國 110 (2021) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：109139772　(22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 11 月 13 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/63 (2006.01)*　*C07K14/705 (2006.01)*

A61K39/385 (2006.01)　*A61K48/00 (2006.01)*

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/11/14　日本　2019-206448

(71)申請人：國立大學法人廣島大學 (日本) HIROSHIMA UNIVERSITY (JP)

日本

日商組庫創世紀股份有限公司 (日本) REPERTOIRE GENESIS INCORPORATION (JP)

日本

(72)發明人：一戸辰夫 ICHINOHE, TATSUO (JP)；山本卓 YAMAMOTO, TAKASHI (JP)；佐久間哲史 SAKUMA, TETSUSHI (JP)；本庶仁子 HONJO, YASUKO (JP)；川瀨孝和 KAWASE, TAKAKAZU (JP)；西澤正俊 NISHIZAWA, MASATOSHI (JP)；鈴木隆二 SUZUKI, RYUJI (JP)；馬郡健太 MAGOORI, KENTA (JP)；佐藤寬之 SATO, HIROYUKI (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：49 項　圖式數：12　共 135 頁

(54)名稱

使用環狀 DNA 將抗原特異性受體基因導入 T 細胞基因組之方法

(57)摘要

本發明提供一種將編碼抗原受體之核酸導入目標生物之免疫細胞所包含之核酸中之規定部位的技術。

本發明之技術中，將包含編碼抗原受體之核酸之載體、及核酸酶導入至免疫細胞，核酸酶切斷載體及免疫細胞之基因組序列，載體可以如下方式構成：若被核酸酶切斷，則會產生編碼抗原受體之序列，該序列會藉由微同源介導末端結合(MMEJ)被導入至免疫細胞之基因組序列之被核酸酶切斷之部位。

202124718

【發明摘要】

【中文發明名稱】

使用環狀DNA將抗原特異性受體基因導入T細胞基因組之方法

【中文】

本發明提供一種將編碼抗原受體之核酸導入目標生物之免疫細胞所包含之核酸中之規定部位的技術。

本發明之技術中，將包含編碼抗原受體之核酸之載體、及核酸酶導入至免疫細胞，核酸酶切斷載體及免疫細胞之基因組序列，載體可以如下方式構成：若被核酸酶切斷，則會產生編碼抗原受體之序列，該序列會藉由微同源介導末端結合(MMEJ)被導入至免疫細胞之基因組序列之被核酸酶切斷之部位。

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

使用環狀DNA將抗原特異性受體基因導入T細胞基因組之方法

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種免疫細胞之生物工程學之操作。尤其是關於一種將所需抗原受體導入免疫細胞之技術。

【先前技術】

【0002】 目前，作為對於惡性腫瘤之新穎治療方法，導入有嵌合型抗原受體(CAR)之T細胞(CAR-T)或導入有T細胞受體之T細胞(TCR-T)之開發正急速地進展，但在製作上述T細胞時使用有病毒載體或轉位子載體。該等技術無法特定出供體基因插入區域，安全性之方面上尚有顧慮。另一方面，未確立利用環狀DNA載體來製作針對惡性腫瘤之基因改變T細胞之技術，藉由先前之方法導入環狀雙鏈DNA載體時細胞之存活率明顯低。

【發明內容】

[解決問題之技術手段]

【0003】 於本發明中，提供一種使用環狀DNA載體，與核酸酶併用，而能夠將任意之抗原受體(例如，人類T細胞受體(TCR)α鏈及β鏈基因或嵌合抗原受體(CAR))插入免疫細胞之基因組上之所需區域的技術。

又，提供一種使用上述技術來製作插入有所需抗原特異性基因之醫療用基因組編輯T細胞的技術。

【0004】 又，於本發明中，可提供一種利用人工核酸酶切斷T細胞之基因組上之靶區域，於DNA修復時準確地插入切斷序列間，而可達成

以下作用的環狀雙鏈DNA載體：1)能夠使導入有載體之細胞持續地表現包含TCRα鏈及TCRβ鏈之所需TCR複合體或嵌合抗原受體(CAR)，且2)僅藉由利用特定限制酶進行加工，能夠置換為需要表現之任意之TCRα鏈、TCRβ鏈序列或嵌合抗原受體(CAR)。

【0005】 本發明中，可提供一種將編碼抗原受體之核酸導入目標生物之免疫細胞所包含之核酸中之規定部位的方法，其包括如下步驟：將包含編碼抗原受體之核酸之載體、與核酸酶導入該免疫細胞。核酸酶可切斷載體及免疫細胞之基因組序列。並且，載體可以如下方式構成，即若被核酸酶切斷，則會產生編碼抗原受體之序列，該序列會藉由微同源介導末端結合(MMEJ)被導入免疫細胞之基因組序列之被核酸酶切斷之部位。於本發明之一個態樣中，可提供一種能夠藉由MMEJ來實現基因導入之載體。於本發明之一個態樣中，可提供一種適合於該技術中使用之核酸酶。

【0006】 作為本發明之實施形態，例如可列舉以下之項目。

(項目1)一種將編碼抗原受體之核酸導入目標生物之免疫細胞所包含之核酸中之規定部位的方法，其包括

將包含編碼該抗原受體之核酸之載體、及核酸酶導入該免疫細胞之步驟，

該核酸酶切斷該載體及該免疫細胞之基因組序列，

該載體係以如下方式構成，即若藉由該核酸酶進行切斷，則會產生編碼該抗原受體之序列，該序列會藉由微同源介導末端結合(MMEJ)而導入該免疫細胞之基因組序列之被該核酸酶切斷之部位。

(項目2)如上述項目中記載之方法，其中上述核酸酶切斷上述免疫細胞之內源性抗原受體之基因座。

(項目3)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述免疫細胞之內源性抗原受體基因之剔除與上述抗原受體之導入同時發生。

(項目4)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述內源性抗原受體基因為TRA基因。

(項目5)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述內源性抗原受體基因為TRB基因。

(項目6)如上述項目中任一項記載之方法，其中編碼上述抗原受體之核酸編碼上述抗原受體之α鏈及β鏈。

(項目7)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述導入之步驟係使用電穿孔法來進行。

(項目8)如上述項目中任一項記載之方法，其中免疫細胞經CD3/CD28珠粒刺激後，於約48～約72小時之間進行上述導入之步驟。

(項目9)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述抗原受體係選自由T細胞受體(TCR)、B細胞受體(BCR)、及嵌合抗原受體(CAR)所組成之群。

(項目10)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述核酸酶於TRA基因之恆定部內進行切斷。

(項目11)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述核酸酶於TRB基因之恆定部內進行切斷。

(項目12)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述核酸酶為Cas9核酸酶。

(項目13)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述核酸酶為同源二聚體型核酸酶，上述載體為環狀載體。

(項目14)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述核酸酶為TALEN。

(項目15)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述核酸酶為鉑TALEN。

(項目16)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述核酸酶包含DNA結合域，

該DNA結合域自N末端側起連續地包含複數個DNA結合模組，自N末端起第4n－3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n－2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n－1個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n－3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自N末端起第4n－2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自N末端起第4n－1個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、及自N末端起第4n個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合互不相同，

此處，n為1～10之自然數，x為1～40之自然數，y為1～40之自然數，x與y為不同之自然數。

(項目17)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述載體藉由上述核

酸酶會產生於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、上述所需核酸、及包含第2核苷酸序列之區域的核酸片段，

此處，上述細胞所包含之核酸於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、上述規定部位、及包含第2核苷酸序列之區域，

上述細胞所包含之核酸中之第1核苷酸序列與上述載體中之第1核苷酸序列藉由微同源介導性結合而連結，上述細胞所包含之核酸中之第2核苷酸序列與上述載體中之第2核苷酸序列藉由微同源介導性結合而連結，藉此插入上述所需核酸。

(項目18)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述載體包括包含編碼上述抗原受體之核酸之複數個導入匣。

(項目19)一種載體，其係用以與核酸酶組合，將編碼抗原受體之核酸插入細胞所包含之核酸中之規定部位者，且包括

導入匣，其包含編碼該抗原受體之核酸；及

微同源序列，其用以產生用以將編碼該抗原受體之序列導入該細胞之基因組序列之被該核酸酶切斷之部位的微同源介導末端結合(MMEJ)，

上述載體藉由上述核酸酶會產生於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、編碼上述抗原受體之核酸、及包含第2核苷酸序列之區域的核酸片段，

上述細胞所包含之核酸中之第1核苷酸序列與上述載體中之第1核苷酸序列藉由微同源介導性結合而連結，上述細胞所包含之核酸中之第2核苷酸序列與上述載體中之第2核苷酸序列藉由微同源介導性結合而連結，藉此插入編碼上述抗原受體之序列。

(項目19A)一種載體，其係用以與核酸酶組合，將所需核酸插入細胞

所包含之核酸中之規定部位者，

此處，上述細胞所包含之核酸於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、上述規定部位、及包含第2核苷酸序列之區域，

上述核酸酶係對上述細胞所包含之上述規定部位進行特異性切斷者，

上述載體藉由上述核酸酶會產生於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、上述所需核酸、及包含第2核苷酸序列之區域的核酸片段，

上述細胞所包含之核酸中之第1核苷酸序列與上述載體中之第1核苷酸序列藉由微同源介導性結合而連結，上述細胞所包含之核酸中之第2核苷酸序列與上述載體中之第2核苷酸序列藉由微同源介導性結合而連結，藉此插入上述所需核酸，

上述所需核酸包含編碼抗原受體之核酸。

(項目19B)如上述項目中記載之載體，其具備上述項目中之一項或複數項所記載之特徵。

(項目20)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述規定部位存在於上述細胞之內源性抗原受體基因中，

編碼上述抗原受體之核酸在與上述細胞所包含之上述核酸酶之靶部位對應的序列中包含同義置換。

(項目21)如上述項目中任一項記載之載體，其中編碼上述抗原受體之核酸包含可動作地連結於上述抗原受體之EF-1α啟動子。

(項目22)如上述項目中任一項記載之載體，其中編碼上述抗原受體之核酸包含用以於該抗原受體之上游提高轉譯效率的前導序列。

(項目23)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述前導序列為β血球蛋白基因之5'-UTR序列。

(項目24)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述前導序列為爪蟾血球蛋白(Xenopus globin)5'-UTR。

(項目25)如上述項目中任一項記載之載體，其中編碼上述抗原受體之核酸編碼上述抗原受體之α鏈及β鏈。

(項目26)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述抗原受體係選自由T細胞受體(TCR)、B細胞受體(BCR)、及嵌合抗原受體(CAR)所組成之群。

(項目27)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述所需部位處於TRA基因之恆定部內。

(項目28)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述所需部位處於TRB基因之恆定部內。

(項目29)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述核酸酶為Cas9核酸酶。

(項目30)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述核酸酶為同源二聚體型核酸酶，上述載體為環狀載體。

(項目31)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述核酸酶為TALEN。

(項目32)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述核酸酶為鉑TALEN。

(項目33)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述核酸酶包含DNA結合域，

該DNA結合域自N末端側連續地包含複數個DNA結合模組，自N末端起第4n－3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n－2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n－1個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n－3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自N末端起第4n－2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自N末端起第4n－1個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、及自N末端起第4n個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合互不相同，

此處，n為1～10之自然數，x為1～40之自然數，y為1～40之自然數，x與y為不同之自然數。

(項目34)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述載體於5'末端至3'末端之方向上依序包括：包含5'側之gRNA靶序列或由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列、及第1核苷酸序列的區域；上述所需核酸；包含第2核苷酸序列、及3'側之gRNA靶序列或由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列的區域。

(項目35)如上述項目中任一項記載之載體，其中第1核苷酸序列為3個鹼基長度～10個鹼基長度，及/或第2核苷酸序列為3個鹼基長度～10個

鹼基長度。

(項目36)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述載體包括包含編碼上述抗原受體之核酸之複數個導入匣。

(項目37)一種載體，其包含：

序列編號4之核酸及序列編號5之核酸、序列編號6之核酸及序列編號7之核酸、或序列編號8之核酸及序列編號9之核酸；

序列編號10之核酸及序列編號11之核酸、序列編號12之核酸及序列編號13之核酸、或序列編號14之核酸及序列編號15之核酸；及

包含編碼抗原受體之核酸之導入匣。

(項目37A)如上述項目中記載之載體，其具備上述項目中之一項或複數項所記載之特徵。

(項目38)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述導入匣包含編碼抗原受體之α鏈的序列及編碼抗原受體之β鏈的序列。

(項目39)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述導入匣包含polyA附加序列、前導序列、及/或1個或複數個啟動子序列。

(項目40)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述導入匣於編碼上述抗原受體之α鏈的序列及編碼上述抗原受體之β鏈的序列之間包含P2A序列。

(項目41)如上述項目中任一項記載之載體，其中上述載體包含複數個導入匣。

(項目42)一種套組，其係用以將編碼抗原受體之核酸插入細胞所包含之核酸中之規定部位者，且包含如上述項目中任一項記載之載體、及用以表現上述核酸酶之載體。

(項目42A)如上述項目中記載之套組，其具備上述項目中之一項或複數項所記載之特徵。

(項目43)一種將編碼抗原受體之核酸於活體外或活體內插入免疫細胞所包含之核酸中之規定部位的方法(一實施方式中，於非人類生物之活體內插入之方法)，其包括如下步驟：將如上述項目中任一項記載之載體、及用以表現上述核酸酶之載體導入免疫細胞。

(項目43A)如上述項目中記載之方法，其具備上述項目中之一項或複數項所記載之特徵。

(項目44)一種製造表現抗原受體之免疫細胞之方法，其包括如下步驟：藉由如上述項目中任一項記載之方法，將編碼上述抗原受體之核酸插入上述免疫細胞所包含之核酸中之規定部位。

(項目45)一種對受驗者實施免疫療法之方法，其包括如下步驟：

(A)自受驗者取得血液；

(B)將該血液之單核細胞(PMBC)之TRB剔除；

(C)將CD3陰性之該單核細胞進行濃縮；

(D)將該單核細胞之TRA剔除，將抗原受體導入(例如，T細胞受體(TCR)、B細胞受體(BCR)、及嵌合抗原受體(CAR))；

(E)將CD3陽性之該單核細胞進行濃縮；及

(G)視需要對該單核細胞進行擴大培養。

(項目46)一種製造用於免疫療法之細胞之方法，其包括如下步驟：

(A)將自受驗者取得之血液之單核細胞(PMBC)之TRB剔除；

(B)將CD3陰性之該單核細胞進行濃縮；

(C)將該單核細胞之TRA剔除，將抗原受體導入；

(D)將CD3陽性之該單核細胞進行濃縮；及

(E)視需要對該單核細胞進行擴大培養。

(項目46A)如上述項目中記載之方法，其具備上述項目中之一項或複數項所記載之特徵。

(項目47)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述TRA及/或TRB之切斷係使用鉑TALEN(Platinum-transcription activator-like effector nuclease，鉑-轉錄活化因子樣效應子核酸酶)來進行。

(項目48)如上述項目中任一項記載之方法，其中上述免疫療法包括TCR-T療法或CAR-T療法。

(項目49)一種組合物，其包含用以於如上述項目中任一項記載之方法中使用之鉑TALEN。

(項目49A)如上述項目中記載之組合物，其具備上述項目中之一項或複數項所記載之特徵。

(項目50)如上述項目中記載之方法、載體、或組合物，其中上述細胞包含人類細胞。

【0007】 於本發明中，關於上述1個或複數個特徵，意指除已明示之組合以外，還可進一步組合來提供。關於本發明之進一步實施方式及優點，只要視需要閱讀以下之詳細說明來理解，則會被業者所理解。

[發明之效果]

【0008】 藉由本發明之技術，能夠不使用病毒載體來改變免疫細胞，尤其是能夠導入所需之抗原受體。由於無需用以穩定地生產病毒之主細胞，故能夠減輕細胞加工費用。又，本發明之技術可將導入基因導入基因組上之準確部位。例如，於以源自父親之對偶基因與源自母親之對偶基

因之相同序列為目標之情形時，可將TCR基因導入所需之基因組區域分別為每個細胞1個或2個拷貝，從而安全性飛躍性地提高。又，藉由本發明之技術導入之抗原受體可長期穩定地表現。

【圖式簡單說明】

【0009】

圖1係表示將NY-ESO-1抗原特異性TCR導入Jurkat細胞(人類T細胞白血病株)之結果的圖。

圖2係表示藉由本發明之方法導入之所需TCR之穩定表現的圖。示出基因導入後1個月時點之各細胞之TCR之表現狀態。

圖3係表示添加有Vβ鏈組庫分析用抗體混合物時導入有1G4 TCR之β null Jurkat細胞、與Jurkat細胞(對照)之表現TCR的分析結果。根據圖3可明確理解到，藉由本發明所製作之表現1G4之Jurkat細胞使基因組編輯前所內含之Vβ8鏈之表現消失，表現出與1G4-TCR一致之Vβ13.1鏈。

圖4係表示藉由本發明之方法導入有1G4 TCR之β null Jurkat細胞中TCR Vβ組庫分析之結果的圖。顯示：藉由本發明之方法導入有1G4 TCR之β null Jurkat細胞未表現出除與1G4-TCR一致之Vβ13.1鏈以外之V鏈，即於基因組編輯後未表現源自非再構建對偶基因之新穎Vβ鏈。

圖5係表示導入TCR序列向基因組之在靶(On-target)插入之確認結果的圖。

圖6係表示使用本發明之方法之免疫療法之過程之例的圖。

圖7係表示本發明之載體之構成之例的圖。

圖8係表示於將DNA插入本發明之載體之情形時，合成一個來插入之情形、及分2個來插入之情形之例的模式圖。

圖9係表示嵌合抗原受體(CAR)基因之插入DNA之設計例的圖。

圖10係表示β null Jurkat細胞中1G4導入之先前型PITCh載體與改良型PITCh載體之比較結果的圖。

圖11係表示使用改良型PITCh載體之藉由電穿孔法將1G4導入β null Jurkat細胞之確認結果的圖。

圖12係表示使用人類T細胞之情形時之1G4導入結果之圖。

【實施方式】

【0010】 以下，揭示本發明之最佳方式並對其進行說明。於本說明書全文範圍內，只要無特別說明，單數形式之表達應理解為亦包括其複數形式之概念在內。因此，單數形式之冠詞(例如英語中之「a」、「an」、「the」等)只要無特別說明，則應理解為亦包括其複數形式之概念在內。又，本說明書中所使用之用語只要無特別說明，則應理解為可以該領域中通常採用之含義來使用。因此，只要未另作定義，本說明書中所使用之所有專業用語及科學技術用語具有與本發明所屬領域之業者一般所理解相同之含義。於相矛盾之情形時，本說明書(包括定義)優先。

【0011】 (1.定義及基本技術之說明)

以下，對本說明書中特別使用之用語之定義及/或基本技術內容進行適宜說明。

【0012】 本說明書中，「抗原受體」係指與目標抗原特異性地結合，而向表現該受體之細胞內傳遞訊號之任意分子。本發明中，抗原受體可為天然者，亦可為人造之分子，例如除T細胞受體(TCR)、B細胞受體(BCR)以外，還包括嵌合抗原受體(CAR)。

【0013】 本說明書中「T細胞受體(TCR)」係指存在於T細胞之受

體。TCR係包含2條TCR多肽鏈之異源二聚物受體分子，存在通常之T細胞所表現之αβ型TCR與具有特殊功能之γδ型TCR。α及β鏈TCR分子會與複數個CD3分子(CD3ζ鏈、CD3ε鏈、CD3γ鏈、CD3δ鏈)形成複合體，傳遞抗原識別後之細胞內訊號，而引發各種免疫應答。伴隨病毒感染，於細胞內增殖之病毒抗原或源自癌細胞之癌抗原等內源性抗原於MHC I類分子上以抗原肽之形式呈現。又，源自外來微生物之抗原會因內噬作用而被引入抗原呈現細胞，經培養後於MHC II類分子上呈現。該等抗原分別由CD8＋T細胞或CD4＋T細胞所表現之TCR所識別。亦已知於經由TCR分子之刺激中，CD28、ICOS、OX40分子等共刺激分子較為重要。關於在本說明書中視為一主要目的之αβ型TCR，認為α及β之各基因產物會藉由獨特之組合而表現出特異性。

【0014】 本說明書中，「嵌合抗原受體(CAR)」係指將抗原特異性移植至免疫系細胞(例如初始T細胞、中央記憶性T細胞、效應記憶性T細胞、或其等之組合等T細胞、NK細胞、巨噬細胞等)之改變受體。CAR例如可包含：抗原特異性靶向區域、細胞外域、跨膜域、共刺激域、及/或細胞內訊號傳遞域。又，可包含使用複數個(大多為2種)抗原特異性靶向區域者(雙特異性CAR)。

【0015】 本說明書中，「微同源介導末端結合(MMEJ)」係指如下機制：識別真核生物之細胞中DNA雙鏈被切斷時5～30個鹼基對程度之較短相同序列(微同源)並進行修復。

【0016】 本說明書中，「免疫細胞」可列舉淋巴細胞、巨噬細胞、樹狀細胞等，意指可能損傷靶細胞之全部效應細胞。例如包含CD8+T細胞、CD4+T細胞、NK細胞、γδT細胞、NKT細胞、B細胞、及骨髓細胞

等。該等細胞還包含基因改變細胞，例如包含將病毒或癌細胞特異性CD8+T細胞製成iPS細胞者、或者於初始CD8+T細胞中組入抗原受體(Tcell antigen receptor：TCR)基因而成者、或組入識別癌細胞表面表現分子之嵌合抗體(嵌合型抗原受體chimericantigen receptor：CAR)基因而成者。

【0017】(2.PITCh載體)

於本發明之一個態樣中，可提供一種載體，其用以與核酸酶組合，將所需核酸插入細胞所包含之核酸中之規定部位。所需核酸可包含編碼抗原受體之核酸。此處，細胞所包含之核酸於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、上述規定部位、及包含第2核苷酸序列之區域，核酸酶可為對細胞所包含之規定部位進行特異性切斷者。載體可以如下方式構成：藉由核酸酶可產生於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、所需核酸、及包含第2核苷酸序列之區域的核酸片段，並且，細胞所包含之核酸中之第1核苷酸序列與載體中之第1核苷酸序列藉由微同源介導性結合而連結，細胞所包含之核酸中之第2核苷酸序列與載體中之第2核苷酸序列藉由微同源介導性結合而連結，藉此插入所需核酸。此種能夠實現與核酸酶組合並經由MMEJ導入所需核酸之載體例如記載於日本專利5900942號說明書中，其內容之整體於本說明書作為參考被引用。本發明之載體例如可為具有如以下所記載之特徵者。

【0018】本發明中所使用之載體可於5'末端至3'末端之方向上依序包括：包含第1核苷酸序列之區域、作為插入目標之所需核酸、及包含第2核苷酸序列之區域。此處，該載體可與如下核酸酶組合使用，該核酸酶對夾著以插入核酸為目的之規定部位之包括包含第1核苷酸序列之區域與包

含第2核苷酸序列之細胞內之核酸之區域的部分進行特異性切斷。將上述載體導入細胞，使上述核酸酶作用於細胞，而於細胞內之核酸中之上述規定部位進行切斷，同時亦使上述核酸酶作用於載體，藉此可產生於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、上述所需核酸、及包含第2核苷酸序列之區域的核酸片段。藉此，於細胞內，上述細胞內之核酸中之第1核苷酸序列與上述載體中之第1核苷酸序列可藉由微同源介導性結合(MMEJ)而連結，上述細胞內之核酸中之第2核苷酸序列與上述載體中之第2核苷酸序列可藉由MMEJ而連結。藉此，可將所需核酸準確地插入細胞之核酸之規定部位。插入能夠對抗原受體基因序列之類之達到數kb以上之相對長鏈的核酸來進行。核酸酶可對插入前之細胞內之核酸所包含之包括包含第1核苷酸序列之區域、及包含第2核苷酸序列之區域的部分進行特異性切斷，但連結後之核酸可能因上述所需核酸之插入而失去上述部分之一部分。藉此，不會發生由存在於細胞內之核酸酶導致之再次斷裂，得到穩定地保持，而可高頻度地插入所需核酸。

【0019】 該載體及利用其之方法係藉由於較多細胞中發揮功能之微同源介導性末端連接來進行連結者，因此即便對於同源重組效率較低之發育階段之細胞等，亦可準確且高頻度地插入所需核酸，可應用之細胞之種類之範圍較廣。又，關於該載體及利用其之方法，可同時進行用以導入核酸酶之載體、及用以插入核酸之載體對於細胞之插入，操作較為簡單。進而，該載體及利用其之方法藉由微同源介導性末端連接所導致之細胞內之核酸之局部變化，可防止插入後之核酸之再次斷裂，因此亦可使用活性較高之同源二聚體型結構域作為核酸酶所包含之DNA切斷域，材料之選擇範圍較廣。

【0020】 本發明之載體係用以藉由核酸酶，將所需核酸插入細胞所包含之核酸中之規定部位者，此處，上述細胞所包含之核酸於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、上述規定部位、及包含第2核苷酸序列之區域，上述核酸酶係對於上述細胞所包含之包括上述包含第1核苷酸序列之區域、及上述包含第2核苷酸序列之區域的部分進行特異性切斷者，上述載體可於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、上述所需核酸、及包含第2核苷酸序列之區域。

【0021】 又，本發明之載體係用以藉由包含第一DNA結合域及第二DNA結合域之核酸酶，將所需核酸插入細胞所包含之核酸中之規定部位者，此處，上述細胞所包含之核酸於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、上述規定部位、及包含第2核苷酸序列之區域，於上述細胞所包含之核酸中，包含第1核苷酸序列之區域、上述規定部位、及包含第2核苷酸序列之區域分別處在包含由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域、與包含由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域之間，此處，上述載體於5'末端至3'末端之方向上依序包括：包含第1核苷酸序列之區域、上述所需核酸、及包含第2核苷酸序列之區域，於上述載體中，包含第1核苷酸序列之區域、及包含第2核苷酸序列之區域分別處在包含由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域、與包含由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域之間，上述載體可藉由上述核酸酶而產生於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、上述所需核酸、及包含第2核苷酸序列之區域的核酸片段。

【0022】 又，於本發明之載體中，上述細胞所包含之核酸中之第1核苷酸序列與上述載體中之第1核苷酸序列藉由微同源介導性結合

(MMEJ)而連結，上述細胞所包含之核酸中之第2核苷酸序列與上述載體中之第2核苷酸序列藉由MMEJ而連結，藉此可插入上述所需核酸。

【0023】 於本發明中，核酸酶可為同源二聚體型核酸酶，載體可為環狀載體。

【0024】 於本發明中，可提供一種套組，其係用以將所需核酸插入細胞所包含之核酸中之規定部位者，且包含本發明之載體、及用以表現核酸酶之載體。於本發明中，可提供一種將所需核酸插入細胞所包含之核酸中之規定部位之方法，其包括如下步驟：將本發明之載體、及用以表現核酸酶之載體導入細胞。

【0025】 若使用本發明之載體，則無需製作長鏈之載體等複雜之步驟，可不依賴於同源重組效率，於不會發生框移之情況下將所需核酸準確且簡單地插入人類免疫系細胞，亦可插入達到數kb以上之相對長鏈之核酸。又，使用本發明之載體之核酸之插入方法可與具有高核酸酶活性之同源二聚體型包含DNA切斷域之核酸酶組合來使用。或者，使用本發明之載體之核酸之插入方法亦可與CRISPR/Cas系統等RNA誘導型核酸酶組合來使用。

【0026】 供插入本發明之載體之細胞包含如下核酸，該核酸於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、以插入核酸為目標之規定部位、及包含第2核苷酸序列之區域。第1核苷酸序列、及第2核苷酸序列係用以表示與插入之載體所包含之序列之關係的簡單表述。第1核苷酸序列、及第2核苷酸序列可與上述規定部位直接鄰接，亦可隔著包含特定鹼基序列之區域鄰接。於隔著包含特定鹼基序列之區域鄰接之情形時，該特定之鹼基序列較佳為1個鹼基長度～7個鹼基長度，更佳為1個鹼

基長度～3個鹼基長度。第1核苷酸序列較佳為3個鹼基長度～10個鹼基長度，更佳為4個鹼基長度～8個鹼基長度，進而較佳為5個鹼基長度～7個鹼基長度。又，第2核苷酸序列較佳為3個鹼基長度～10個鹼基長度，更佳為4個鹼基長度～8個鹼基長度，進而較佳為5個鹼基長度～7個鹼基長度。

【0027】本發明之載體可為用以藉由核酸酶，將所望核酸插入細胞所包含之核酸中之規定部位者。本發明中，上述核酸酶可為對上述細胞所包含之包括上述包含第1核苷酸序列之區域、及上述包含第2核苷酸序列之區域的部分進行特異性切斷者。作為此種核酸酶，可列舉：包含第一DNA結合域及第二DNA結合域之核酸酶。作為進行特異性切斷之其他核酸酶，可列舉基於CRISPR/Cas系統之核酸酶等RNA誘導型核酸酶。於CRISPR/Cas系統中，由Cas9核酸酶引起之雙鏈斷裂必需稱為PAM之部分。關於Cas9核酸酶，例如可列舉：源自釀膿鏈球菌之SpCas9、源自嗜熱鏈球菌之StCas9。SpCas9之PAM係「5'-NGG-3'」序列(N為任意之核苷酸)，發生雙鏈斷裂之部位位於PAM上游3個鹼基處(5'末端側)。CRISPR/Cas系統中之嚮導RNA(gRNA)會識別位於發生雙鏈斷裂之部位之5'側的鹼基序列。並且，CRISPR/Cas系統中發生雙鏈斷裂之部位係與細胞所包含之核酸中以插入所需核酸為目的之上述規定部位對應。於該規定部位之兩端存在包含第1核苷酸序列之區域、及包含第2核苷酸序列之區域。因此，使用會識別細胞中之核酸所包含之位於較PAM更靠5'末端側之鹼基序列的gRNA之CRISPR/Cas系統可對包括包含第1核苷酸序列之區域及包含第2核苷酸序列之區域的部分進行特異性切斷。

【0028】本發明之載體可於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含

第1核苷酸序列之區域、以插入細胞為目的之所需核酸、及包含第2核苷酸序列之區域。載體所包含之包含第1核苷酸序列之區域可與上述細胞所包含之核酸中之包含第1核苷酸序列之區域相同。又，載體所包含之包含第2核苷酸序列之區域可與上述細胞所包含之核酸中之包含第2核苷酸序列之區域相同。

【0029】 本發明之載體可較佳地為環狀載體。又，於載體為環狀載體之情形時，本發明之載體所包含之第2核苷酸序列之3'末端、與第1核苷酸序列之5'末端較佳為鄰接或直接連結。於本發明之載體為環狀載體且第2核苷酸序列與第1核苷酸序列鄰接之情形時，第2核苷酸序列之3'末端、與第1核苷酸序列之5'末端由包含較佳為1～7個鹼基長度、更佳為1～5個鹼基長度、進而較佳為1～3個鹼基長度之鹼基序列的區域隔開。

【0030】 於以利用本發明之載體進行插入為目的之細胞所包含之核酸中，包含第1核苷酸序列之區域可處在包含由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域、與包含由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域之間。又，包含第2核苷酸序列之區域可處在包含由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域、與包含由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域之間。又，上述規定部位可處在包含由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域、與包含由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域之間。於該核酸中，包圍包含第1核苷酸序列之區域之由DNA結合域所識別之2個核苷酸序列的組合亦可與包圍包含第2核苷酸序列之區域之由DNA結合域所識別之2個核苷酸序列的組合不同。於該情形時，用以切斷包含第1核苷酸序列之區域之周邊的核酸酶、與用以切斷包含第2核苷酸序列之區域之周邊的核酸酶可使用不同者。於上述細胞所包含之核酸中，包

含由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域、與包含由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域由包含較佳為5～40個鹼基長度之核苷酸序列、更佳為10～30個鹼基長度之核苷酸序列、進而較佳為12～20個鹼基長度之核苷酸序列的區域隔開。隔開兩者之區域之鹼基長度可與第1核苷酸序列之鹼基長度、及第2核苷酸序列之鹼基長度之合計鹼基長度相同，亦可不同。例如，於上述細胞所包含之核酸中，若滿足如下條件，即第1核苷酸序列之3'末端與第2核苷酸序列之5'末端直接接觸、由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列與第1核苷酸序列之間無重複、以及第2核苷酸序列與由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列之間無重複，則上述隔開兩者之區域之鹼基長度與第1核苷酸序列之鹼基長度、及第2核苷酸序列之鹼基長度之合計鹼基長度相同。然而，若未滿足選自上述條件中之1項或複數項，則上述隔開兩者之區域之鹼基長度與第1核苷酸序列之鹼基長度、及第2核苷酸序列之鹼基長度之合計鹼基長度不同。於細胞所包含之核酸中，包含第1核苷酸序列之區域可與包含由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域局部地重複。又，於細胞所包含之核酸中，包含第2核苷酸序列之區域亦可與包含由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域局部地重複。於存在局部重複之情形時，重複之部分包含較佳為1～6個鹼基長度、更佳為1～5個鹼基長度、進而較佳為2～4個鹼基長度之核苷酸序列。於存在局部重複之情形時，藉由利用微同源介導性末端連接進行連結而隔開由DNA結合域所識別之2個區域且包括包含第1核苷酸序列之區域、及包含第2核苷酸序列之區域的部分之長度更大幅地減少，因此進一步不易發生連結後之再次斷裂，所插入之核酸得以更穩定地保持，故而較佳。

【0031】於本發明之載體中，包含第1核苷酸序列之區域、及包含第2核苷酸序列之區域分別處在包含由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域、與包含由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域之間。於該載體中，包圍包含第1核苷酸序列之區域之由DNA結合域所識別之2個核苷酸序列的組合亦可與包圍包含第2核苷酸序列之區域之由DNA結合域所識別之2個核苷酸序列的組合不同。於該情形時，用以切斷包含第1核苷酸序列之區域之周邊的核酸酶、與用以切斷包含第2核苷酸序列之區域之周邊的核酸酶可使用不同者。於載體中，包含由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域與包含由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域進行對比，可存在於5'末端側，亦可存在於3'末端側。然而，於載體中，位於第1核酸酶序列之3'末端側且由第一DNA結合域或第二DNA結合域所識別之核苷酸序列較佳為與細胞所包含之核酸中位於第2核苷酸序列之3'末端側且藉由第一DNA結合域或第二DNA結合域來識別之序列不同。又，關於在載體中位於第2核酸酶序列之5'末端側且由第一DNA結合域或第二DNA結合域所識別之核苷酸序列，較佳為與細胞所包含之核酸中位於第1核苷酸序列之5'末端側且由第一DNA結合域或第二DNA結合域所識別之序列不同。該等情形時，藉由將異源二聚物型包含DNA切斷域之核酸酶組合使用，可更加減少於插入所需核酸後所發生之再次斷裂之頻度。又，載體可為藉由包含第一DNA結合域及第二DNA結合域之1個或複數個核酸酶而產生1處切斷部位者，亦可為產生2處以上之切斷部位者。作為會產生2處切斷部位之載體，例如可列舉如下載體，該載體於5'末端至3'末端之方向上依序包括：包含由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域、包含第1核苷酸序列之區域、包含由第二DNA結合域所識別之核苷

酸序列之區域、以插入細胞為目的之所需核酸、包含由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域、包含第2核苷酸序列之區域、及包含由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域。於使用會產生2處切斷部位之載體之情形時，可藉由利用核酸酶進行切斷而將載體所包含之多餘核酸去除，因此可更安全地取得不包含多餘核酸之所需細胞。

【0032】於本發明之載體中，將包含由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域、與包含由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域隔開，且包括包含第1核苷酸序列之區域、或包含第2核苷酸序列之區域的區域包含較佳為5～40個鹼基長度、更佳為10～30個鹼基長度、進而較佳為12～20個鹼基長度之核苷酸序列。於將包含由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域、與包含由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域隔開的區域包含第1核苷酸序列、及第2核苷酸序列兩者之情形時，上述隔開之區域之鹼基長度與第1核苷酸序列之鹼基長度、及第2核苷酸序列之鹼基長度的合計相同或大致相同。如上所述，第1核苷酸序列較佳為3個鹼基長度～10個鹼基長度，更佳為4個鹼基長度～8個鹼基長度，進而較佳為5個鹼基長度～7個鹼基長度。又，如上所述，第2核苷酸序列較佳為3個鹼基長度～10個鹼基長度，更佳為4個鹼基長度～8個鹼基長度，進而較佳為5個鹼基長度～7個鹼基長度。於包含第1核苷酸序列或第2核苷酸序列之區域與包含由DNA結合域所識別之核苷酸序列之區域存在重複之情形、包含第1核苷酸序列之區域與包含第2核苷酸序列之區域存在重複之情形、或包含第1核苷酸序列之區域與包含第2核苷酸序列之區域未直接連接之情形時，上述隔開之區域之鹼基長度不會與第1核苷酸序列之鹼基長度及第2核苷酸序列之鹼基長度的合計鹼基長度相同，止於大致相同。

【0033】 於本發明之載體中，例如，上述細胞所包含之核酸中之第1核苷酸序列與上述載體中之第1核苷酸序列藉由微同源介導性結合(MMEJ)而連結，上述細胞所包含之核酸中之第2核苷酸序列與上述載體中之第2核苷酸序列藉由MMEJ而連結，藉此可將上述所需核酸插入上述細胞所包含之核酸中之規定部位。

【0034】 所望核酸可較佳地為編碼抗原受體者。抗原受體可選自由T細胞受體(TCR)、B細胞受體(BCR)、及嵌合抗原受體(CAR)所組成之群。抗原受體可為包含2個以上之鏈之多聚體。所望核酸可為編碼抗原受體之複數個鏈(例如，α鏈及β鏈)者。

【0035】 於本發明之載體中，包含第1核苷酸序列之區域與上述所需核酸可直接地鄰接。又，包含上述所需核酸與第2核苷酸序列之區域可直接地鄰接。又，於上述所需核酸包含基因等功能性因子之情形時，該載體所包含之第1核苷酸序列、及第2核苷酸序列亦可為編碼上述功能性因子之一部分者。

【0036】 本發明之載體可為環狀載體，亦可為直鏈狀載體。較佳為藉由本發明提供之載體為環狀載體。

【0037】 (2-1.用以導入抗原受體之PITCh載體)

於本發明中，可使用視需要具備上述特徵之載體，該載體以用以導入抗原受體之方式構成。此種載體可具備以下說明之1個或複數個特徵。

【0038】 載體可包含編碼抗原受體之核酸，但此處，與該載體組合使用之核酸酶可為切斷免疫細胞之內源性抗原受體之基因座者。免疫細胞之內源性抗原受體基因之剔除、與抗原受體之導入可能同時發生。內源性抗原受體基因可為TRA基因或TRB基因。TRB基因之恆定部存在4處，因

此進行導入直至4個拷貝為止，藉此有可能增加TCR之表現量。編碼抗原受體之核酸可共同編碼抗原受體之α鏈及β鏈。

【0039】同義置換：於規定部位存在於細胞之內源性抗原受體基因中之情形時，編碼抗原受體之核酸在與該細胞所包含之核酸酶之靶部位對應的序列中可包含同義置換。同義置換可於維持表現之抗原受體之基本結構之狀態下防止所導入之抗原受體序列被核酸酶切斷，而實現較高之導入效率。例如，可對存在於供體TCR匣序列上之嚮導RNA或TALEN靶相同序列之密碼子進行改變以成為同義置換。

【0040】啟動子：本發明之技術係將編碼抗原受體之核酸導入基因組上，但此處，編碼抗原受體之核酸可包含可動作地連結於抗原受體之啟動子，可包括啟動子在內導入基因組上。於本發明之技術中，由於理論上在與核酸酶之靶部位對應之序列內僅插入1個拷貝之抗原受體，故存在如下情形，即作為啟動子，較佳為選擇能夠高表現且穩定表現者。啟動子序列例如可為EF-1α啟動子或導入抗原受體基因之細胞用所開發出的合成啟動子(Colamartino A, Biol Blood Marrow Transplant、2019; 3:Suppl S164, https://www.bbmt.org/article/S1083-8791(18)31286-2/abstract等)。

【0041】前導序列：編碼抗原受體之核酸可包含用以在抗原受體之上游提高轉譯效率之前導序列。於本發明之技術中，由於理論上在與核酸酶之靶部位對應之序列內僅插入1個拷貝之抗原受體，故可能有利的是包括提高轉譯效率之序列在內一起導入。作為前導序列，例如可使用β血球蛋白基因之5'-UTR序列。又，其中，報告爪蟾血球蛋白5'-UTR序列為轉譯效率最優異者(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2017171)，而認

為適宜用於本發明之載體之用途。

【0042】 螢光色素：為了製作能夠用於臨床之細胞，本發明之載體較理想為能夠不包含EGFP或mKATE等螢光色素序列。

【0043】 匣長：本發明之載體之用以導入之序列(抗原受體匣)有時為了容易組入核酸酶切斷部位，較佳為設為最小限度之長度。例如本發明之載體之抗原受體匣之長度例如可為約未達5000個鹼基對、約未達4900個鹼基對、約未達4800個鹼基對、約未達4700個鹼基對、約未達4600個鹼基對、約未達4500個鹼基對、約未達4400個鹼基對、約未達4300個鹼基對、約未達4200個鹼基對、約未達4100個鹼基對、約未達4000個鹼基對、約未達3900個鹼基對、約未達3800個鹼基對、約未達3700個鹼基對、約未達3600個鹼基對、或約未達3500個鹼基對、例如約3400個鹼基對。載體尺寸超過10 kb之質體由於導入效率、向核內之轉移效率均降低，故包含多重選殖位之未插入匣之核心載體的尺寸例如可為約未達6500個鹼基對、約未達6400個鹼基對、約未達6300個鹼基對、約未達6200個鹼基對、約未達6100個鹼基對、約未達6000個鹼基對、約未達5900個鹼基對、約未達5800個鹼基對、約未達5700個鹼基對、約未達5600個鹼基對、約未達5500個鹼基對、約未達5400個鹼基對、約未達5300個鹼基對、約未達5200個鹼基對、約未達5100個鹼基對、約未達5000個鹼基對、約未達4900個鹼基對、約未達4800個鹼基對、約未達4700個鹼基對、約未達4600個鹼基對、約未達4500個鹼基對、或約未達4400個鹼基對、例如約4300個鹼基對。於抗原受體匣較大之情形時(例如，使用IRES序列等使複數個抗原受體(例如，複數個TCR及/或CAR)同時變現之情形)，亦可利用較小之核心載體。

【0044】 載體量：本發明之載體可以每2×10^6至10^7細胞為約1～約5 μg左右之量導入。藉由使用該程度之量，可避免質體之毒性，以較高之存活率進行導入。

【0045】 本發明中可使用之載體例如可為具有序列編號1、2、或3所示之序列、或對其施加適當改變而成之載體。業者理解到，編碼抗原受體之部分可置換為編碼所望抗原受體者來使用。

【0046】 本發明中可使用之載體可包含：供導入細胞之基因組之匣部分、利用核酸酶之識別序列、及載體骨架。載體骨架部分例如可為序列編號4及序列編號5、序列編號6及序列編號7、序列編號8及序列編號9等。作為利用核酸酶之識別序列，可為選自序列編號10～15中者。作為匣部分之例，可列舉序列編號16～18所示之序列。可視需要自該序列中對要素進行置換、追加、削除，而用作匣部分。

【0047】 匣部分除包含編碼抗原受體之序列以外，還可包含例如polyA附加序列、前導序列、1個或複數個啟動子序列。作為polyA附加序列之一例，可列舉序列編號19之序列。作為前導序列之一例，可列舉序列編號21之序列。作為啟動子序列，例如可列舉序列編號22或23之序列。再者，於本發明中，關於啟動子序列、前導序列、polyA附加序列，於實現所需之表現之範圍內，於載體中可視需要進行削除，又，可進行改變，或者可與具有同樣效果之不同序列置換來使用。

於本發明中，關於具體示出之序列，應注意可使用於維持所需活性之範圍內施加改變而成者。例如於本發明中，可使用相對於具體示出之序列，具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%或至少約99%

之同一性的序列。於本發明中，關於具體示出之核酸序列，於維持所需活性之範圍內，可施加1個或複數個(較佳為1個或數個或者1、2、3、或4個)之突變(置換、插入、缺失)來使用。

【0048】 改變胺基酸序列亦可為具有1個或複數個(較佳為1個或數個或者1、2、3、或4個)之保存性置換之胺基酸序列。此處所謂「保存性置換」，意指：以實質上不會改變蛋白質之功能之方式，利用其他化學上類似之胺基酸殘基置換1個或複數個胺基酸殘基。例如可列舉：藉由另一疏水性殘基置換一疏水性殘基之情形、藉由具有相同電荷之另一極性殘基置換一極性殘基之情形等。關於可進行此種置換之功能上類似之胺基酸，每種胺基酸於該領域中眾所周知。作為非極性(疏水性)胺基酸之具體例，可列舉：丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、脯胺酸、色胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸等。作為極性(中性)胺基酸，可列舉：甘胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、麩醯胺、天冬醯胺、半胱胺酸等。作為具有陽電荷之(鹼性)胺基酸，可列舉：精胺酸、組胺酸、離胺酸等。又，作為具有負電荷之(酸性)胺基酸，可列舉天冬胺酸、麩胺酸等。

【0049】 由於藉由複數個基因密碼子可編碼同一胺基酸，故可能存在編碼同一胺基酸序列之複數個核酸序列，於以編碼胺基酸序列為目的之範圍內，可利用不同之核酸序列。

【0050】 (3.核酸酶)

於本說明書中，對用以與載體組合，將所需核酸插入細胞所包含之核酸中之規定部位的核酸酶或其用途進行說明。於本發明中，可對免疫細胞之內源性抗原受體基因進行改變(例如減弱)，但亦可使用核酸酶來進行此改變，其後藉由同樣之核酸酶進行使用載體之經由MMEJ之抗原受體的

導入。內源性抗原受體之減弱可藉由核酸酶來進行，除此以外，還可利用反義法、或RNAi等。又，內源性抗原受體之去除可藉由內源性TCR基因之剔除來進行。內源性TCR基因之改變例如可藉由使編碼區域之全部或一部分缺失、向調節區域導入突變、導入無意義或誤義突變等來進行。

【0051】較佳為可使用基因組編輯技術來進行內源性TCR基因之改變及/或編碼抗原受體之核酸之導入。基因組編輯係利用部位特異性核酸酶，對靶基因進行改變的技術。作為基因組編輯技術，可列舉：ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9等。具有實現對於各所需序列之DNA序列特異性結合的結合域、及於所需序列之部位切斷DNA之切斷域。

【0052】ZFN係包含鋅指域與DNA切斷域之人工限制酶。鋅指域能夠以識別任意之DNA鹼基序列之方式進行改變，藉此，鋅指核酸酶能夠將複雜基因組中之單一序列作為靶。

【0053】相對於ZFN、TALEN基本上作為一個蛋白質來使用，CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9(Crispr ASsociated protein 9)系統包含嚮導RNA與Cas9這兩個不同之分子。藉由於嚮導RNA中包含與DNA之靶部位互補之序列，嚮導RNA可與靶部位特異性結合。如此，以覆蓋嚮導RNA與DNA之方式結合Cas9蛋白質而切斷DNA。Cas9自身可隨意使用，僅需藉由靶部位來製作嚮導RNA，因此認為多重化較為容易。

【0054】TALEN(轉錄活化因子樣效應子核酸酶)係以作為限制酶之FokI為DNA切斷域，並融合自植物病原細菌黃單胞桿菌屬(黃單胞桿菌屬)分泌出之TALE蛋白質之DNA結合域而成之人工酶。TALE蛋白質之DNA結合域採取34個左右之胺基酸之重複結構。將該重複單元稱為模組。其

中，第12位與第13位胺基酸變得可變，與靶序列結合之部分中稱為「重複可變二殘基」(RVD)。TALEN使用與靶DNA之相反鏈分別結合之分子作為L TALEN與R TALEN之對。由於FokI顯示切斷活性，故TALEN需要維持適當之距離以形成二聚體。關於TALEN之誤配耐受性或脫靶活性，幾乎沒有報告，特徵在於較高之特異性。於改變T細胞時，因脫靶發生改變之情形時，可能引起意想不到之有害作用，因此於本發明中較佳為使用具有較高特異性之TALEN。

【0055】 除先前型之TALEN以外，製作各種改變TALEN。就較高之特異性及改變效率之高低之方面而言，較佳為藉由此種TALEN來進行內源性TCR基因之改變。於本說明書之實施例中，證實了使用改變TALEN而實現了T細胞之內源性TCR之完全去除。

【0056】 本發明中可使用之載體可為用以藉由本說明書中所記載之任一種核酸酶插入所需核酸者。核酸酶可為包含第一DNA結合域及第二DNA結合域者。

【0057】 作為DNA結合域之來源，可列舉：植物病原菌黃單胞桿菌屬之TALE(Transcription Activator-Like Effector，轉錄活化因子樣效應子)、鋅指(Zinc finger)等。DNA結合域較佳為可自N末端側連續地包含特異性地識別鹼基對之1個或複數個DNA結合模組。1個DNA結合模組特異性地識別1個鹼基對。因此，第一DNA結合域、及第二DNA結合域分別識別包含特定核苷酸序列之區域。第一DNA結合域所識別之核苷酸序列與第二DNA結合域所識別之核苷酸序列可相同亦可不同。關於DNA結合域所包含之DNA結合模組之數，就兼顧DNA切斷域之高核酸酶活性與DNA序列之高識別特異性的觀點而言，較佳為8～40，更佳為12～25，進而更

佳為15～20。作為DNA結合模組，例如可列舉TAL效應重複序列(effector repeat)等。作為1個DNA結合模組之長度，例如可列舉20～45、30～38、32～36、或34等。DNA結合域所包含之DNA結合模組之長度較佳為所有DNA結合模組相同。第一DNA結合域及第二DNA結合域較佳為來源、特性等相同。

【0058】 於使用RNA誘導型Fokl核酸酶(Fokl-dCas9)之情形時，與gRNA形成複合體之Fokl-dCas9可相當於包含DNA結合域之核酸酶。dCas9係其觸媒活性經失活之Cas9，將之引導至會識別位於發生雙鏈斷裂之部位附近之鹼基序列的gRNA，與核酸結合。即，與gRNA形成複合體之dCas9可相當於DNA結合域。

【0059】 包含第一DNA結合域及第二DNA結合域之核酸酶較佳為包括：包含第一DNA結合域及第一DNA切斷域之第1核酸酶次單位、以及包含第二DNA結合域及第二DNA切斷域之第2核酸酶次單位。

【0060】 第一DNA切斷域及第二DNA切斷域較佳為第一DNA結合域及第二DNA結合域分別與DNA結合後，相互接近而形成多聚體，取得得到提高之核酸酶活性。作為此種DNA切斷域，可列舉源自限制酶Fokl者等。DNA切斷域可為異源二聚物型DNA切斷域，亦可為同源二聚體型DNA切斷域。於若第一DNA切斷域與第二DNA切斷域接近，則形成多聚體，可獲得得到提高之核酸酶活性，但即便第一DNA切斷域與第一DNA切斷域接近，亦不會形成多聚體，而無法獲得得到提高之核酸酶活性，又，即便第二DNA切斷域與第二DNA切斷域接近，亦不會形成多聚體，而無法獲得得到提高之核酸酶活性之情形時，該第一DNA切斷域與該第二DNA切斷域為異源二聚物型DNA切斷域。又，於若第一DNA切斷域與

第一DNA切斷域接近，則形成多聚體，而核酸酶活性提高之情形時，該第一DNA切斷域為同源二聚體型DNA切斷域。於使用同源二聚體型DNA切斷域之情形時，一般可獲得較高之核酸酶活性。第一DNA切斷域及第二DNA切斷域較佳為來源、特性等相同。

【0061】於使用TALEN之情形時，於第1核酸酶次單位中，第一DNA結合域與第一DNA切斷域係藉由多肽連接，該多肽包含20～70個、25～65個、或30～60個、較佳為35～55個、更佳為40～50個、進而較佳為45～49個、最佳為47個胺基酸。於使用ZFN之情形時，於第1核酸酶次單位中，第一DNA結合域與第一DNA切斷域係藉由多肽連接，該多肽包含0～20個、或2～10個、較佳為3～9個、更佳為4～8個、進而較佳為5～7個胺基酸。於使用Fokl-dCas9之情形時，於第1核酸酶次單位中，dCas9與Fokl係藉由多肽連接，該多肽包含1～20個、1～15個、或1～10個、較佳為2～8個、更佳為3～7個、進而較佳為4～6個、最佳為5個胺基酸。關於第2核酸酶次單位，亦同樣如此。藉由此類長度之多肽所連接之第1核酸酶次單位對於包括包含第1核苷酸序列之區域、及包含第2核苷酸序列之區域之部分之長度的特異性較高，而對特定長度之間隔區進行特異性切斷，因此，因非特異性切斷而將核酸插入目標外部位之頻度較低，又，下述利用微同源介導性末端連接進行連結後發生由核酸導致之再次斷裂的頻度較低，故而較佳。

【0062】於本發明之載體中，例如核酸酶亦可與CRISPR/Cas系統之核酸酶等RNA誘導型核酸酶組合，例如核酸酶可為Cas9核酸酶。

【0063】於本發明之載體中，核酸酶為ZFN、TALEN或Fokl-dCas9，較佳為TALEN。ZFN、TALEN或Fokl-dCas9可為同源二聚體

型，亦可為異源二聚體型。上述核酸酶較佳為同源二聚體型之ZFN、TALEN或Fokl-dCas9，更佳為同源二聚體型之TALEN。

【0064】 上述核酸酶亦包括其等之突變體。此種突變體於顯示上述核酸酶之活性之範圍內可為任何者。關於此種突變體，例如可列舉包含於上述核酸酶之胺基酸序列中置換、缺失及/或附加數個、例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、或50個胺基酸而成之胺基酸序列的核酸酶。

【0065】 核酸酶可為切斷免疫細胞之內源性抗原受體之基因座者。免疫細胞之內源性抗原受體基因之剔除、與抗原受體之導入可能同時發生。內源性抗原受體基因可為TRA基因或TRB基因。又，可以TRA基因或TRB基因之恆定部為目標。

【0066】 (3-1.改變TALEN)

於本發明之1個態樣中，核酸酶較佳為TALEN，更佳為鉑TALEN。TALEN如該領域中所周知，係使用轉錄活化因子樣(TAL)蛋白質之基因組編輯技術(例如參照美國專利8,470,973號、美國專利8,586,363號)。作為鉑TALEN之代表性者，可列舉如下者，即藉由設為如下週期性配置，即，使TALEN之DNA結合重複序列所包含之34個胺基酸中之第4位與第32位之胺基酸產生變化(variations)，而使活性較Voytas TALEN得到上升者(Sakuma et al., Sci Rep, 2013)。於本發明之方法中，較佳為可使用鉑TALEN，進行內源性TCR基因之編輯及/或抗原受體之導入。關於鉑TALEN，記載於日本專利特開2016-175922中，且其內容整體於本說明書作為參考被引用。本發明之改變TALEN例如可為具有以下所記載之特徵者。於本發明之1個實施方式中，可兼顧功能區之高功能與對於DNA序列

之高識別特異性，而以高概率且安全地發揮所需功能，而且，使用可以簡單之操作製作之多肽或編碼其之核酸，進行內源性TCR基因之改變及/或抗原受體之導入。

【0067】DNA結合域與功能區藉由包含35～55個胺基酸之多肽連接，且DNA結合域所包含之DNA結合模組中之2個特定位置之胺基酸在4個DNA結合模組中分別呈現不同之重複樣式的多肽可兼顧功能區之高功能與對於DNA序列之高識別特別性。用以表現該多肽之載體可藉由使用具有特定特徵之載體集、及具有特定特徵之載體庫而簡單地製作。

【0068】於本發明之1個實施方式中，本發明可利用包含DNA結合域及功能區之多肽。關於該多肽，可使用如下多肽或編碼其之核酸，即DNA結合域與功能區藉由包含35～55個胺基酸之多肽連接，且DNA結合域自N末端側連續地包含複數個DNA結合模組，自N末端起第4n－3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，自N末端起第4n－2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，自N末端起第4n－1個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，自N末端起第4n個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，自N末端起第4n－3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自N末端起第4n－2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自N末端起第4n－1個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、及自N末端起第4n個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合互不相同，此處，n為1～10之自然數，x為1～40之自然數，y為1～40之自然數，x與y為不同之自然數。功能區可為DNA切斷域。上述多肽包括編碼多肽之多

核苷酸。

【0069】 又，本發明可利用用以製作包含編碼上述多肽之多核苷酸之載體的載體庫，此處，載體庫係由自5'末端起依序具有第1限制酶切斷部位、編碼4個DNA結合模組之多核苷酸、及第2限制酶切斷部位的複數個載體所構成，此處，第1限制酶切斷部位及第2限制酶切斷部位之組合係如下組合中之任一組合：A型限制酶切斷部位及B型限制酶切斷部位之組合、A型限制酶切斷部位及C型限制酶切斷部位之組合、A型限制酶切斷部位及D型限制酶切斷部位之組合、A型限制酶切斷部位及E型限制酶切斷部位之組合、B型限制酶切斷部位及C型限制酶切斷部位之組合、C型限制酶切斷部位及D型限制酶切斷部位之組合、以及D型限制酶切斷部位及E型限制酶切斷部位之組合，此處，A型限制酶切斷部位～E型限制酶切斷部位藉由利用同一限制酶之切斷，均會產生互不相同之切斷末端，4個DNA結合模組中，自5'末端起第1個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之載體相同，自5'末端起第2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之載體相同，自5'末端起第3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之載體相同，自5'末端起第4個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之載體相同，自5'末端起第1個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自5'末端起第2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自5'末端起第3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、及自5'末端起第4個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合互不相同，此處，x為1～40之自然數，y為1～40之自然數，x與y為不同之自然數。

【0070】本發明進而可應用用以製作上述載體庫之載體集。此處，該載體集包含複數個載體，該載體自5'末端起依序包括第1限制酶切斷部位、DNA結合模組、及第2限制酶切斷部位，第1限制酶切斷部位、及第2限制酶切斷部位係藉由利用相同限制酶之切斷而產生互不相同之切斷末端者，DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合係4個不同之組合中之任一組合，此處，x為1～40之自然數，y為1～40之自然數，x與y為不同之自然數。

【0071】上述多肽為了於實現功能區之高功能之同時，實現對於DNA序列之高識別特異性，可藉由將包含編碼上述多肽之多核苷酸之載體導入細胞，而安全且高概率地實現所需TCR基因之改變及/或抗原受體之導入。又，若使用上述載體庫，則可簡便且迅速地製備兼顧功能區之高功能與對於DNA序列之高識別特異性之多肽表現用載體。

作為DNA結合域之來源，可列舉：植物病原菌黃單胞桿菌屬之TALE(Transcription Activator-Like Effector，類轉錄激活因子)、鋅指(Zinc finger)等。

【0072】作為功能區，可列舉：編碼酵素、轉錄調節因子、報導蛋白等之結構域。作為酵素，可列舉：重組酶、核酸酶、連接酶、激酶、磷酸酶等DNA修飾酵素；內醯胺酶等其他酵素。於本說明書中，將編碼核酸酶之結構域稱為DNA切斷域。作為轉錄調節因子，可列舉活化因子、抑制因子等。作為報導蛋白，可列舉：綠色螢光蛋白質(GFP)、人源化海紫羅蘭科綠色螢光蛋白質(hrGFP)、增強綠色螢光蛋白質(eGFP)、增強藍色螢光蛋白質(eBFP)、增強青色螢光蛋白質(eCFP)、增強黃色螢光蛋白質(eYFP)、紅色螢光蛋白質(RFP或DsRed)、mCherry等螢光蛋白質；螢

火蟲螢光素酶、海紫羅蘭科螢光素酶等生物發光蛋白質；鹼性磷酸酶、過氧化酶、氯黴素乙醯轉移酶、β-半乳糖苷酶等將化學發光受質進行轉化之酵素等。DNA切斷域較佳為與其他DNA切斷域接近而形成多聚體，而取得得到提高之核酸酶活性。作為此種DNA切斷域，可列舉源自FokI者等。

【0073】 DNA結合域與功能區係藉由包含35～55個、較佳為40～50個、更佳為45～49個、最佳為47個胺基酸之多肽所連接。

【0074】 DNA結合域可自N末端側起連續地包含複數個DNA結合模組。1個DNA結合模組特異性地識別1個鹼基對。關於DNA結合域所包含之DNA結合模組之數，就兼顧功能區之高功能與DNA序列之高識別特異性之觀點而言，較佳為8～40，更佳為12～25，進而更佳為15～20。作為DNA結合模組，例如可列舉：TAL效應重複序列(effector repeat)等。作為1個DNA結合模組之長度，例如可列舉：20～45、30～38、32～36、或34等。DNA結合域所包含之DNA結合模組之長度較佳為所有DNA結合模組均相同。

【0075】 自N末端起第4n－3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合可就任意之n相同。又，自N末端起第4n－2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合可就任意之n相同。又，自N末端起第4n－1個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合可就任意之n相同。又，自N末端起第4n個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合可就任意之n相同。此處，n可為1～10之自然數，較佳為1～7之自然數，更佳為1～5之自然數。n較佳為足以示出DNA結合域所包含之所有DNA結合模組的自然數。又，x為1～40之自然數，較佳為1～10之自

然數，更佳為2～6之自然數，進而更佳為3～5之自然數，最佳為自然數4。又，y為1～40之自然數，較佳為25～40之自然數，更佳為30～36之自然數，進而更佳為31～33之自然數，最佳為自然數32。x與y為不同之自然數。x及y之數值根據所使用之DNA結合模組之長度而可能不同。x較佳為表示相當於包含34個胺基酸之DNA結合模組中第4號之胺基酸之位置的數值。Y較佳為表示相當於包含34個胺基酸之DNA結合模組中第32號之胺基酸之位置的數值。

【0076】 自N末端起第4n－3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自N末端起第4n－2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自N末端起第4n－1個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、及自N末端起第4n個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合可互不相同。此處，n為1～10之自然數，較佳為1～7之自然數，更佳為1～5之自然數。n較佳為足以示出DNA結合域所包含之所有DNA結合模組的自然數。又，x為1～40之自然數，較佳為1～10之自然數，更佳為2～6之自然數，進而更佳為3～5之自然數，最佳為自然數4。又，y為1～40之自然數，較佳為25～40之自然數，更佳為30～36之自然數，進而更佳為31～33之自然數，最佳為自然數32。x與y為不同之自然數。較佳為自N末端起第4n－3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自N末端起第4n－2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、及自N末端起第4n個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合可分別於x與y之順序下選自由D與D之組合、E與A之組合、D與A之組合、及A與D之組合所組成之群。

【0077】 作為可使用之載體，可列舉：質體載體、黏接質體載體、

病毒載體、人工染色體載體等。作為人工染色體載體，可列舉：酵母人工染色體載體(YAC)、細菌人工染色體載體(BAC)、P1人工染色體載體(PAC)、小鼠人工染色體載體(MAC)、人類人工染色體載體(HAC)。又，作為載體之成分，可列舉：DNA、RNA等核酸；GNA、LNA、BNA、PNA、TNA等核酸類似物等。載體亦可藉由糖類等核酸以外之成分進行修飾。

【0078】藉由將載體導入細胞等並使之表現，可製備上述多肽。又，藉由將載體導入細胞等並使之表現，可於細胞內發揮功能區所對應之所需功能，即，DNA重組、DNA切斷等DNA修飾；轉錄調節等其他酵素活性之表現；利用報導蛋白對DNA區域進行標記化及/或經由MMEJ導入抗原受體等。於本發明之一個態樣中，可提供一種組合物，其用以於本發明之任一方法中使用且包含鉑TALEN。

【0079】(4.TCR改變)

於本發明中，可提供一種將編碼抗原受體之核酸導入目標生物之免疫細胞所包含之核酸中之規定部位的方法。該方法可包括如下步驟：將包含編碼抗原受體之核酸之載體、與核酸酶導入該免疫細胞。核酸酶切斷該載體及該免疫細胞之基因組序列，載體可以如下方式構成：若被核酸酶切斷，則會產生編碼抗原受體之序列，該序列會藉由微同源介導末端結合(MMEJ)被導入免疫細胞之基因組序列之被核酸酶切斷之位置。

【0080】本說明書中記載之技術並無限定，但例如可於如圖6所示之免疫療法過程中使用。

【0081】於一個態樣中，本發明提供一種受驗者實施免疫療法之方法，其包括如下步驟：(A)自該受驗者取得血液；(B)將該血液之單核細胞

(PMBC)之TRB剔除；(C)將CD3陰性之該單核細胞進行濃縮；(D)將該單核細胞之TRA剔除並導入抗原受體(TCR或CAR-T)；(E)將CD3陽性之該單核細胞進行濃縮；及(G)視需要對該單核細胞進行擴大培養。

【0082】 A)自受驗者取得血液之步驟之特徵在於以下。

使用已經於成分獻血或末梢血幹細胞採集等中使用之Spectra Optia(註冊商標)(TERUMO BCT公司)或COM.TEC(註冊商標)(FRESENIUS KABI Japan)等醫療用認可之連續血球成分分離裝置，採集1×10^{10}左右之末梢血單核細胞(PBMC)。為了儘可能地避免採集時低鈣血症等不良事件之發病，而以60 ml/分鐘以下之採集速度來進行採集。

【0083】 B)將該血液之單核細胞(PBMC)之第1個抗原受體基因座(例如，TRB)剔除之步驟之特徵在於以下。

使用GMP等級之Dynabeads(註冊商標)(Thermo Fisher公司)CD3/CD28，進行T細胞之活化、增殖後，於48～72小時以內之最佳時期內使用電穿孔法，將以TRB恆定區作為靶序列之核酸酶之載體導入增殖期之T細胞。更佳為使用MACS GMP CD3 pure(註冊商標)(Miltenyi Biotec公司)等GMP等級之CD3陽性細胞分離用珠粒，自PBMC純化CD3陽性細胞成分以進行該過程。

【0084】 C)將CD3陰性之該單核細胞進行濃縮之步驟之特徵在於以下。

導入核酸酶而使TCRβ鏈之表現缺損之T細胞由於同時使CD3之表現消失，故使用MACS GMP CD3 pure(註冊商標)(Miltenyi Biotec公司)等GMP等級之CD3陽性細胞分離用珠粒，進行CD3陰性細胞成分之純化濃縮。

【0085】 D)將該單核細胞之第2個抗原受體基因座(例如，TRA)剔除並導入抗原受體(TCR或CAR-T)之步驟之特徵在於以下。

藉由上述C)之步驟，使缺損TCRβ鏈之表現之T細胞於IL-2存在下進行增殖，於距初次電穿孔法大致48～72小時之最合適時點，藉由第2次之電穿孔法將用以導入所需TCR之本發明之環狀DNA載體與TCRα鏈切斷用之核酸酶之載體同時導入。

再者，省略C)之過程，利用電穿孔法，將用以導入所需CAR之本發明之環狀DNA載體與TCRα鏈切斷用之核酸酶之載體同時導入，進行CD3陰性細胞成分之純化，藉此切斷TCRα鏈，能夠實現表現CAR之T細胞之濃縮。

【0086】 E)將CD3陽性之該單核細胞進行濃縮之步驟之特徵在於以下。

於導入有TCR之情形時，藉由導入載體而恢復了TCR之表現之T細胞一併恢復CD3之表現，因此使用MACS GMP CD3 pure(註冊商標)(Miltenyi Biotec公司)等GMP等級之CD3陽性細胞分離用珠粒，再次進行CD3陽性細胞成分之純化濃縮。

【0087】 G)視需要對該單核細胞進行擴大培養之步驟之特徵在於以下。

對藉由上述E)之步驟進行過純化濃縮之表現所需TCR的T細胞(或者缺損TCR而表現CAR之T細胞)進行擴大培養時，以適當之濃度添加IL-2，並且為了將細胞濃度保持在大致1×10^6/ml而適宜追加培養基，並視需要交換至尺寸較大之細胞培養用袋。

【0088】 於一個較佳實施方式中，本發明之上述TRA及/或TRB之切

斷可使用鉑TALEN來進行。

【0089】 進而，於特定之實施方式中，上述免疫療法包括TCR-T療法或CAR-T療法。本說明書中，「TCR-T療法」係指利用對T細胞受體(TCR)進行改變之細胞療法，例如可用於癌症治療。於本說明書中，「CAR-T療法」係指基因、細胞治療法，其係將嵌合抗原受體(CAR)(例如，實施過用以克服腫瘤免疫逃避機制之基因操作者)基因導入患者T細胞，將該T細胞於體外進行擴增培養後向患者輸注。

【0090】 本發明提供一種包含鉑TALEN之組合物，其用於對受驗者實施免疫療法之方法，該方法包括如下步驟：(A)自該受驗者取得血液；(B)將該血液之單核細胞(PMBC)之TRB剔除；(C)將CD3陰性之該單核細胞進行濃縮；(D)將該單核細胞之TRA剔除並導入抗原受體(TCR或CAR-T)；(E)將CD3陽性之該單核細胞進行濃縮；及(G)視需要對該單核細胞進行擴大培養。

【0091】 (4-1.導入步驟)

於本發明中，導入載體之步驟可使用電穿孔法來進行。再者，於本發明中，核酸酶之導入亦可藉由導入編碼核酸酶之核酸(載體)，與包含編碼抗原受體之核酸之載體同時進行。

【0092】 電穿孔法有時較佳為於流動腔室內進行。電穿孔法中，有時因緩衝液成為高溫而導致細胞死滅，但藉由於設置在流路中之腔室(流動腔室)內將緩衝液保持在低溫，能夠減少對細胞之損害，防止細胞伴隨過度加熱而死滅。又，於電穿孔法後可使用細胞容易存活之緩衝液。電穿孔法可藉由MaxCyte Flow Electroporatin™、NEPA21(註冊商標)、NEON(註冊商標)、CliniMACS Electroporator(註冊商標)等來進行。

【0093】 於本發明中，可能有利的是確認細胞之狀態，於最佳時點進行導入。例如，藉由電穿孔導入核酸酶與載體時，可利用CD3/CD28珠粒刺激免疫細胞後，於約48小時～約72小時之間進行。導入可於刺激後約48～約72小時之間之最佳時點進行。業者於實施本步驟時可確認最合適之時點。又，可能有利的是於導入步驟之前，藉由光學顯微鏡對伴隨細胞之活化、增殖而發生細胞腫脹或簇形成之情況進行確認，並且使用流式細胞分析來確認前向散射、側向散射之值均較處在靜止期之細胞增加。

【0094】 於本發明中，導入之PITCh載體之DNA量可設為約1～5 μg左右。

【0095】 (5.較佳之實施方式)

以下對本發明之較佳實施方式進行說明。以下所提供之實施方式係為了更好地理解本發明而提供者，應理解本發明之範圍不應限定於以下之記載。因此，業者可知，可參照本說明書中之記載，於本發明之範圍內進行適當改變。又，應理解本發明之以下實施方式可單獨使用，或者可組合其等來使用。

【0096】 又，以下所說明之實施方式均為表示概括性或具體性之例者。以下之實施方式中所示之數值、形狀、材料、構成要素、構成要素之配置位置及連接形態、步驟(step)、步驟之順序等僅為示例，並非旨在限定申請專利範圍。又，關於以下實施方式中之構成要素中表示最上級概念之獨立項中未記載之構成要素，作為任意之構成要素進行說明。

【0097】 (5-1.套組)

本發明中，可提供一種套組，其係用以將編碼抗原受體之核酸插入細胞所包含之核酸中之規定部位者，且包括：本說明書所記載之載體、及

本說明書所記載之用以表現核酸酶之載體。

【0098】 (5-2.方法)

本發明中，可提供一種將編碼抗原受體之核酸於活體外或活體內插入免疫細胞所包含之核酸中之規定部位的方法(一實施方式中為於非人類生物之活體內插入之方法)，其包括如下步驟：將本說明書中所記載之載體、及本說明書中所記載之用以表現核酸酶之載體導入免疫細胞。可提供一種製造表現抗原受體之免疫細胞之方法，其包括如下步驟：藉由上述將編碼抗原受體之核酸於活體外或活體內插入免疫細胞所包含之核酸中之規定部位的方法，將編碼上述抗原受體之核酸插入上述免疫細胞所包含之核酸中之規定部位。

【0099】 (5-3.免疫療法)

本發明之方法、套組、或藉由其等所製作之細胞等能夠於免疫療法中使用。認為免疫療法對於如下疾病較為有效，即，會產生具有抗原性之病變之疾病(例如，癌症)；或對於特定抗原之異常免疫應答與發病或病情進展相關之疾病。

【0100】 癌症免疫療法係使用生物所具有之生物體防禦機制來治療癌症之方法。癌症免疫療法大致分為：強化對於癌之免疫功能之癌症免疫療法；及抑制癌之免疫逃避功能之癌症免疫療法。進而，癌症免疫療法存在於體內使免疫功能活化之主動免疫療法；及於體外使免疫功能活化或使已增殖之免疫細胞回到體內之被動免疫療法。作為癌症免疫療法之例，可列舉：非特異性免疫活化藥、細胞激素療法、癌疫苗療法、樹狀細胞療法、過繼免疫療法、非特異性淋巴細胞療法、癌抗原特異性T細胞療法、抗體療法、免疫檢查點抑制療法等。認為藉由本發明之方法所製作之細胞

對於過繼細胞移入有效。

【0101】藉由本發明之方法所製作之細胞可適當與其他癌症治療組合，而可以併用療法之形式來使用。就代表性而言，可與1種或複數種其他藥劑組合而投與。或者，併用療法亦可為與輻射治療之組合。1種或複數種其他藥劑亦可為任意之化學療法藥，或者亦可包含免疫檢查點抑制劑。或者，作為併用療法中所使用之其他癌症治療，可列舉：其他癌症免疫療法(例如，免疫檢查點抑制劑)、溫熱療法、外科程序等，但並不限定於其等。

【0102】作為本發明中視為對象之癌症，可列舉：黑色素瘤(惡性黑色素瘤)、非小細胞肺癌、腎細胞癌、惡性淋巴瘤(霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤)、頭頸部癌、泌尿科癌(膀胱癌、尿路上皮癌、前列腺癌)、小細胞肺癌、胸腺癌、胃癌、食道癌、食管胃結合部癌、肝癌(肝細胞癌、肝內膽管細胞癌)、原發性腦瘤(神經膠主細胞瘤、中樞神經系統原發淋巴瘤)、惡性胸膜間皮瘤、婦科癌(卵巢癌、宮頸癌、子宮體癌、)、軟組織肉瘤、膽道癌、多發性骨髓瘤、乳癌、大腸癌等，但並不限定於其等。

【0103】本發明中所製作之免疫細胞可用於自體免疫疾病、過敏疾病、或移植時之移植物對抗宿主病(GVHD)、排斥反應或移植失敗之處理、治療或預防。作為自體免疫疾病，例如可列舉：類風濕性關節炎(RA)、乾燥綜合征、全身性紅斑狼瘡(SLE)、抗磷脂質綜合症、多發性肌炎・皮肌炎、全身性硬化症、混合性結締組織病、血管炎綜合症、I型糖尿病、葛瑞夫茲氏病、橋本氏病、自發性愛迪生氏病、自體免疫性肝炎、古巴士德氏綜合症、絲球體腎炎、自體免疫性溶血性貧血(AIHA)、自體免疫性血小板減少紫癜、自體免疫性嗜中性球減少症、重症肌無力症、天

疱瘡、白斑、自發性無精子症等，但並不限定於其等。作為過敏疾病，可列舉：花粉症、過敏性鼻炎、支氣管哮喘、異位性皮膚炎等，但並不限定於其等。此外，關於對特定抗原之異常免疫應答與發病或病情進展相關之疾病，可使用利用本發明之抗原特異性控制性T細胞之處理或預防。

【0104】 (5-4.細胞)

於本發明之一個實施方式中，可提供一種細胞或其細胞集群，其包含藉由本發明之方法或載體等進行過改變之目標之外源性抗原受體。於細胞集群中，包含除該目標之外源性抗原受體以外之抗原受體的細胞之比例得到減少，且關於包含除目標之外源性抗原受體以外之抗原受體之細胞的比例，例如未達約20%、約15%、約12%、約10%、約7%、約5%、約3%、約2%或約1%，或者本發明之細胞集群實質上不含有包含除目標之外源性抗原受體以外之抗原受體的細胞。目標之外源性抗原受體可為針對所需抗原之T細胞受體或嵌合抗原受體。

【0105】 本發明之細胞集群可包含如下細胞，即於抗原受體之導入中，向內源性抗原受體基因座以外之部位之突變導入得到減少，或實質上不存在此情況之細胞。於本發明之細胞集群中，向內源性抗原受體基因座以外之部位導入突變之細胞的比例例如未達約20%、約15%、約12%、約10%、約7%、約5%、約3%、約2%或約1%，或者本發明之細胞集群實質上不包含向內源性抗原受體基因座以外之部位導入突變之細胞。

【0106】 (一般技術)

本說明書中所使用之分子生物學方法、生化學方法、微生物學方法係於該領域中眾所周知且慣用者。

【0107】 (附註)

本說明書中「或者」係於可採用文章中所列舉之「至少1個以上」之事項時使用。「或」亦同樣如此。於本說明書中明確記載為「2個值」之「範圍內」之情形時，該範圍亦包括2個值本身。

【0108】本說明書中所引用之科學文獻、專利、專利申請等參考文獻係其整體以與各具體記載相同之程度作為參考引用至本說明書中。

【0109】以上，為了便於理解，顯示較佳實施方式對本發明進行了說明。以下基於實施例對本發明進行說明，但上述之說明及以下之實施例僅以例示為目的來提供，並非以限定本發明為目的來提供。因此，本發明之範圍既不限定於本說明書中具體記載之實施方式，亦不限定於實施例，僅由申請專利範圍來限定。

[實施例]

【0110】以下記載實施例。以下之實施例中所使用之對象之操作於需要之情形時，需遵守日本所規定之與人類基因組基因・分析研究相關之倫理準則、與以人為對象之醫學系研究相關之倫理準則、及廣島大學所規定之標準，即便於未明示之情形時，亦需依據相關法規來進行。

【0111】(實施例1-1：使用MaxCyte並利用TAL-PITCh法將1G4 TCR導入β null Jurkat細胞)

(材料及方法)

依據以下之操作說明，利用TAL-PITCh法將1G4 TCR導入β null Jurkat細胞。

【0112】1)藉由電穿孔法導入以TRBC區域外顯子1為標靶之鉑TALEN mRNA後，進行CD3陰性成分之分選，製作未表現TCRβ鏈之β null Jurkat細胞。

2)對β null Jurkat細胞進行計數。

3)將β null Jurkat細胞2×10^6 cells/samples藉由離心(400 G、10分鐘、室溫)製成細胞顆粒。

4)將上清液廢棄，添加PBS，藉由離心(400 G、10分鐘、室溫)製成細胞顆粒。

5)將上清液廢棄，添加MaxCyte緩衝液，藉由離心(400 G、10分鐘、室溫)製成細胞顆粒。

6)藉由TCRα2 TALEN mRNA、1G4 TCR TAL-PITCh載體(序列編號1、圖7)製作下述表1之溶液，並使細胞顆粒懸浮。

7)將細胞懸浮液移至比色管(SOC-25)，使用MaxCyte來實施電穿孔(程式：Jurkat)。

8)將細胞懸浮液移至培養盤，於CO_2培養箱內靜置40分鐘。

9)添加培養基(RPMI1640＋10% FBS＋2mmol/l L-麩醯胺＋1%青黴素/鏈黴素)，於培養箱(37℃、5% CO_2)中開始培養。

10)於96小時後利用FACS進行分析。

[表1]

[條件設定]

樣本#	細胞類型	EP操作說明	DNA (ug/25 ul)	α2TALEN (ug/25ul)	細胞 (Cells/25ul)	處理集合體
1	β null Jurkat	No EP	0	0	1.00E＋07	
2	β null Jurkat	Jurkat	0	0	1.00E＋07	OC-25×3
3	β null Jurkat	Jurkat	0	10	1.00E＋07	OC-25×3
4	β null Jurkat	Jurkat	5	10	1.00E＋07	OC-25×3

【0113】進而，接著上述實驗，按照以下之操作說明試驗表現之穩定性。

【0114】1)於上述實驗中所使用之Jurkat細胞(Control Jurkat cells)、β-null Jurkat細胞(β-null Jurkat cells)、上述實驗中所製作之表現

1G4之Jurkat細胞(αβ-null Jurkat cells)2×10^6 cells中加入Jurkat細胞培養用之培養基(RPMI1640＋10% FBS＋2mmol/l L-麩醯胺＋1% 青黴素/鏈黴素)，於通常之CO_2培養箱(37℃、5% CO_2)中並排並進行培養。

2)於培養開始後第32天，使用流式細胞分析，對各細胞群中之CD3、TCRαβ、1G4-TCR之表現量進行分析。

【0115】(結果)

結果如圖1所示。示出了藉由本發明之方法，可不使用病毒載體，將依存於HLA-A*02地識別惡性腫瘤中表現之NY-ESO-1抗原的1G4-TCR導入人類T細胞株。

【0116】關於基因導入後之表現之穩定性，示出了藉由本法製作之1G4-TCR表現αβ-null Jurkat細胞持續30天以上穩定地表現出1G4-TCR(圖2)。

【0117】(實施例1-2：TCR Vβ組庫分析)

(材料及方法)

藉由下述操作說明，對導入T細胞之除TCR以外之受體之表現進行了確認。

【0118】1.準備於5 ml管中加入有藉由實施例1-1中所記載之方法導入有1G4 TCR之β null Jurkat細胞、及作為對照之Jurkat細胞1×10^6cell者各8根。

2.第1次洗淨：利用PBS定容至3 ml，進行10分鐘離心(400 g、4℃)。將上清液去除。

3.以與2.相同之方式進行第2次洗淨

4.於各管中添加IOTest Beta Mark(Beckman Coulter)之流式細胞分析

用抗體混合物A～H(參照下圖：Beckman Coulter公司「IOTest(註冊商標)Beta Mark」根據Manufacture's Instruction)各10 μl並進行攪拌。

5.於暗處並於室溫下靜置20分鐘。

6.以與2.相同之方式進行第1次洗淨

7.以與2.相同之方式進行第2次洗淨

8.將0.5% BSA PBS緩衝液 500 μl加入各管中以移液。

9.藉由FACS Canto II進行分析。

[表2]

管	Volume / No. of tests (20 μL/ test)	Vβ * (#)/螢光染料		純系(Refs)	同型(物種)
A	1.0 mL/50 tests	Vb 5.3(TRBV5-5)	PE	3D11(35, 39)	IgG1(小鼠)
		Vb 7.1(TRBV4-1, TRBV4-2, TRBV4-3)	PE+FITC	ZOE(40)	IgG2a(小鼠)
		Vb 3(TRBV28)	FITC	CH92(35, 39, 41)	IgM(小鼠)
B	0.5 mL/25 tests	Vb 9(TRBV3-1)	PE	FIN9(35, 41)	IgG2a(小鼠)
		Vb 17(TRBV19)	PE+FITC	E17.5F3(9, 35, 39, 43)	IgG1(小鼠)
		Vb 16(TRBV14)	FITC	TAMAYA1.2(9, 35, 39)	IgG1(小鼠)
C	0.5 mL/25 tests	Vb 18(TRBV18)	PE	BA62.6(35, 39)	IgG1(小鼠)
		Vb 5.1(TRBV5-1)	PE+FITC	IMMU157(35, 44)	IgG2a(小鼠)
		Vb 20(TRBV30)	FITC	ELL1.4(35, 39)	IgG(小鼠)
D	0.5 mL/25 tests	Vb 13.1(TRBV6-5, TRBV6-6, TRBV6-9)	PE	IMMU222(35, 39)	IgG2b(小鼠)
		Vb 13.6(TRBV6-6)	PE+FITC	JU74.3(35, 39)	IgG1(小鼠)
		Vb 8(TRBV12-3, TRBV12-4)	FITC	56C5.2(35, 39, 43)	IgG2a(小鼠)
E	0.5 mL/25 tests	Vb 5.2(TRBV5-6)	PE	36213(35, 39)	IgG1(小鼠)
		Vb 2(TRBV20-1)	PE+FITC	MPB2D5(45, 46)	IgG1(小鼠)
		Vb 12(TRBV10-3)	FITC	VER2.32(35, 45)	IgG2a(小鼠)
F	0.5 mL/25 tests	Vb 23(TRBV13)	PE	AF23(35, 39)	IgG1(小鼠)
		Vb 1(TRBV9)	PE+FITC	BL37.2(39)	IgG1(大鼠)
		Vb 21.3(TRBV11-2)	FITC	IG125(14, 35, 39)	IgG2a(小鼠)
G	0.5 mL/25 tests	Vb 11(TRBV25-1)	PE	C21(35, 39, 42)	IgG2a(小鼠)
		Vb 22(TRBV2)	PE+FITC	IMMU546(35, 39, 42)	IgG1(小鼠)
		Vb 14(TRBV27)	FITC	CAS1.1.3(35, 42, 45)	IgG1(小鼠)
H	0.5 mL/25 tests	Vb 13.2(TRBV6-2)	PE	H132(35, 47)	IgG1(小鼠)
		Vb 4(TRBV29-1)	PE+FITC	WJF24(未公開)	IgM(大鼠)
		Vb 7.2(TRBV4-3)	FITC	ZIZOU4(未公開)	IgG2a(小鼠)

【0119】(結果)

圖3係表示添加有抗體混合物D時導入有1G4 TCR之β null Jurkat細胞、與Jurkat細胞(對照)之表現TCR之分析結果。根據圖3可明確理解，藉由本法所製作之表現1G4之Jurkat細胞使基因組編輯前所內含之Vβ8鏈之表現消失，表現出與1G4-TCR一致之Vβ13.1鏈。

【0120】 圖4中示出，導入有1G4 TCR之β null Jurkat細胞未表現出除與1G4-TCR一致之Vβ13.1鏈以外的V鏈，即於基因組編輯後未表現源自非再構建對偶基因之新穎Vβ鏈。

【0121】 (實施例1-3：藉由Nested PCR來確認1G4 TCR匣之集合)

(材料及方法)

藉由下述操作說明，確認到目標準確地組入有所導入之TCR匣。

【0122】 1.將藉由實施例1-1中所記載之方法導入有1G4 TCR之β null Jurkat細胞與作為對照之β null Jurkat細胞1×10^6 cell藉由離心(400 G、10分鐘、室溫)製成細胞顆粒。

2.藉由QIAamp DNA血液套組(Qiagen)自各細胞提取基因組DNA。

3.如下述般設計引子，以利用巢式PCR，對將1G4 TCR匣基因導入靶部位(TRCA基因之外顯因數1)時所形成之接點(1G4 TCR匣與TRCA之結合部位)進行擴增。

用以擴增5'側之包含接點之基因序列的第1個PCR用引子對

5'-CTCTGCATGACTCACTAGCACTCTAT-3'(序列編號24)

5'-AGACCGACACCAACCTGAAC-3'(序列編號25)

以第1個PCR產物作為模板DNA之用以擴增5'側之包含接點之基因序列的第2個PCR用引子對

5'-TGGCTAGGAAGGTGGATGAG-3'(序列編號26)

5'-ATCGTGCTGAGAATCCTGCT-3'(序列編號27)

用以擴增3'側之包含接點之基因序列的第1個PCR用引子對

5'-CACGGCGACTACTGCACTTA-3'(序列編號28)

5'-GACTGACTTAGTGAGCTGGGAAAGAT-3'(序列編號29)

以第1個PCR產物作為模板DNA之用以擴增3'側之包含接點之基因序列的第2個PCR用引子對

5'-GGAGCCAGTACACGACATCA-3'(序列編號30)

5'-TTTGGCAGACAGGGAGAAAT-3'(序列編號31)

4.使用Kapa HiFi HotStart Ready Mix(KAPA Biosystems)，藉由巢式PCR對5'側及3'側之包含接點之基因序列進行擴增。PCR之條件設定如下所示。

[表3]

初期變性	95℃	5分鐘	
變性	98℃	20秒	30個循環
黏合	60℃	15秒	
延伸	72℃	1分鐘	
最終延伸	72℃	5分鐘	

5.藉由電泳來確認PCR產物之條帶

6.藉由序列來確認PCR產物之基因序列

【0123】(結果)

結果如圖5所示。圖5示出了已將載體所包含之1G4-TCR表現用序列準確地插入利用本方法之表現1G4之Jurkat細胞之基因組上的TRA基因C區域第1外顯因數一致之區域。Out引子1與In引子1係設定於內源性TRA基因C區域第1外顯因數之5'側非轉譯區及1G4-TCR匣之TRA編碼序列，準確插入之情形時之序列長度為1006bp。另一方面，In引子2與Out引子2係設計在EF1a啟動子區域及TRA基因C區域第1外顯因數下游側之內含子內，準確插入之情形時之序列長度為742bp。根據圖5可明確，所有引子之組合均僅擴增一條預測長度之PCR產物。

【0124】(實施例2：使用人類T細胞株來確認向所需區域之準確拷

貝數之載體序列插入)

1)依據使用先前之反轉錄病毒載體之公知方法(例如，根據Morgan Science 2006;314: 126-129, Zhao Y, J Immunol 2005;174:4415-4423, Robbins PF, CLin Cancer Res 2015;21:1019-27所記載之操作說明)製作1G4-TCR表現人類Jurkat細胞，並進行選殖化。

2)使用本說明書中所記載之DNA載體製作基因組編輯型1G4-TCR表現Jurkat細胞。

3)使用Illumina公司Hi-Seq或具有同等性能之下一代定序儀，對1)之步驟中藉由反轉錄病毒所製作之1G4-TCR表現Jurkat細胞與2)之步驟中所製作之1G4-TCR表現Jurkat細胞之全基因組序列進行比較，比較插入部位及所插入之1G4序列之拷貝數。尤其是亦比較有無COSMIC等與致癌性相關之基因之資料庫所包含之插入部位。

【0125】(實施例3：確認向人類T細胞基因組之所需區域之準確拷貝數之載體序列插入)

1)依據使用先前之反轉錄病毒載體之公知方法(例如，根據Morgan Science 2006;314: 126-129, Zhao Y, J Immunol 2005;174:4415-4423, Robbins PF, CLin Cancer Res 2015;21:1019-27所記載之操作說明)製作1G4-TCR表現人類T細胞，並進行選殖化。

2)使用本說明書中所記載之DNA載體製作1G4-TCR表現人類T細胞，並進行選殖化。

3)使用Illumina公司Hi-Seq或具有同等性能之下一代定序儀，對1)之步驟中藉由反轉錄病毒所製作之1G4-TCR表現T細胞與2)之步驟中所製作之1G4-TCR表現T細胞之全基因組序列進行比較，比較插入部位及所插入

之1G4序列之拷貝數。尤其是亦比較有無COSMIC等與致癌性相關之基因之資料庫所包含之插入部位。

【0126】(實施例4：藉由本方法製作之基因組編輯型1G4表現T細胞與藉由病毒載體製作之1G4表現T細胞的製造時間與細胞毒殺性之比較)

1)依據使用先前之反轉錄病毒載體之公知方法(例如，根據Morgan Science 2006; 314: 126-129, Zhao Y, J Immunol 2005;174:4415-4423, Robbins PF, CLin Cancer Res 2015;21:1019-27所記載之操作說明)製作1G4-TCR表現人類T細胞。

2)使用本方法製作1G4-TCR表現人類T細胞。

3)進行1)及2)之步驟中自原料獲取直至製作1G4-TCR表現人類T細胞為止所需之時間(天數)的比較。

4)藉由如WO/2019/073964所記載之細胞毒性檢測(將效應子(1G4-TCR表現細胞)與靶細胞(表位肽添加細胞)以各種比進行混合，藉由鉻-51釋放檢測來評價殺細胞活性)，根據E:T比來比較1)2)之步驟中所製作之2種1G4-TCR表現細胞之細胞毒殺性。

【0127】(實施例5：利用MaxCyte公司之基因導入裝置之流式電穿孔)

藉由並非流式電穿孔之電穿孔法進行與實施例1-1相同之程序。與實施例1-1中進行導入之結果進行比較，確認於實施例1-1中進行導入之情形時導入後之細胞之存活率更高，導入效率更高。

【0128】(實施例6：細胞之狀態、電穿孔法之時點)

利用CD3/CD28珠粒刺激免疫細胞後，於經過各種時間後進行導入步驟。除此以外，依據實施例1-1之程序。確認在刺激後48～72小時之間之

導入時導入效率較高。

【0129】於導入步驟之前，利用光學顯微鏡確認是否發生細胞腫脹、簇形成等，使用流式細胞分析確認前向散射、側向散射之值與處於靜止期之細胞相比是否增加。確認於向發生細胞腫脹或簇形成且前向散射、側向散射之值均較處於靜止期之細胞增加之細胞的導入中導入效率較高。

【0130】(實施例7：供體TCR匣序列上所存在之嚮導RNA或TALEN靶相同序列之密碼子的同義置換)

於未對供體TCR匣序列上所存在之嚮導RNA或TALEN靶相同序列之密碼子進行同義置換的情形時，進行與實施例1-1相同之程序來進行導入。於未進行密碼子之置換之情形時，預定導入之TCR序列本身被CRISPR或TALEN切斷，因此認為無法獲得供體TCR之表現。

【0131】(實施例8：啟動子序列)

利用並非EF-1α啟動子之啟動子進行與實施例1-1相同之程序來進行導入。確認於實施例1-1中進行導入之情形時，與使用EF-1α啟動子之實施例1-1中之結果進行比較，導入後之細胞中之抗原受體之表現量更多且更穩定地表現。

【0132】(實施例9：前導序列)

利用不包含爪蟾血球蛋白前導之載體進行與實施例1-1相同之程序來進行導入。確認於實施例1-1中進行導入之情形時，與使用爪蟾血球蛋白前導之實施例1-1中之結果進行比較，導入後之細胞中之抗原受體之表現量更多且更穩定地表現。

【0133】(實施例10：向通用pITCh載體之T細胞受體成對基因之組入實驗)

(巨細胞病毒(CMV)特異性T細胞受體對)

【0134】(試劑、機器)

1.pITCh-EF1α-α2載體

2.Xba I(塔卡拉生物公司)

3.MinEluteReaction Cleanup Kit(Qiagen公司)

4.NanoDrop2000(Thermo Fisher Scientific公司)

5.NEBuilderHiFi DNA Assembly Master Mix(New England Biolabs公司)

6.CompetentQuick DH5α(東洋紡織公司)

7.LB培養基(Sigma-Aldrich公司)

8.LB瓊脂培養基(Sigma-Aldrich公司)

9.安比西林(Sigma-Aldrich公司)

10.QIAGENPlasmid Midi Kit(Qiagen公司)

【0135】(實驗方法)

1.靶基因之人工DNA之設計、合成

於將TCR(T細胞受體)α/β基因對組入通用pITCh載體之EF1α啟動子之下游的情形時，依據以下之條件進行插入DNA之設計。

・TCRβ基因與TCRα基因以GSGP2A序列連結。

・TCRβ基因之終止密碼子削除。

・於TCRβ基因之近前組入Kozak序列。

・於插入DNA之前後附加15-25bp之重疊序列。

所設計之插入DNA係藉由PCR或人工DNA合成等方法進行製備。又，現在之一般人工DNA合成為1kbp左右，因此插入DNA亦可分複數次

來合成(圖8)。

【0136】 2.插入DNA向通用pITCh載體之組入、質體DNA製備

(1)通用pITCh載體之直鏈化

利用XbaI對通用pITCh載體進行處理。藉此，通用pITCh載體於具有Xba I位點之選殖位被切斷而得到直鏈化。經Xba I直鏈化之通用pITCh載體係利用MinEluteReaction Cleanup Kit進行純化，使用NanoDrop等DNA濃度測定機器進行DNA定量。

【0137】 (2)插入DNA向載體之組入

直鏈化之通用pITCh載體與插入DNA係使用NEBuilderHiFi DNA Assembly Master Mix連在一起。製備以下之反應液，於50℃下保溫30分鐘。

直鏈化之通用pITCh載體	50 fmole
插入DNA	100 fmole(載體之2倍量)
NEBuilderHiFi DNA Assembly Master Mix	10 μL
H_2O	以總量成為20 μL之方式添加
合計	20 μL

【0138】 (3)組入有插入DNA之通用pITCh載體之大量製備

組入有插入DNA之通用pITCh載體係轉化為DH5α勝任細胞。轉化之勝任細胞係接種至包含安比西林之LB瓊脂培養基培養盤。採集培養盤中出現之大腸桿菌之單一純系，於包含安比西林之LB培養基中振盪培養16小時並進行集菌。使用QIAGENPlasmid Midi Kit等質體純化套組，自所收集之大腸桿菌純化質體DNA。調查所製備之質體之全長DNA序列，確認目標TCRα/β對基因組入通用pITCh載體。

【0139】 5'載體重疊序列

5'-TAAACGCTCAACTTTGGT-3'(序列編號32)

【0140】 Kozak序列

5'-GCCACC-3'

【0141】 CMV特異性TCRβ序列

5'-ATG～終止密碼子削除-3'

5'ATGGGCACCAGGCTCCTCTGTCGTGTGGCCTTTTGTTTCCTG

GCTGTAGGCCTCGTAGATGTGAAAGTAACCCAGAGCTCGAGATATC

TAGTCAAAAGGACGGGAGAGAAAGTTTTTCTGGAATGTGTCCAGG

ATATGGACCATGAAAATATGTTCTGGTATCGACAAGACCCAGGTCT

GGGGCTACGGCGGATCTATTTCTCATATGATGTTAAAATGAAAGAA

AAAGGAGATATTCCTGAGGGGTACAGTGTCTCTAGAGAGAAGAAG

GAGCGCTTCTCCCTGATTCTGGAGTCCGCCAGCACCAACCAGACAT

CTATGTACCTCTGTGCCAGCAGTTTCCAGGGGTTCACTGAAGCTTT

CTTTGGACAAGGCACCAGACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACAA

GGTGTTCCCACCCGANGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGA

NATCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGG

CTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAACGGCAA

GGAGGTGCACAGCGGCGTGTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAGGA

GCAGCCCGCCCTGAACGACAGCAGATACTGCCTGAGCAGCAGACT

GAGAGTGAGCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCAGAAACCACTTCAG

ATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGAC

CCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGAGCGCCGAGGC

CTGGGGCAGAGCCGACTGCGGCTTCACCAGCGTGAGCTACCAGCA

GGGCGTGCTGAGCGCCACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAA

GGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGAGCGCCCTGGTGCTGATGGC

CATGGTGAAGAGAAAGGACTTCGGAAGCGGA-3'(序列編號33)

【0142】 GSG P2A序列

5'-GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTG

GAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT-3'(序列編號34)

【0143】 CMV特異性TCRα序列

5'-ATG～終止密碼子-3'

5'ATGGCCTCTGCACCCATCTCGATGCTNGCGATGCTCTTCACA

TTGAGTGGGCTGAGAGCTCAGTCAGTGGCTCAGCCGGAAGATCAG

GTCAACGTTGCTGAAGGGAATCCTCTGACTGTGAAATGCACCTATT

CAGTCTCTGGAAACCCTTATCTTTTTTGGTATGTTCAATACCCCAAC

CGAGGCCTCCAGTTCCTTCTGAAATACATCACAGGGGATAACCTGG

TTAAAGGCAGCTATGGCTTTGAAGCTGAATTTAACAAGAGCCAAAC

CTCCTTCCACCTGAAGAAACCATCTGCCCTTGTGAGCGACTCCGCT

TTGTACTTCTGTGCTGACTATTATGGTCAGAATTTTGTCTTTGGTCC

CGGAACCAGATTGTCCGTGCTGCCCTATATCCAGAACCCTGACCCT

GCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCT

GCCTATTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGAGCCAGAGCA

AGGACAGCGACGTGTACATCACCGACAAGTGCGTGCTGGACATGA

GAAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGAGCAACA

AGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATCATCC

CCGAGGACACCTTCTTCCCCAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACGTGA

AGCTGGTGGAGAAGAGCTTCGAGACCGACACCAACCTGAACTTCC

AGAACCTGCTGGTGATCGTGCTGAGAATCCTGCTGCTGAAGGTGG

CCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGAGACTGTGGAGCAGCTGA-

3'(序列編號35)

【0144】 3'載體重疊序列

5'-GCAACTAGAAGGCACAGT-3'(序列編號36)

【0145】 (實施例11：嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor：CAR)基因向通用pITCh載體之組入實驗)

(人類CD19特異性嵌合抗原受體)

【0146】 (試劑、機器)

1.pITCh-EF1α-α2載體

2.Xba I(塔卡拉生物公司)

3.MinEluteReaction Cleanup Kit (Qiagen公司)

4.NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific公司)

5.NEBuilderHiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs公司)

6.CompetentQuick DH5α (東洋紡織公司)

7.LB培養基(Sigma-Aldrich公司)

8.LB瓊脂培養基(Sigma-Aldrich公司)

9.安比西林(Sigma-Aldrich公司)

10.QIAGENPlasmid Midi Kit (Qiagen公司)

【0147】 (實驗方法)

1.靶基因之人工DNA之設計、合成

於將嵌合抗原受體(CAR)組入通用pITCh載體之EF1α啟動子之下游的情形時，依據以下之條件進行插入DNA之設計。

・於CAR基因之近前組入Kozak序列。

・於插入DNA之前後向15-25bp之載體附加重疊序列。

所設計之插入DNA係藉由PCR或人工DNA合成等方法進行製備(圖9)。

【0148】 2.插入DNA向通用pITCh載體之組入、質體DNA製備

(1)通用pITCh載體之直鏈化

利用XbaI對通用pITCh載體進行處理。藉此，通用pITCh載體於具有Xba I位點之選殖位被切斷而得以直鏈化。經Xba I直鏈化之通用pITCh載體係利用MinEluteReaction Cleanup Kit進行純化，使用NanoDrop等DNA濃度測定機器來進行DNA定量。

【0149】 (2)插入DNA向載體之組入

直鏈化之通用pITCh載體與插入DNA係使用NEBuilderHiFi DNA Assembly Master Mix連在一起。製備以下之反應液，於50℃下保溫30分鐘。

直鏈化之通用pITCh載體	50 fmole
插入DNA	100 fmole(載體之2倍量)
NEBuilderHiFi DNA Assembly Master Mix	10 μL
H_2O	以合計成為20 μL之方式添加
合計	20 μL

【0150】 (3)組入有插入DNA之通用pITCh載體之大量製備

組入有插入DNA之通用pITCh載體係轉化為DH5α勝任細胞。轉化之

勝任細胞係接種至包含安比西林之LB瓊脂培養基培養盤。採集培養盤中出現之大腸桿菌之單一純系，於包含安比西林之LB培養基中振盪培養16小時並進行集菌。使用QIAGENPlasmid Midi Kit等質體純化套組，自收集到之大腸桿菌純化質體DNA。調查所製備之質體之全長DNA序列，確認目標嵌合抗原受體基因組入通用pITCh載體。

【0151】 5'載體重疊序列

5'-TAAACGCTCAACTTTGGT-3'(序列編號37)

【0152】 Kozak序列

5'-GCCACC-3'

【0153】 人類CD19特異性嵌合抗原受體序列

5'-ATGACCCAGAC CACAAGCAGCCTGTCTG CCAGCCTGGG

CGATAGAGTGACCATCAGCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAA

GTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCT

GCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAAGCAG

ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACAGCCTGACAATCAGC

AACCTGGAACAAGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGC

AACACCCTGCCTTACACCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATC

ACCGGCTCTACAAGCGGCAGCGGCAAACCTGGATCTGGCGAGGGA

TCTACCAAGGGCGAAGTGAAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACTG

GTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTCAGCGGA

GTGTCCCTGCCTGATTACGGCGTGTCCTGGATCAGACAGCCTCCTC

GGAAAGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACA

ACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGG

ACAACTCCAAGAGCCAGGTGTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGA

CCGACGACACCGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTACGG

CGGCAGCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGAC

CGTTTCTTCTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGC

GCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAAGCGTG

CCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACT

TCGCCTGTGATTTCTGGGTGCTGGTCGTTGTGGGCGGCGTGCTGGC

CTGCTACAGCCTGCTGGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTG

AGGAGCAAGCGGAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATG

ACCCCCCGGAGGCCTGGCCCCACCCGGAAGCACTACCAGCCCTAC

GCCCCTCCCAGGGATTTCGCCGCCTACCGGAGCAAACGGGGCAGA

AAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTAC

AAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAG

AAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC

GCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC

GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAG

AGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAA

GAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT

GGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAG

GGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCAC

CAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCG

CTAA-3'(序列編號38)

【0154】 3'載體重疊序列

5'-GCAACTAGAAGGCACAGT-3'(序列編號39)

【0155】(實施例12：使用通用pITCh載體將嵌合抗原受體基因(CAR)導入源自正常人之T細胞之實驗)

【0156】(實驗方法)

1.CD3陽性細胞自正常人末梢血之分離

(試劑、機器)

1.RPMI1640(Thermo Fisher Scientific公司)

2.比重分離液Lymphoprep(AbbottDiagnostics Technologies AS公司)

3.PBS(pH值7.2)

4.MACS緩衝液(Miltenyi Biotec公司)

5.CD3微珠(Miltenyi Biotec公司)

6.MACS管柱(Miltenyi Biotec公司)

7.MACS分選器(Miltenyi Biotec公司)

8.血球計

【0157】(1)於進行T細胞分離實驗之當日採集正常人全血直至50 mL。將所採集之正常人全血利用等量之RPMI1640進行稀釋，於37℃下進行保存。

(2)將15 mL比重分離液Lymphoprep添加至50 mL之離心管中，將30 mL之經稀釋之全血與比重分離液重層。該作業係以將所有經稀釋之全血使用完之方式製作複數個樣本。

(3)將添加有比重分離液與全血之離心管於常溫下以800×g進行30分鐘離心。

(4)使用巴斯德吸管，將藉由離心所形成之包含白血球之中間層回收

至15 mL離心管中。

(5)將PBS(pH值7.2)添加至所回收之中間層中直至總量成為14 mL。使離心管輕輕地渦旋以使細胞懸浮。

(6)將細胞懸浮液於4℃下以250×g進行10分鐘離心。

(7)確認藉由離心形成細胞顆粒。將上清液殘留1 mL地去除，使離心管輕輕地渦旋以使細胞懸浮。將所有樣本回收至1根15 mL離心管中，將PBS(pH值7.2)添加至所回收之中間層中直至總量成為14 mL。使離心管輕輕地渦旋以使細胞懸浮。

(8)將細胞懸浮液於4℃下以250×g進行10分鐘離心。

(9)將上清液殘留2 mL地去除，使離心管輕輕地渦旋以使細胞懸浮。

(10)使用血球計對細胞數進行計數。

(11)將細胞懸浮液於4℃下以300×g進行10分鐘離心。將上清液完全地去除。

(12)將MACS緩衝液以每1×10^7 cells為80 μL之方式進行添加。

(13)將CD3微珠以每1×10^7 cells為20 μL之方式進行添加。

(14)充分攪拌細胞懸浮液，並於4-8℃下進行15分鐘保溫。

(15)將MACS緩衝液以每1×10^7 cells為1-2 mL之方式添加。將細胞懸浮液平穩地攪拌並將細胞洗淨。

(16)將細胞懸浮液於4℃下以300×g進行10分鐘離心。將上清液完全地去除。

(17)將MACS緩衝液以每1×10^8 cells為500 μL之方式添加。使離心管輕輕地渦旋以使細胞懸浮。

(18)將MACS管柱設置於MACS分選器。

(19)利用MACS緩衝液對MACS管柱進行沖洗。

(20)將細胞懸浮液添加於管柱中。

(21)回收通過MACS管柱之非標記細胞。接著，利用MACS緩衝液將管柱洗淨3次。

(22)將MACS管柱自MACS分選器取下，設置於收集管中。

(23)將5 mL之MACS緩衝液添加於MACS管柱中，將柱塞設置於MACS管柱。

(24)猛烈地按壓柱塞，將管柱所保持之細胞回收至15 mL離心管中。所回收之CD3陽性細胞繼續用於利用CD3/CD28固相化珠粒使T細胞活化。

【0158】 2.利用CD3/CD28固相化珠粒使T細胞活化

(試劑、機器)

1.CTL-培養基(X-VIVO 20 (Lonza) with 10 % AB serum (Gibco), 2 mmol/l L-麩醯胺(Gibco), and 1% 青黴素/鏈黴素(Sigma)

2.DynabeadsHuman T-Activator CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific公司)

3.磁性試驗台

4.人類IL-2(R&D Systems)

【0159】 (1)將1×10^6個之CD3陽性細胞之1 mL之CTL-培養基分取至50 mL離心管，預先加熱至37℃。

(2)將所回收之CD3陽性細胞於4℃下以300×g進行10分鐘離心。將上清液完全地去除。細胞預先於冰上保存。

(3)將懸浮有1×10^6個之CD3陽性細胞之25 μL之Dynabeads Human T-

Activator CD3/CD28分取至1.5 mL微管中。

(4)添加與所分取之珠粒等量或至少1 mL之PBS，利用渦旋進行5秒懸浮。

(5)將微管設置於磁性試驗台，放置1分鐘以上將珠粒分離，將上清液去除。

(6)將與最初分取之珠粒等量之CTL-培養基向珠粒添加以使珠粒懸浮。

(7)將懸浮之珠粒添加於預先加溫至37℃之CTL-培養基中。

(8)將人類IL-2以成為30 U/mL之方式添加於預先加溫至37℃之CTL-培養基中。

(9)向預先在冰上保存之CD3陽性細胞以成為1×10^6 cells/mL之方式添加加入有珠粒及人類IL-2之CTL-培養基。將細胞平穩地攪拌並使之懸浮。

(10)將所懸浮之CD3陽性細胞以成為1 mL/well之方式接種至24孔培養盤。

(11)將所接種之細胞於37℃、5% CO_2之條件下培養72小時。

【0160】 2.TCRβ之減弱

(試劑、機器)

1.血球計

2.磁性試驗台

3.Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific公司)

4.TALENRNA(β3-TALEN-L、β3-TALEN-R)

5.CTL-培養基

6.人類IL-2

7.NEPA21電轉化儀(Nepa Gene公司)

8.比色管電極(NepaGene公司)

9.比色管電極用腔室(Nepa Gene公司)

10.CD3微珠(Miltenyi Biotec公司)

11.MACS管柱(MiltenyiBiotec公司)

【0161】(1)使用磁性試驗台並使用血球計，自經CD3/CD28珠粒72小時培養之CD3陽性細胞中對細胞數進行計數。

(2)將經CD3/CD28珠粒刺激並經72小時培養之CD3陽性細胞移至1.5 mL微管，設置於磁性試驗台。將細胞懸浮液放置1分鐘以上，分離CD3/CD28珠粒。將上清液回收至新的15 mL離心管中。

(3)將細胞懸浮液以300×g進行5分鐘離心。將上清液去除。

(4)添加1 mL/tube之Opti-MEM，使管輕輕地渦旋以將細胞洗淨。

(5)將細胞懸浮液以300×g進行5分鐘離心。將上清液去除。

(6)添加少量之Opti-MEM以使細胞懸浮，使用血球計對細胞數進行計數。

(7)將Opti-MEM以成為1×10^6 cells/90 μL之方式進行添加。

(8)將β3-TALEN-L與β3-TALEN-R之TALEN-RNA分別分注至1.5 mL微管各10 μg/tube。

(9)將所懸浮之細胞添加於90 μL/tube之Opti-MEM，並平穩地進行攪拌。

(10)將細胞・RNA懸浮液各100 μL添加於比色管電極。

(11)測定各比色管電極之電阻值。以電阻值落在0.043-0.047之範圍

內之方式進行調整。於電阻值較低之情形時，將細胞・RNA懸浮液自2-3 μL比色管電極去除。於電阻值較高之情形時，將Opti-MEM添加於2-3 μL比色管電極。

(12)將包含30 U/mL之人類IL-2之CTL-培養基以1 mL/well之方式分注於24孔培養盤之樣本數量之孔中。分注有培養基之培養盤係預先於CO_2培養箱內加熱。

(13)輕輕地拍擊比色管電極以攪拌懸浮液。將比色管電極設置於比色管電極用腔室。

(14)將NEPA21電轉化儀之參數以如下方式設定。

穿孔脈衝：275 V(2.5毫秒-50毫秒)×2、50%

傳送脈衝：20 V(50毫秒-50毫秒)×5、40%

(15)測定比色管電極之電阻值，按下Start按鈕以進行電穿孔法。

(16)使用比色管電極所附帶之點滴器，將經過電穿孔法之細胞懸浮液添加於經預先加熱之24孔培養盤之培養基。

(17)將接種之細胞於37℃、5% CO_2之條件下進行72小時培養。

(18)使用CD3微珠與MACS管柱，自經72小時培養之細胞中分離CD3陰性細胞。

(19)將分離之CD3陰性細胞接種於包含30 U/mL之人類IL-2之CTL-培養基。

(20)將所接種之細胞於37℃、5% CO_2之條件下培養48小時。

【0162】 3.TCRα之減弱及利用TALEN-PITCh法導入CAR

(試劑、機器)

1.CTL-培養基

2.DynabeadsHuman T-Activator CD3/CD28(Thermo Fisher Scientific公司)

3.人類IL-2

4.血球計

5.磁性試驗台

6.Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific公司)

7.TALENRNA(α2-TALEN-L・α2-TALEN-R)

8.NEPA21電轉化儀(Nepa Gene公司)

9.比色管電極(NepaGene公司)

10.比色管電極用腔室(Nepa Gene公司)

【0163】(1)將經48小時培養之CD3陰性細胞移至包含CD3/CD28珠粒、30 U/mL 人類IL-2之CTL-培養基。將所接種之細胞於37℃、5% CO_2之條件下培養72小時。

(2)藉由電穿孔法，將α2-TALEN-L與α2-TALEN-R之TALEN-RNA各10 μg/tube及pITCh-EF1α-α2-FMC63 5 ug/tube導入進行過72小時培養之CD3陰性細胞。方法係與「2.TCRβ之減弱」相同。

(3)將經過電穿孔法之細胞接種至包含30 U/mL 人類IL-2之CTL-培養基。將所接種之細胞於37℃、5% CO_2之條件下培養72小時。

(4)藉由FACSCant II進行FMC64-CAR陽性細胞之分析。

【0164】(實施例13：使用改變型載體將1G4導入TRB缺損Jurkat細胞)

準備TRAC切斷用TALENmRNA 10 μg及1G4導入用PITCh載體 5 μg ，將其等導入β-null Jurkat細胞。培養該細胞，使用NY-ESO-1MHC四

聚體來進行FACS分析以於72小時後確認1G4表現。

【0165】將其結果示於圖10。於圖10中，Conv表示先前型PITCh載體，pUC19表示改變型PITCh載體。如圖10所示，可知於使用先前型PITCh載體之情形及使用改變型PITCh載體之情形時，1G4之表現效率分別成為3.1%、3.5%，於使用任一載體之情形時，均可導入1G4，表現成功。

【0166】又，準備TALEN-RNA與改變型PITCh載體，藉由電穿孔法導入β-null Jurkat細胞。培養該細胞，為了於72小時後確認1G4表現，使用NY-ESO-1 MHC四聚體來進行FACS分析。將其結果示於圖11。根據該圖可知，確認到改變型PITCh載體之導入，1G4之表現成功。

【0167】(實施例14：由正常人T細胞製作1G4-TCR-T)

實驗方法：

(試劑、機器)

1.CD3(+) PBMC

2.磁性試驗台

3.0.4 w/v% 台盼藍溶液

4.Opti-MEM(Gibco, 31985-070)

5.NEPA21(NepaGene)

6.比色管電極用腔室(Nepa Gene, CU500)

7.比色管電極(Nepa Gene, EC-002S))

8.TALEN RNA(α2-TALEN-L/R、β3-TALEN-L/R)

9.1G4 PITCh載體

10.1G4片段

11.血球計

12.增殖用培養基CTL-M(30 units/mL human IL-2)

13.IL-2(50,000 IU/mL)

14.CD3微珠(Miltenyi Biotec、#130-050-101)

15.MACS管柱

16.MACS緩衝液(4℃)

【0168】(程序)

1.TRB之KO

(1-1)使用血球計，對經CD3/CD28珠粒刺激並經培養之CD3(+)PBMC進行計數(培養時間：72小時)

(1-2)將用於電穿孔法之培養細胞移至1.5 mL管，設置於磁性試驗台，注入CD3/CD28珠粒，將上清液回收至新的15 mL管。

(1-3)以300×g進行5分鐘離心。

使用PIPETMAN儘可能地去除上清液。

(1-4)添加1 mL/tube之Opti-MEM，輕輕地渦旋以將細胞洗淨。

以300×g進行5分鐘離心。

(1-5)使用PIPETMAN儘可能地去除上清液。

(1-6)添加電穿孔法條件數×100 μL之Opti-MEM，使用血球計進行細胞計數。

(1-7)以成為1×10^6 cells/90 μL之方式添加Opti-MEM來進行調整。

(1-8)將TALEN RNA 10 μg/tube分注1.5 mL管。

(1-9)添加於90 μL/tube之Opti-MEM中懸浮之細胞，並平穩地進行攪拌。

(1-10)對比色管電極進行編號，各添加細胞/RNA懸浮液100 μL/well。

(1-11)測定各比色管電極之電阻值。

(1-12)以全比色管之電阻值成為0.045前後(0.043～0.047)之方式進行調整。

於電阻值較低之情形時，自比色管中去除溶液2～3 μL。

於電阻值較高之情形時，於比色管中添加2～3 μL之Opti-MEM。

(1-13)於開始電穿孔法之前向24孔培養盤之條件數量之孔中分注1 mL/well之CTL-M(30 units/mL human IL-2)，預先於CO_2培養箱內進行加熱。

(1-14)輕輕拍擊比色管電極並進行攪拌，設置於比色管電極用腔室。

(1-15)參數設定

穿孔脈衝：275V(2.5毫秒-50毫秒)×2、50%

傳送脈衝：20V(50毫秒-50毫秒)×5、40%

(1-16)測定電阻值，按下Start按鈕來進行電穿孔法。

(1-17)使用比色管所附帶之點滴器，將經過電穿孔法之細胞液添加於預先加熱過之24孔培養盤之培養基。

(1-18)以未進行電穿孔法之細胞作為對照，添加於24孔培養盤之培養基。

(1-19)於37℃、5% CO_2之條件下培養72小時。

(1-20)利用CD3微珠(Miltenyi Biotec, #130-050-101)分離CD3陰性成分。

(1-21)利用CTL-M(30 units/mL human IL-2)，於37℃、5% CO_2之條

件下培養48小時。

【0169】 2.TRA之KO及利用TAL-PITCh法導入1G4TCR

(2-1)利用CD3/CD28珠粒進行刺激、培養(培養時間：72小時)。

(2-2)利用電穿孔法，將α2-TALENRNA 10 μg/tube, 1G4 PITCh載體5 μg/tube導入培養細胞。方法與1.相同。

(2-3)利用CTL-M(30 units/mL human IL-2)，於37℃、5% CO_2之條件下培養72小時。

(2-4)利用FACSCanto II進行分析。

【0170】 3.擴大培養

(3-1)利用CD3/CD28珠粒進行刺激。

(3-2)利用CTL-M(30 units/mL human IL-2)，於37℃、5% CO_2之條件下培養9天

(3-3)利用CD3/CD28珠粒進行第2次刺激。

(3-4)利用CTL-M(30 units/mL human IL-2)，於37℃、5% CO_2之條件下培養9天

(3-5)利用FACSCanto II進行分析。

【0171】 將使用人類T細胞之情形時之1G4導入結果示於圖12。藉由第1次電穿孔法將TRB剔除，藉由第2次之電穿孔法將TRA剔除且藉由TAL-PITCh法導入1G4TCR。如圖12所示，可知即便於使用人類T細胞之情形時，1G4之表現效率成為10.7%，確認到PITCh載體之導入，1G4之表現成功。

【0172】 (附註)

如上所述，使用本發明之較佳實施方式例示了本發明，但理解到，

本發明應僅藉由申請專利範圍來解釋其範圍。理解到，本說明書中所引用之專利、專利申請案及其他文獻應與在本說明書中具體地記載有其內容本身同樣地，將其內容作為對於本說明書之參考引用。本申請係對於向日本專利廳於2019年11月14日提出申請之日本專利特願2019-206448主張優先權，其內容如同其整體構成本申請之內容一樣作為參考而被引用。

[產業上之可利用性]

【0173】 本發明係關於一種免疫細胞之生物工程學操作。尤其是關於一種將所需抗原受體導入免疫細胞之技術。上述技術能夠用於應用生命科學、臨床醫學之領域。尤其是對於製作用以向人類投予之改變細胞較為有用，認為能夠用於治療自體免疫疾病或癌症。

[序列表非關鍵文字]

【0174】

序列編號1：PITCh_1G4載體之全長序列

序列編號2：PITCh_1G4改良型載體之全長序列

序列編號3：PITCh_NLV48改良型載體之全長序列

序列編號4、5：PITCh_1G4載體之骨架序列

序列編號6、7：PITCh_1G4改良型載體之骨架序列

序列編號8、9：PITCh_NLV48改良型載體之骨架序列

序列編號10～15：核酸酶識別序列

序列編號16～18：導入匣部分序列

序列編號19：polyA附加序列

序列編號20：P2A序列

序列編號21：爪蟾血球蛋白5'-UTR序列

序列編號22：T7啟動子序列

序列編號23：EF-1α啟動子序列

序列編號24～31：實施例中所使用之啟動子序列

序列編號32：實施例10中所使用之5'載體重疊序列

序列編號33：CMV特異性TCRβ序列

序列編號34：GSGP2A序列

序列編號35：CMV特異性TCRα序列

序列編號36：實施例10中所使用之3'載體重疊序列

序列編號37：實施例11中所使用之5'載體重疊序列

序列編號38：人類CD19特異性嵌合抗原受體序列

序列編號39：實施例11中所使用之3'載體重疊序列

【序列表】

<110> 國立大學法人廣島大學(Hiroshima University)
日商組庫創世紀股份有限公司(Repertoire Genesis Incorporation)

<120> 使用環狀DNA將抗原特異性受體基因導入T細胞基因組之方法

<130> EC010PCT

<160> 39

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1
<211> 6207
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PITCh_1G4載體

<400> 1
tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaatattac tacaggcgcc 240

attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300

tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360

tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgagct agtgtaatac gactcactat 420

agggcgcggc cgcagaattc gagctcggta cccgggatct cgaggccaga tctgtctgtc 480

tgcctattca ccgattgaag attttgattc aatgtgtcac aaagtaagga ttcgatgcaa 540

tttcctcatt ttattaggaa aggacagtgg gagtggcacc ttccagggtc aaggaaggca 600

cgggggaggg gcaaacaaca gatggctggc aactagaagg cacagtcgag gctgatttt 660

acgtagcggc cgctcagctg ctccacagtc tcagggtcat cagcaggttg aagccggcca 720

ccttcagcag caggattctc agcacgatca ccagcaggtt ctggaagttc aggttggtgt 780

cggtctcgaa gctcttctcc accagcttca cgtcgcagct gctctcgggg ctggggaaga 840

aggtgtcctc ggggatgatg ctgttgttga aggcgttggc gcaggcgaag tcgctcttgt 900

tgctccaggc cacggcgctg ttgctcttga agtccatgct tctcatgtcc agcacgcact 960

tgtcggtgat gtacacgtcg ctgtccttgc tctggctcac gttggtctgg ctgtcgaagt 1020

cggtgaatag gcagacagac ttgtcactgg atttagagtc tctcagctgg tacacggcgg 1080

ggtcggggtt ctggatgtag gggtgcacga tcaggctggt gcctctgcca aaggtgggga 1140

tatagctgcc gccgctggtt ggtctcacgg cacacaggta ggtggcgcta tcgcctggct 1200

ggctggcggc gatatacagg gtgcttctgc cgctgctctt gtccaggctg gcgttcagtc 1260

tgccgctggt ctgctctctc tggctgctct ggatcagcag caggctggtc aggcccttgc 1320

cggggtcctg tctgaaccac tgcaggttgt agatggcgct gtcggtgaag ctgcagttca 1380

gcaccagatt ctcgccttca ggcacgctca gggcggcagg aatctgggtc acctcctgct 1440

tgctgctcac ccactgcagc tgcagccaca ggatcagcag gcccaagagg gtctccatag 1500

gtccagggtt ctcctccacg tctccagcct gcttcagcag gctgaagtta gtagctccgc 1560

ttccgaagtc ctttctcttc accatggcca tcagcaccag ggcgctcacc agcacggcgt 1620

acagggtggc cttgcccagc aggatctcgt acaggatggt ggcgctcagc acgccctgct 1680

ggtagctcac gctggtgaag ccgcagtcgg ctctgcccca ggcctcggcg ctcacgatct 1740

gggtcacggg cttggctctg tcctgggtcc actcgtcgtt ctcgctcagg ccgtagaact 1800

gcacctggca tctgaagtgg tttctggggt tctgccagaa ggtggcgctc actctcagtc 1860

tgctgctcag gcagtatctg ctgtcgttca gggcgggctg ctccttcagg ggctgggggt 1920

cggtgcacac gccgctgtgc acctccttgc cgttcaccca ccagctcagc tccacgtggt 1980

cggggaagaa gcctgtggcc aggcacacca gtgtggcctt ttgggtgtgg ctgatctcgg 2040

cctcgcttgg ctcaaacacg gccacctcag gagggaacac gttcttcagg tcctccagca 2100

cggtcagtct gctgccctcg ccgaagaaca gctcgccggt gttgcccacg tagctgctgg 2160

cgcaaaagta cacgctggtc tggcttgggg cggcagacag cagtctcagt gggaaatcct 2220

cggtggtgct tctgctcacg ttgtagccgt ttggcacctc gccctggtct gtgattccgg 2280

cgcccacgct gtagtggatc agtctcaggc ccatgccggg gtcctgtctg taccagctca 2340

tgtactcgtg gttcatgtcc tgggcgcact gcagggtcat gctctggccg gtcttcagca 2400

cctggaactt aggggtctgt gtcacgccgg cattcactgg tccagcccac agcagagaca 2460

gggcggcaca acacagcagg ccgatgctca tggtggcctc gaggccaaag ttgagcgttt 2520

attctgagct tctgcaaaaa gaacaagaag cttccctata gtgagtcgta ttaatttcga 2580

taagccagta agcagtgggt tctctagtta gccagagggc cgcttcacga cacctgaaat 2640

ggaagaaaaa aactttgaac cactgtctga ggcttgagaa tgaaccaaga tccaaactca 2700

aaaagggcaa attccaagga gaattacatc aagtgccaag ctggcctaac ttcagtctcc 2760

acccactcag tgtggggaaa ctccatcgca taaaacccct ccccccaacc taaagacgac 2820

gtactccaaa agctcgagaa ctaatcgagg tgcctggacg gcgcccggta ctccgtggag 2880

tcacatgaag cgacggctga ggacggaaag gccctttcc tttgtgtggg tgactcaccc 2940

gcccgctctc ccgagcgccg cgtcctccat tttgagctcc ctgcagcagg gccgggaagc 3000

ggccatcttt ccgctcacgc aactggtgcc gaccgggcca gccttgccgc ccagggcggg 3060

gcgatacacg gcggcgcgag gccaggcacc agagcaggcc ggccagcttg agactacccc 3120

cgtccgattc tcggtggccg cgctcgcagg ccccgcctcg ccgaacatgt gcgctgggac 3180

gcacgggccc cgtcgccgcc cgcggcccca aaaaccgaaa taccagtgtg cagatcttgg 3240

cccgcattta caagactatc ttgccagaaa aaaagcgtcg cagcaggtca tcaaaaattt 3300

taaatggcta gagacttatc gaaagcagcg agacaggcgc gaaggtgcca ccagattcgc 3360

acgcggcggc cccagcgccc aggccaggcc tcaactcaag cacgaggcga aggggctcct 3420

taagcgcaag gcctcgaact ctcccaccca cttccaaccc gaagctcggg atcaagaatc 3480

acgtactgca gccaggggcg tggaagtaat tcaaggcacg caagggccat aacccgtaaa 3540

gaggccaggc ccgcgggaac cacacacggc acttacctgt gttctggcgg caaacccgtt 3600

gcgaaaaaga acgttcacgg cgactactgc acttatatac ggttctcccc caccctcggg 3660

aaaaaggcgg agccagtaca cgacatcact ttcccagttt accccgcgcc accttctcta 3720

ggcaccggtt caattgccga cccctccccc caacttctcg gggactgtgg gcgatgtgcg 3780

ctctgcccac tgacgggcac cggagcctca cgactagtca ataatcaatg tcaacgtctg 3840

tctgcctatt caccgattca aacaaatgtg ttaatgtgtc acaaagtaag gattctgtgg 3900

atccgctcta gagtcgacct gcaggcatgc aagcttgcgg ccgcgtattc tatagtgtca 3960

cctaaatagc atggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct 4020

cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg 4080

agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct 4140

gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg 4200

gcgctcttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 4260

ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 4320

aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 4380

ggcgtttttc cataggctcc gcccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 4440

gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 4500

cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 4560

gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt 4620

tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc 4680

cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 4740

cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg 4800

gtggcctaac tacggctaca ctagaagaac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc 4860

agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 4920

cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 4980

tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 5040

tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag 5100

ttttaaatca atctaaagta tatatgttta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat 5160

cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc 5220

cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 5280

accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag 5340

ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg 5400

ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc 5460

tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtatggct tcattcagct ccggttccca 5520

acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg 5580

tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc 5640

actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta 5700

ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc 5760

aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 5820

ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc 5880

cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 5940

aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat 6000

actcatactc ttccttttc aatattatta taagcattta tcagggttat tgtctcatga 6060

gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc 6120

cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa 6180

ataggcgtat cacgaggccc tttcgtc 6207

<210> 2
<211> 6085
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PITCh_1G4改型載體

<400> 2
tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaatattac tacaggcgcc 240

attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300

tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360

tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgagct agtgtaatac gactcactat 420

agggcgcggc cgcagatctc gaggccagat ctgtctgtct gcctattcac cgattgaaga 480

ttttgattca atgtgtcaca aagtaaggag atgcaatttc ctcattttat taggaaagga 540

cagtgggagt ggcaccttcc agggtcaagg aaggcacggg ggaggggcaa acaacagatg 600

gctggcaact agaaggcaca gcccgggtac cgagctcggc tgctccacag tctcagggtc 660

atcagcaggt tgaagccggc caccttcagc agcaggattc tcagcacgat caccagcagg 720

ttctggaagt tcaggttggt gtcggtctcg aagctcttct ccaccagctt cacgtcgcag 780

ctgctctcgg ggctggggaa gaaggtgtcc tcggggatga tgctgttgtt gaaggcgttg 840

gcgcaggcga agtcgctctt gttgctccag gccacggcgc tgttgctctt gaagtccatg 900

cttctcatgt ccagcacgca cttgtcggtg atgtacacgt cgctgtcctt gctctggctc 960

acgttggtct ggctgtcgaa gtcggtgaat aggcagacag acttgtcact ggatttagag 1020

tctctcagct ggtacacggc ggggtcgggg ttctggatgt aggggtgcac gatcaggctg 1080

gtgcctctgc caaaggtggg gatatagctg ccgccgctgg ttggtctcac ggcacacagg 1140

taggtggcgc tatcgcctgg ctggctggcg gcgatataca gggtgcttct gccgctgctc 1200

ttgtccaggc tggcgttcag tctgccgctg gtctgctctc tctggctgct ctggatcagc 1260

agcaggctgg tcaggcccct gccggggtcc tgtctgaacc actgcaggtt gtagatggcg 1320

ctgtcggtga agctgcagtt cagcaccaga ttctcgcctt caggcacgct cagggcggca 1380

ggaatctggg tcacctcctg cttgctgctc acccactgca gctgcagcca caggatcagc 1440

aggcccaaga gggtctccat aggtccaggg ttctcctcca cgtctccagc ctgcttcagc 1500

aggctgaagt tagtagctcc gcttccgaag tcctttctct tcaccatggc catcagcacc 1560

agggcgctca ccagcacggc gtacagggtg gccttgccca gcaggatctc gtacaggatg 1620

gtggcgctca gcacgccctg ctggtagctc acgctggtga agccgcagtc ggctctgccc 1680

caggcctcgg cgctcacgat ctgggtcacg ggcttggctc tgtcctgggt ccactcgtcg 1740

ttctcgctca ggccgtagaa ctgcacctgg catctgaagt ggtttctggg gttctgccag 1800

aaggtggcgc tcactctcag tctgctgctc aggcagtatc tgctgtcgtt cagggcgggc 1860

tgctccttca ggggctgggg gtcggtgcac acgccgctgt gcacctcctt gccgttcacc 1920

caccagctca gctccacgtg gtcggggaag aagcctgtgg ccaggcacac cagtgtggcc 1980

ttttgggtgt ggctgatctc ggcctcgctt ggctcaaaca cggccacctc aggagggaac 2040

acgttcttca ggtcctccag cacggtcagt ctgctgccct cgccgaagaa cagctcgccg 2100

gtgttgccca cgtagctgct ggcgcaaaag tacacgctgg tctggcttgg ggcggcagac 2160

agcagtctca gtgggaaatc ctcggtggtg cttctgctca cgttgtagcc gtttggcacc 2220

tcgccctggt ctgtgattcc ggcgcccacg ctgtagtgga tcagtctcag gcccatgccg 2280

gggtcctgtc tgtaccagct catgtactcg tggttcatgt cctgggcgca ctgcagggtc 2340

atgctctggc cggtcttcag cacctggaac ttaggggtct gtgtcacgcc ggcattcact 2400

ggtccagccc acagcagaga cagggcggca caacacagca ggccgatgct catgaattcc 2460

caaagttgag cgtttattct gagcttctgc aaaaagaaca agtcacgaca cctgaaatgg 2520

aagaaaaaaa ctttgaacca ctgtctgagg cttgagaatg aaccaagatc caaactcaaa 2580

aagggcaaat tccaaggaga attacatcaa gtgccaagct ggcctaactt cagtctccac 2640

ccactcagtg tggggaaact ccatcgcata aaacccctcc ccccaaccta aagacgacgt 2700

actccaaaag ctcgagaact aatcgaggtg cctggacggc gcccggtact ccgtggagtc 2760

acatgaagcg acggctgagg acggaaaggc ccttttcctt tgtgtgggtg actcacccgc 2820

ccgctctccc gagcgccgcg tcctccattt tgagctccct gcagcagggc cgggaagcgg 2880

ccatctttcc gctcacgcaa ctggtgccga ccgggccagc cttgccgccc agggcggggc 2940

gatacacggc ggcgcgaggc caggcaccag agcaggccgg ccagcttgag actacccccg 3000

tccgattctc ggtggccgcg ctcgcaggcc ccgcctcgcc gaacatgtgc gctgggacgc 3060

acgggccccg tcgccgcccg cggccccaaa aaccgaaata ccagtgtgca gatcttggcc 3120

cgcatttaca agactatctt gccagaaaaa aagcgtcgca gcaggtcatc aaaaatttta 3180

aatggctaga gacttatcga aagcagcgag acaggcgcga aggtgccacc agattcgcac 3240

gcggcggccc cagcgcccag gccaggcctc aactcaagca cgaggcgaag gggctcctta 3300

agcgcaaggc ctcgaactct cccacccact tccaacccga agctcgggat caagaatcac 3360

gtactgcagc caggggcgtg gaagtaattc aaggcacgca agggccataa cccgtaaaga 3420

ggccaggccc gcgggaacca cacacggcac ttacctgtgt tctggcggca aacccgttgc 3480

gaaaaagaac gttcacggcg actactgcac ttatatacgg ttctccccca ccctcgggaa 3540

aaaggcggag ccagtacacg acatcacttt cccagtttac cccgcgccac cttctctagg 3600

caccggttca attgccgacc cctcccccca acttctcggg gactgtgggc gatgtgcgct 3660

ctgcccactg acgggcaccg gagcctcacg actagtcaat aatcaatgtc aacgtctgtc 3720

tgcctattca ccgattcaaa caaatgtgtt aatgtgtcac aaagtaagga ttctgtggat 3780

ccgctctaga gtcgacctgc aggcatgcaa gcttgcggcc gcgtattcta tagtgtcacc 3840

taaatagcat ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca 3900

caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag 3960

tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt 4020

cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc 4080

gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg 4140

tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa 4200

agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg 4260

cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga 4320

ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg 4380

tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg 4440

gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc 4500

gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg 4560

gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca 4620

ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggt 4680

ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag 4740

ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg 4800

gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc 4860

ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt 4920

tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt 4980

ttaaatcaat ctaaagtata tatgtttaaa cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca 5040

gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg 5100

tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct gcaatgatac 5160

cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg 5220

ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc 5280

gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt gccattgcta 5340

caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac 5400

gatcaaggcg agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc 5460

ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac 5520

tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact 5580

caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa 5640

tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt 5700

cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca 5760

ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa 5820

aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac 5880

tcatactctt cctttttcaa tattattata agcatttatc agggttattg tctcatgagc 5940

ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc 6000

cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat 6060

aggcgtatca cgaggccctt tcgtc 6085

<210> 3
<211> 6075
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PITCh_NLV48改型載體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1427)..(1427)
<223> n爲a、c、g、t或u

<220>
<221> misc_feature
<222> (1991)..(1991)
<223> n爲a、c、g、t或u

<220>
<221> misc_feature
<222> (2021)..(2021)
<223> n爲a、c、g、t或u

<400> 3
tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcgggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaatattac tacaggcgcc 240

attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300

tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360

tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgagct agtgtaatac gactcactat 420

agggcgcggc cgcagatctc gaggccagat ctgtctgtct gcctattcac cgattgaaga 480

ttttgattca atgtgtcaca aagtaaggag atgcaatttc ctcattttat taggaaagga 540

cagtgggagt ggcaccttcc agggtcaagg aaggcacggg ggaggggcaa acaacagatg 600

gctggcaact agaaggcaca gcccgggtac cgagctcgca gctgctccac agtctcaggg 660

tcatcagcag gttgaagccg gccaccttca gcagcaggat tctcagcacg atcaccagca 720

ggttctggaa gttcaggttg gtgtcggtct cgaagctctt ctccaccagc ttcacgtcgc 780

agctgctctc ggggctgggg aagaaggtgt cctcggggat gatgctgttg ttgaaggcgt 840

tggcgcaggc gaagtcgctc ttgttgctcc aggccacggc gctgttgctc ttgaagtcca 900

tgcttctcat gtccagcacg cacttgtcgg tgatgtacac gtcgctgtcc ttgctctggc 960

tcacgttggt ctggctgtcg aagtcggtga ataggcagac agacttgtca ctggatttag 1020

agtctctcag ctggtacacg gcagggtcag ggttctggat atagggcagc acggacaatc 1080

tggttccggg accaaagaca aaattctgac cataatagtc agcacagaag tacaaagcgg 1140

agtcgctcac aagggcagat ggtttcttca ggtggaagga ggtttggctc ttgttaaatt 1200

cagcttcaaa gccatagctg cctttaacca ggttatcccc tgtgatgtat ttcagaagga 1260

actggaggcc tcggttgggg tattgaacat accaaaaaag ataagggttt ccagagactg 1320

aataggtgca tttcacagtc agaggattcc cttcagcaac gttgacctga tcttccggct 1380

gagccactga ctgagctctc agcccactca atgtgaagag catcgcnagc atcgagatgg 1440

gtgcagaggc cataggtcca gggttctcct ccacgtctcc agcctgcttc agcaggctga 1500

agttagtagc tccgcttccg aagtcctttc tcttcaccat ggccatcagc accagggcgc 1560

tcaccagcac ggcgtacagg gtggccttgc ccagcaggat ctcgtacagg atggtggcgc 1620

tcagcacgcc ctgctggtag ctcacgctgg tgaagccgca gtcggctctg ccccaggcct 1680

cggcgctcac gatctgggtc acgggcttgg ctctgtcctg ggtccactcg tcgttctcgc 1740

tcaggccgta gaactgcacc tggcatctga agtggtttct ggggttctgc cagaaggtgg 1800

cgctcactct cagtctgctg ctcaggcagt atctgctgtc gttcagggcg ggctgctcct 1860

tcaggggctg ggggtcggtg cacacgccgc tgtgcacctc cttgccgttc acccaccagc 1920

tcagctccac gtggtcaggg aagaagcctg tggccaggca caccagtgtg gccttttggg 1980

tgtgggagat ntctgcttct gatggctcaa acacagcgac ntcgggtggg aacaccttgt 2040

tcaggtcctc tacaactgtg agtctggtgc cttgtccaaa gaaagcttca gtgaacccct 2100

ggaaactgct ggcacagagg tacatagatg tctggttggt gctggcggac tccagaatca 2160

gggagaagcg ctccttcttc tctctagaga cactgtaccc ctcaggaata tctccttttt 2220

ctttcatttt aacatcatat gagaaataga tccgccgtag ccccagacct gggtcttgtc 2280

gataccagaa catattttca tggtccatat cctggacaca ttccagaaaa actttctctc 2340

ccgtcctttt gactagatat ctcgagctct gggttacttt cacatctacg aggcctacag 2400

ccaggaaaca aaaggccaca cgacagagga gcctggtgcc catgaattcc caaagttgag 2460

cgtttattct gagcttctgc aaaaagaaca agtcacgaca cctgaaatgg aagaaaaaaa 2520

ctttgaacca ctgtctgagg cttgagaatg aaccaagatc caaactcaaa aagggcaaat 2580

tccaaggaga attacatcaa gtgccaagct ggcctaactt cagtctccac ccactcagtg 2640

tggggaaact ccatcgcata aaacccctcc ccccaaccta aagacgacgt actccaaaag 2700

ctcgagaact aatcgaggtg cctggacggc gcccggtact ccgtggagtc acatgaagcg 2760

acggctgagg acggaaaggc ccttttcctt tgtgtgggtg actcacccgc ccgctctccc 2820

gagcgccgcg tcctccattt tgagctccct gcagcagggc cgggaagcgg ccatctttcc 2880

gctcacgcaa ctggtgccga ccgggccagc cttgccgccc agggcggggc gatacacggc 2940

ggcgcgaggc caggcaccag agcaggccgg ccagcttgag actacccccg tccgattctc 3000

ggtggccgcg ctcgcaggcc ccgcctcgcc gaacatgtgc gctgggacgc acgggccccg 3060

tcgccgcccg cggccccaaa aaccgaaata ccagtgtgca gatcttggcc cgcatttaca 3120

agactatctt gccagaaaaa aagcgtcgca gcaggtcatc aaaaatttta aatggctaga 3180

gacttatcga aagcagcgag acaggcgcga aggtgccacc agattcgcac gcggcggccc 3240

cagcgcccag gccaggcctc aactcaagca cgaggcgaag gggctcctta agcgcaaggc 3300

ctcgaactct cccacccact tccaacccga agctcgggat caagaatcac gtactgcagc 3360

caggggcgtg gaagtaattc aaggcacgca agggccataa cccgtaaaga ggccaggccc 3420

gcgggaacca cacacggcac ttacctgtgt tctggcggca aacccgttgc gaaaaagaac 3480

gttcacggcg actactgcac ttatatacgg ttctccccca ccctcgggaa aaaggcggag 3540

ccagtacacg acatcacttt cccagtttac cccgcgccac cttctctagg caccggttca 3600

attgccgacc cctccccccca acttctcggg gactgtgggc gatgtgcgct ctgcccactg 3660

acgggcaccg gagcctcacg actagtcaat aatcaatgtc aacgtctgtc tgcctattca 3720

ccgattcaaa caaatgtgtt aatgtgtcac aaagtaagga ttctgtggat ccgctctaga 3780

gtcgacctgc aggcatgcaa gcttgcggcc gcgtattcta tagtgtcacc taaatagcat 3840

ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 3900

caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag tgagctaact 3960

cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 4020

gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc 4080

ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 4140

ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 4200

agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgttttttcca 4260

taggctccgc ccccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 4320

cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 4380

tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 4440

gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct 4500

gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 4560

tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 4620

gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggt ggcctaacta 4680

cggctacact agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 4740

aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt 4800

tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 4860

ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggtcatgag 4920

attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat 4980

ctaaagtata tatgtttaaa cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 5040

tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat 5100

aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc 5160

acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 5220

aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag 5280

agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt 5340

ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 5400

agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 5460

tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc 5520

tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 5580

attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa 5640

taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg 5700

aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca ctcgtgcacc 5760

caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag 5820

gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 5880

ccttttttcaa tattattata agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat 5940

ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc 6000

cacctgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca 6060

cgaggccctt tcgtc 6075

<210> 4
<211> 477
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PITCh_1G4載體骨架

<400> 4
tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcgggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaatattac tacaggcgcc 240

attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300

tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360

tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgagct agtgtaatac gactcactat 420

agggcgcggc cgcagaattc gagctcggta cccgggatct cgaggccaga tctgtct 477

<210> 5
<211> 2312
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PITCh_1G4載體骨架

<400> 5
tgtggatccg ctctagagtc gacctgcagg catgcaagct tgcggccgcg tattctatag 60

tgtcacctaa atagcatggc gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg aaattgttat 120

ccgctcacaa ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc 180

taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgcttt ccagtcggga 240

aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt 300

attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg 360

cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac 420

gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg 480

ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca 540

agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc 600

tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc 660

ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag 720

gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc 780

ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca 840

gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg 900

aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg 960

aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct 1020

ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 1080

gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa 1140

gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 1200

tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gtttaaactt ggtctgacag ttaccaatgc 1260

ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga 1320

ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgctgca 1380

atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc 1440

ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat 1500

tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc 1560

attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt 1620

tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc 1680

ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg 1740

gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt 1800

gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg 1860

gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga 1920

aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg 1980

taacccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg 2040

tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt 2100

tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattaagc atttatcagg gttattgtct 2160

catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 2220

atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta 2280

taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tc 2312

<210> 6
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PITCh_1G4改型載體骨架

<400> 6
tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcgggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaatattac tacaggcgcc 240

attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300

tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360

tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgagct agtgtaatac gactcactat 420

agggcgcggc cgcagatctc gaggccagat ctgtct 456

<210> 7
<211> 2312
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PITCh_1G4改型載體骨架

<400> 7

tgtggatccg ctctagagtc gacctgcagg catgcaagct tgcggccgcg tattctatag 60

tgtcacctaa atagcatggc gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg aaattgttat 120

ccgctcacaa ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc 180

taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgcttt ccagtcggga 240

aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt 300

attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg 360

cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac 420

gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg 480

ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca 540

agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc 600

tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc 660

ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag 720

gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc 780

ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca 840

gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg 900

aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg 960

aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct 1020

ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 1080

gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa 1140

gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 1200

tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gtttaaactt ggtctgacag ttaccaatgc 1260

ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga 1320

ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgctgca 1380

atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc 1440

ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat 1500

tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc 1560

attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt 1620

tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc 1680

ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg 1740

gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt 1800

gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg 1860

gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga 1920

aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg 1980

taacccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg 2040

tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt 2100

tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattaagc atttatcagg gttattgtct 2160

catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 2220

atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta 2280

taaaaatagg cgtatcacga ggcccttttcg tc 2312

<210> 8
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PITCh_NLV48改型載體骨架

<400> 8
tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcgggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaatattac tacaggcgcc 240

attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300

tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360

tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgagct agtgtaatac gactcactat 420

agggcgcggc cgcagatctc gaggccagat ctgtct 456

<210> 9
<211> 2312
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PITCh_NLV48改型載體骨架

<400> 9
tgtggatccg ctctagagtc gacctgcagg catgcaagct tgcggccgcg tattctatag 60

tgtcacctaa atagcatggc gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg aaattgttat 120

ccgctcacaa ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc 180

taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgcttt ccagtcggga 240

aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt 300

attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg 360

cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac 420

gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg 480

ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca 540

agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc 600

tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc 660

ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag 720

gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc 780

ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca 840

gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg 900

aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg 960

aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct 1020

ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 1080

gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa 1140

gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 1200

tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gtttaaactt ggtctgacag ttaccaatgc 1260

ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga 1320

ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgctgca 1380

atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc 1440

ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat 1500

tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc 1560

attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt 1620

tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc 1680

ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg 1740

gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt 1800

gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg 1860

gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga 1920

aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg 1980

taacccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg 2040

tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt 2100

tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattataagc atttatcagg gttattgtct 2160

catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 2220

atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta 2280

taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tc 2312

<210> 10
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 左TALEN部位

<400> 10
gtctgcctat tcaccgattg aagattttga ttcaatgtgt cacaaagtaa ggattc 56

<210> 11
<211> 61
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 右TALEN部位

<400> 11
cgtctgtctg cctattcacc gattcaaaca aatgtgttaa tgtgtcacaa agtaaggatt 60

c 61

<210> 12
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 左TALEN部位

<400> 12
gtctgcctat tcaccgattg aagattttga ttcaatgtgt cacaaagtaa gga 53

<210> 13
<211> 61
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 右TALEN部位

<400> 13
cgtctgtctg cctattcacc gattcaaaca aatgtgttaa tgtgtcacaa agtaaggatt 60

c 61

<210> 14
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 左TALEN部位

<400> 14
gtctgcctat tcaccgattg aagattttga ttcaatgtgt cacaaagtaa gga 53

<210> 15
<211> 61
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 右TALEN部位

<400> 15
cgtctgtctg cctattcacc gattcaaaca aatgtgttaa tgtgtcacaa agtaaggatt 60

c 61

<210> 16
<211> 3301
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PITCh_1G4載體匣

<400> 16
gatgcaattt cctcatttta ttaggaaagg acagtgggag tggcaccttc cagggtcaag 60

gaaggcacgg gggaggggca aacaacagat ggctggcaac tagaaggcac agtcgaggct 120

gatttttacg tagcggccgc tcagctgctc cacagtctca gggtcatcag caggttgaag 180

ccggccacct tcagcagcag gattctcagc acgatcacca gcaggttctg gaagttcagg 240

ttggtgtcgg tctcgaagct cttctccacc agcttcacgt cgcagctgct ctcggggctg 300

gggaagaagg tgtcctcggg gatgatgctg ttgttgaagg cgttggcgca ggcgaagtcg 360

ctcttgttgc tccaggccac ggcgctgttg ctcttgaagt ccatgcttct catgtccagc 420

acgcacttgt cggtgatgta cacgtcgctg tccttgctct ggctcacgtt ggtctggctg 480

tcgaagtcgg tgaataggca gacagacttg tcactggatt tagagtctct cagctggtac 540

acggcggggt cggggttctg gatgtagggg tgcacgatca ggctggtgcc tctgccaaag 600

gtggggatat agctgccgcc gctggttggt ctcacggcac acaggtaggt ggcgctatcg 660

cctggctggc tggcggcgat atacagggtg cttctgccgc tgctcttgtc caggctggcg 720

ttcagtctgc cgctggtctg ctctctctgg ctgctctgga tcagcagcag gctggtcagg 780

cccttgccgg ggtcctgtct gaaccactgc aggttgtaga tggcgctgtc ggtgaagctg 840

cagttcagca ccagattctc gccttcaggc acgctcaggg cggcaggaat ctgggtcacc 900

tcctgcttgc tgctcaccca ctgcagctgc agccacagga tcagcaggcc caagagggtc 960

tccataggtc cagggttctc ctccacgtct ccagcctgct tcagcaggct gaagttagta 1020

gctccgcttc cgaagtcctt tctcttcacc atggccatca gcaccagggc gctcaccagc 1080

acggcgtaca gggtggcctt gcccagcagg atctcgtaca ggatggtggc gctcagcacg 1140

ccctgctggt agctcacgct ggtgaagccg cagtcggctc tgccccaggc ctcggcgctc 1200

acgatctggg tcacgggctt ggctctgtcc tgggtccact cgtcgttctc gctcaggccg 1260

tagaactgca cctggcatct gaagtggttt ctggggttct gccagaaggt ggcgctcact 1320

ctcagtctgc tgctcaggca gtatctgctg tcgttcaggg cgggctgctc cttcaggggc 1380

tgggggtcgg tgcacacgcc gctgtgcacc tccttgccgt tcacccacca gctcagctcc 1440

acgtggtcgg ggaagaagcc tgtggccagg cacaccagtg tggccttttg ggtgtggctg 1500

atctcggcct cgcttggctc aaacacggcc acctcaggag ggaacacgtt cttcaggtcc 1560

tccagcacgg tcagtctgct gccctcgccg aagaacagct cgccggtgtt gcccacgtag 1620

ctgctggcgc aaaagtacac gctggtctgg cttggggcgg cagacagcag tctcagtggg 1680

aaatcctcgg tggtgcttct gctcacgttg tagccgtttg gcacctcgcc ctggtctgtg 1740

attccggcgc ccacgctgta gtggatcagt ctcaggccca tgccggggtc ctgtctgtac 1800

cagctcatgt actcgtggtt catgtcctgg gcgcactgca gggtcatgct ctggccggtc 1860

ttcagcacct ggaacttagg ggtctgtgtc acgccggcat tcactggtcc agcccacagc 1920

agagacaggg cggcacaaca cagcaggccg atgctcatgg tggcctcgag gccaaagttg 1980

agcgtttatt ctgagcttct gcaaaaagaa caagaagctt ccctatagtg agtcgtatta 2040

atttcgataa gccagtaagc agtgggttct ctagttagcc agagggccgc ttcacgacac 2100

ctgaaatgga agaaaaaaac tttgaaccac tgtctgaggc ttgagaatga accaagatcc 2160

aaactcaaaa agggcaaatt ccaaggagaa ttacatcaag tgccaagctg gcctaacttc 2220

agtctccacc cactcagtgt ggggaaactc catcgcataa aacccctccc cccaacctaa 2280

agacgacgta ctccaaaagc tcgagaacta atcgaggtgc ctggacggcg cccggtactc 2340

cgtggagtca catgaagcga cggctgagga cggaaaggcc cttttccttt gtgtgggtga 2400

ctcacccgcc cgctctcccg agcgccgcgt cctccatttt gagctccctg cagcagggcc 2460

gggaagcggc catctttccg ctcacgcaac tggtgccgac cgggccagcc ttgccgccca 2520

gggcgggggcg atacacggcg gcgcgaggcc aggcaccaga gcaggccggc cagcttgaga 2580

ctacccccgt ccgattctcg gtggccgcgc tcgcaggccc cgcctcgccg aacatgtgcg 2640

ctgggacgca cgggcccccgt cgccgcccgc ggccccaaaa accgaaatac cagtgtgcag 2700

atcttggccc gcatttacaa gactatcttg ccagaaaaaa agcgtcgcag caggtcatca 2760

aaaattttaa atggctagag acttatcgaa agcagcgaga caggcgcgaa ggtgccacca 2820

gattcgcacg cggcggcccc agcgcccagg ccaggcctca actcaagcac gaggcgaagg 2880

ggctccttaa gcgcaaggcc tcgaactctc ccacccactt ccaacccgaa gctcgggatc 2940

aagaatcacg tactgcagcc aggggcgtgg aagtaattca aggcacgcaa gggccataac 3000

ccgtaaagag gccaggcccg cgggaaccac acacggcact tacctgtgtt ctggcggcaa 3060

acccgttgcg aaaaagaacg ttcacggcga ctactgcact tatatacggt tctcccccac 3120

cctcgggaaa aaggcggagc cagtacacga catcactttc ccagtttacc ccgcgccacc 3180

ttctctaggc accggttcaa ttgccgaccc ctccccccaa cttctcgggg actgtgggcg 3240

atgtgcgctc tgcccactga cgggcaccgg agcctcacga ctagtcaata atcaatgtca 3300

a 3301

<210> 17
<211> 3203
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PITCh_1G4改型載體匣

<400> 17
gatgcaattt cctcatttta ttaggaaagg acagtgggag tggcaccttc cagggtcaag 60

gaaggcacgg gggaggggca aacaacagat ggctggcaac tagaaggcac agcccgggta 120

ccgagctcgg ctgctccaca gtctcagggt catcagcagg ttgaagccgg ccaccttcag 180

cagcaggatt ctcagcacga tcaccagcag gttctggaag ttcaggttgg tgtcggtctc 240

gaagctcttc tccaccagct tcacgtcgca gctgctctcg gggctgggga agaaggtgtc 300

ctcggggatg atgctgttgt tgaaggcgtt ggcgcaggcg aagtcgctct tgttgctcca 360

ggccacggcg ctgttgctct tgaagtccat gcttctcatg tccagcacgc acttgtcggt 420

gatgtacacg tcgctgtcct tgctctggct cacgttggtc tggctgtcga agtcggtgaa 480

taggcagaca gacttgtcac tggatttaga gtctctcagc tggtacacgg cggggtcggg 540

gttctggatg taggggtgca cgatcaggct ggtgcctctg ccaaaggtgg ggatatagct 600

gccgccgctg gttggtctca cggcacacag gtaggtggcg ctatcgcctg gctggctggc 660

ggcgatatac agggtgcttc tgccgctgct cttgtccagg ctggcgttca gtctgccgct 720

ggtctgctct ctctggctgc tctggatcag cagcaggctg gtcaggccct tgccggggtc 780

ctgtctgaac cactgcaggt tgtagatggc gctgtcggtg aagctgcagt tcagcaccag 840

attctcgcct tcaggcacgc tcagggcggc aggaatctgg gtcacctcct gcttgctgct 900

cacccactgc agctgcagcc acaggatcag caggcccaag agggtctcca taggtccagg 960

gttctcctcc acgtctccag cctgcttcag caggctgaag ttagtagctc cgcttccgaa 1020

gtcctttctc ttcaccatgg ccatcagcac cagggcgctc accagcacgg cgtacagggt 1080

ggccttgccc agcaggatct cgtacaggat ggtggcgctc agcacgccct gctggtagct 1140

cacgctggtg aagccgcagt cggctctgcc ccaggcctcg gcgctcacga tctgggtcac 1200

gggcttggct ctgtcctggg tccactcgtc gttctcgctc aggccgtaga actgcacctg 1260

gcatctgaag tggtttctgg ggttctgcca gaaggtggcg ctcactctca gtctgctgct 1320

caggcagtat ctgctgtcgt tcagggcggg ctgctccttc aggggctggg ggtcggtgca 1380

cacgccgctg tgcacctcct tgccgttcac ccaccagctc agctccacgt ggtcggggaa 1440

gaagcctgtg gccaggcaca ccagtgtggc cttttgggtg tggctgatct cggcctcgct 1500

tggctcaaac acggccacct caggagggaa cacgttcttc aggtcctcca gcacggtcag 1560

tctgctgccc tcgccgaaga acagctcgcc ggtgttgccc acgtagctgc tggcgcaaaa 1620

gtacacgctg gtctggcttg gggcggcaga cagcagtctc agtgggaaat cctcggtggt 1680

gcttctgctc acgttgtagc cgtttggcac ctcgccctgg tctgtgattc cggcgcccac 1740

gctgtagtgg atcagtctca ggcccatgcc ggggtcctgt ctgtaccagc tcatgtactc 1800

gtggttcatg tcctgggcgc actgcagggt catgctctgg ccggtcttca gcacctggaa 1860

cttaggggtc tgtgtcacgc cggcattcac tggtccagcc cacagcagag acagggcggc 1920

acaacacagc aggccgatgc tcatgaattc ccaaagttga gcgtttattc tgagcttctg 1980

caaaaagaac aagtcacgac acctgaaatg gaagaaaaaa actttgaacc actgtctgag 2040

gcttgagaat gaaccaagat ccaaactcaa aaagggcaaa ttccaaggag aattacatca 2100

agtgccaagc tggcctaact tcagtctcca cccactcagt gtggggaaac tccatcgcat 2160

aaaacccctc cccccaacct aaagacgacg tactccaaaa gctcgagaac taatcgaggt 2220

gcctggacgg cgcccggtac tccgtggagt cacatgaagc gacggctgag gacggaaagg 2280

ccctttcct ttgtgtgggt gactcacccg cccgctctcc cgagcgccgc gtcctccatt 2340

ttgagctccc tgcagcaggg ccgggaagcg gccatctttc cgctcacgca actggtgccg 2400

accgggccag ccttgccgcc cagggcgggg cgatacacgg cggcgcgagg ccaggcacca 2460

gagcaggccg gccagcttga gactaccccc gtccgattct cggtggccgc gctcgcaggc 2520

cccgcctcgc cgaacatgtg cgctgggacg cacgggcccc gtcgccgccc gcggccccaa 2580

aaaccgaaat accagtgtgc agatcttggc ccgcatttac aagactatct tgccagaaaa 2640

aaagcgtcgc agcaggtcat caaaaatttt aaatggctag agacttatcg aaagcagcga 2700

gacaggcgcg aaggtgccac cagattcgca cgcggcggcc ccagcgccca ggccaggcct 2760

caactcaagc acgaggcgaa ggggctcctt aagcgcaagg cctcgaactc tcccacccac 2820

ttccaacccg aagctcggga tcaagaatca cgtactgcag ccaggggcgt ggaagtaatt 2880

caaggcacgc aagggccata acccgtaaag aggccaggcc cgcgggaacc acacacggca 2940

cttacctgtg ttctggcggc aaacccgttg cgaaaaagaa cgttcacggc gactactgca 3000

cttatatacg gttctccccc accctcggga aaaaggcgga gccagtacac gacatcactt 3060

tcccagttta ccccgcgcca ccttctctag gcaccggttc aattgccgac ccctcccccc 3120

aacttctcgg ggactgtggg cgatgtgcgc tctgcccact gacgggcacc ggagcctcac 3180

gactagtcaa taatcaatgt caa 3203

<210> 18
<211> 3193
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PITCh_NLV48改型載體匣

<220>
<221> misc_feature
<222> (918)..(918)
<223> n爲a、c、g、t或u

<220>
<221> misc_feature
<222> (1482)..(1482)
<223> n爲a、c、g、t或u

<220>
<221> misc_feature
<222> (1512)..(1512)
<223> n爲a、c、g、t或u

<400> 18
gatgcaattt cctcatttta ttaggaaagg acagtgggag tggcaccttc cagggtcaag 60

gaaggcacgg gggaggggca aacaacagat ggctggcaac tagaaggcac agcccgggta 120

ccgagctcgc agctgctcca cagtctcagg gtcatcagca ggttgaagcc ggccaccttc 180

agcagcagga ttctcagcac gatcaccagc aggttctgga agttcaggtt ggtgtcggtc 240

tcgaagctct tctccaccag cttcacgtcg cagctgctct cggggctggg gaagaaggtg 300

tcctcgggga tgatgctgtt gttgaaggcg ttggcgcagg cgaagtcgct cttgttgctc 360

caggccacgg cgctgttgct cttgaagtcc atgcttctca tgtccagcac gcacttgtcg 420

gtgatgtaca cgtcgctgtc cttgctctgg ctcacgttgg tctggctgtc gaagtcggtg 480

aataggcaga cagacttgtc actggattta gagtctctca gctggtacac ggcagggtca 540

gggttctgga tatagggcag cacggacaat ctggttccgg gaccaaagac aaaattctga 600

ccataatagt cagcacagaa gtacaaagcg gagtcgctca caagggcaga tggtttcttc 660

aggtggaagg aggtttggct cttgttaaat tcagcttcaa agccatagct gcctttaacc 720

aggttatccc ctgtgatgta tttcagaagg aactggaggc ctcggttggg gtattgaaca 780

taccaaaaaa gataagggtt tccagagact gaataggtgc atttcacagt cagaggattc 840

ccttcagcaa cgttgacctg atcttccggc tgagccactg actgagctct cagcccactc 900

aatgtgaaga gcatcgcnag catcgagatg ggtgcagagg ccataggtcc agggttctcc 960

tccacgtctc cagcctgctt cagcaggctg aagttagtag ctccgcttcc gaagtccttt 1020

ctcttcacca tggccatcag caccagggcg ctcaccagca cggcgtacag ggtggccttg 1080

cccagcagga tctcgtacag gatggtggcg ctcagcacgc cctgctggta gctcacgctg 1140

gtgaagccgc agtcggctct gccccaggcc tcggcgctca cgatctgggt cacgggcttg 1200

gctctgtcct gggtccactc gtcgttctcg ctcaggccgt agaactgcac ctggcatctg 1260

aagtggtttc tggggttctg ccagaaggtg gcgctcactc tcagtctgct gctcaggcag 1320

tatctgctgt cgttcagggc gggctgctcc ttcaggggct gggggtcggt gcacacgccg 1380

ctgtgcacct ccttgccgtt cacccaccag ctcagctcca cgtggtcagg gaagaagcct 1440

gtggccaggc acaccagtgt ggcctttttgg gtgtgggaga tntctgcttc tgatggctca 1500

aacacagcga cntcgggtgg gaacaccttg ttcaggtcct ctacaactgt gagtctggtg 1560

ccttgtccaa agaaagcttc agtgaacccc tggaaactgc tggcacagag gtacatagat 1620

gtctggttgg tgctggcgga ctccagaatc agggagaagc gctccttctt ctctctagag 1680

acactgtacc cctcaggaat atctcctttt tctttcattt taacatcata tgagaaatag 1740

atccgccgta gccccagacc tgggtcttgt cgataccaga acatattttc atggtccata 1800

tcctggacac attccagaaa aactttctct cccgtccttt tgactagata tctcgagctc 1860

tgggttactt tcacatctac gaggcctaca gccaggaaac aaaaggccac acgacagagg 1920

agcctggtgc ccatgaattc ccaaagttga gcgtttattc tgagcttctg caaaaagaac 1980

aagtcacgac acctgaaatg gaagaaaaaa actttgaacc actgtctgag gcttgagaat 2040

gaaccaagat ccaaactcaa aaagggcaaa ttccaaggag aattacatca agtgccaagc 2100

tggcctaact tcagtctcca cccactcagt gtggggaaac tccatcgcat aaaacccctc 2160

cccccaacct aaagacgacg tactccaaaa gctcgagaac taatcgaggt gcctggacgg 2220

cgcccggtac tccgtggagt cacatgaagc gacggctgag gacggaaagg ccctttcct 2280

ttgtgtgggt gactcacccg cccgctctcc cgagcgccgc gtcctccatt ttgagctccc 2340

tgcagcaggg ccgggaagcg gccatctttc cgctcacgca actggtgccg accgggccag 2400

ccttgccgcc cagggcgggg cgatacacgg cggcgcgagg ccaggcacca gagcaggccg 2460

gccagcttga gactaccccc gtccgattct cggtggccgc gctcgcaggc cccgcctcgc 2520

cgaacatgtg cgctgggacg cacgggcccc gtcgccgccc gcggccccaa aaaccgaaat 2580

accagtgtgc agatcttggc ccgcatttac aagactatct tgccagaaaa aaagcgtcgc 2640

agcaggtcat caaaaatttt aaatggctag agacttatcg aaagcagcga gacaggcgcg 2700

aaggtgccac cagattcgca cgcggcggcc ccagcgccca ggccaggcct caactcaagc 2760

acgaggcgaa ggggctcctt aagcgcaagg cctcgaactc tcccacccac ttccaacccg 2820

aagctcggga tcaagaatca cgtactgcag ccaggggcgt ggaagtaatt caaggcacgc 2880

aagggccata acccgtaaag aggccaggcc cgcgggaacc acacacggca cttacctgtg 2940

ttctggcggc aaacccgttg cgaaaaagaa cgttcacggc gactactgca cttatatacg 3000

gttctccccc accctcggga aaaaggcgga gccagtacac gacatcactt tcccagttta 3060

ccccgcgcca ccttctctag gcaccggttc aattgccgac ccctcccccc aacttctcgg 3120

ggactgtggg cgatgtgcgc tctgcccact gacgggcacc ggagcctcac gactagtcaa 3180

taatcaatgt caa 3193

<210> 19
<211> 112
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> bGH Poly(A)訊息

<400> 19
gatgcaattt cctcatttta ttaggaaagg acagtgggag tggcaccttc cagggtcaag 60

gaaggcacgg gggaggggca aacaacagat ggctggcaac tagaaggcac ag 112

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

<220>
<223> P2A序列

<400> 20
taggtccagg gttctcctcc acgtctccag cctgcttcag caggctgaag ttagtagc 58

<210> 21
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 爪蟾血球蛋白5'-UTR

<400> 21
ccaaagttga gcgtttattc tgagcttctg caaaaagaac aag 43

<210> 22
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> T7啓動子

<400> 22
cctatagtga gtcgtatta 19

<210> 23
<211> 1182
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EF-1a啓動子

<400> 23
tcacgacacc tgaaatggaa gaaaaaaact ttgaaccact gtctgaggct tgagaatgaa 60

ccaagatcca aactcaaaaa gggcaaattc caaggagaat tacatcaagt gccaagctgg 120

cctaacttca gtctccaccc actcagtgtg gggaaactcc atcgcataaa acccctcccc 180

ccaacctaaa gacgacgtac tccaaaagct cgagaactaa tcgaggtgcc tggacggcgc 240

ccggtactcc gtggagtcac atgaagcgac ggctgaggac ggaaaggccc ttttcctttg 300

tgtgggtgac tcacccgccc gctctcccga gcgccgcgtc ctccattttg agctccctgc 360

agcagggccg ggaagcggcc atctttccgc tcacgcaact ggtgccgacc gggccagcct 420

tgccgcccag ggcggggcga tacacggcgg cgcgaggcca ggcaccagag caggccggcc 480

agcttgagac taccccgtc cgattctcgg tggccgcgct cgcaggcccc gcctcgccga 540

acatgtgcgc tgggacgcac gggccccgtc gccgcccgcg gccccaaaaa ccgaaatacc 600

agtgtgcaga tcttggcccg catttacaag actatcttgc cagaaaaaaa gcgtcgcagc 660

aggtcatcaa aaattttaaa tggctagaga cttatcgaaa gcagcgagac aggcgcgaag 720

gtgccaccag attcgcacgc ggcggcccca gcgcccaggc caggcctcaa ctcaagcacg 780

aggcgaaggg gctccttaag cgcaaggcct cgaactctcc cacccacttc caacccgaag 840

ctcgggatca agaatcacgt actgcagcca ggggcgtgga agtaattcaa ggcacgcaag 900

ggccataacc cgtaaagagg ccaggcccgc gggaaccaca cacggcactt acctgtgttc 960

tggcggcaaa cccgttgcga aaaagaacgt tcacggcgac tactgcactt atatacggtt 1020

ctccccccacc ctcgggaaaa aggcggagcc agtacacgac atcactttcc cagtttaccc 1080

cgcgccacct tctctaggca ccggttcaat tgccgacccc tccccccaac ttctcgggga 1140

ctgtgggcga tgtgcgctct gcccactgac gggcaccgga gc 1182

<210> 24
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子序列

<400> 24
ctctgcatga ctcactagca ctctat 26

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

<220>
<223> 引子序列

<400> 25
agaccgacac caacctgaac 20

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

<220>

<223> 引子序列

<400> 26
tggctaggaa ggtggatgag 20

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

<220>
<223> 引子序列

<400> 27
atcgtgctga gaatcctgct 20

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

<220>
<223> 引子序列

<400> 28
cacggcgact actgcactta 20

<210> 29
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子序列

<400> 29
gactgactta gtgagctggg aaagat 26

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

<220>
<223> 引子序列

<400> 30
ggagccagta cacgacatca 20

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

<220>
<223> 引子序列

<400> 31
tttggcagac agggagaaat 20

<210> 32
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 5'載體重疊序列

<400> 32
taaacgctca actttggt 18

<210> 33
<211> 933
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CMV特異性TCRβ

<220>
<221> misc_feature
<222> (423)..(423)
<223> n爲a、c、g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (453)..(453)
<223> n爲a、c、g或t

<400> 33
atgggcacca ggctcctctg tcgtgtggcc ttttgtttcc tggctgtagg cctcgtagat 60

gtgaaagtaa cccagagctc gagatatcta gtcaaaagga cgggagagaa agtttttctg 120

gaatgtgtcc aggatatgga ccatgaaaat atgttctggt atcgacaaga cccaggtctg 180

gggctacggc ggatctattt ctcatatgat gttaaaatga aagaaaaagg agatattcct 240

gaggggtaca gtgtctctag agagaagaag gagcgcttct ccctgattct ggagtccgcc 300

agcaccaacc agacatctat gtacctctgt gccagcagtt tccaggggtt cactgaagct 360

ttctttggac aaggcaccag actcacagtt gtagaggacc tgaacaaggt gttcccaccc 420

gangtcgctg tgtttgagcc atcagaagca ganatctccc acacccaaaa ggccacactg 480

gtgtgcctgg ccacaggctt cttccctgac cacgtggagc tgagctggtg ggtgaacggc 540

aaggaggtgc acagcggcgt gtgcaccgac ccccagcccc tgaaggagca gcccgccctg 600

aacgacagca gatactgcct gagcagcaga ctgagagtga gcgccacctt ctggcagaac 660

cccagaaacc acttcagatg ccaggtgcag ttctacggcc tgagcgagaa cgacgagtgg 720

acccaggaca gagccaagcc cgtgacccag atcgtgagcg ccgaggcctg gggcagagcc 780

gactgcggct tcaccagcgt gagctaccag cagggcgtgc tgagcgccac catcctgtac 840

gagatcctgc tgggcaaggc caccctgtac gccgtgctgg tgagcgccct ggtgctgatg 900

gccatggtga agagaaagga cttcggaagc gga 933

<210> 34
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> GSG P2A

<400> 34
ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct 60

ggacct 66

<210> 35
<211> 816
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CMV特異性TCRα

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> n爲a、c、g或t

<400> 35
atggcctctg cacccatctc gatgctngcg atgctcttca cattgagtgg gctgagagct 60

cagtcagtgg ctcagccgga agatcaggtc aacgttgctg aagggaatcc tctgactgtg 120

aaatgcacct attcagtctc tggaaaccct tatcttttt ggtatgttca ataccccaac 180

cgaggcctcc agttccttct gaaatacatc acaggggata acctggttaa aggcagctat 240

ggctttgaag ctgaatttaa caagagccaa acctccttcc acctgaagaa accatctgcc 300

cttgtgagcg actccgcttt gtacttctgt gctgactatt atggtcagaa ttttgtcttt 360

ggtcccggaa ccagattgtc cgtgctgccc tatatccaga accctgaccc tgccgtgtac 420

cagctgagag actctaaatc cagtgacaag tctgtctgcc tattcaccga cttcgacagc 480

cagaccaacg tgagccagag caaggacagc gacgtgtaca tcaccgacaa gtgcgtgctg 540

gacatgagaa gcatggactt caagagcaac agcgccgtgg cctggagcaa caagagcgac 600

ttcgcctgcg ccaacgcctt caacaacagc atcatccccg aggacacctt cttccccagc 660

cccgagagca gctgcgacgt gaagctggtg gagaagagct tcgagaccga caccaacctg 720

aacttccaga acctgctggt gatcgtgctg agaatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc 780

aacctgctga tgaccctgag actgtggagc agctga 816

<210> 36
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 3'載體重疊序列

<400> 36
gcaactagaa ggcacagt 18

<210> 37
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 5'載體重疊序列

<400> 37
taaacgctca actttggt 18

<210> 38
<211> 1530
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類CD19特異性嵌合抗原受體

<400> 38
atgacccaga ccacaagcag cctgtctgcc agcctgggcg atagagtgac catcagctgt 60

agagccagcc aggacatcag caagtacctg aactggtatc agcagaaacc cgacggcacc 120

gtgaagctgc tgatctacca caccagcaga ctgcacagcg gcgtgccaag cagattttct 180

ggcagcggct ctggcaccga ctacagcctg acaatcagca acctggaaca agaggatatc 240

gctacctact tctgccagca aggcaacacc ctgccttaca cctttggcgg aggcaccaag 300

ctggaaatca ccggctctac aagcggcagc ggcaaacctg gatctggcga gggatctacc 360

aagggcgaag tgaaactgca agagtctggc cctggactgg tggccccatc tcagtctctg 420

agcgtgacct gtacagtcag cggagtgtcc ctgcctgatt acggcgtgtc ctggatcaga 480

cagcctcctc ggaaaggcct ggaatggctg ggagtgatct ggggcagcga gacaacctac 540

tacaacagcg ccctgaagtc ccggctgacc atcatcaagg acaactccaa gagccaggtg 600

ttcctgaaga tgaacagcct gcagaccgac gacaccgcca tctactattg cgccaagcac 660

tactactacg gcggcagcta cgccatggat tattggggcc agggcaccag cgtgaccgtt 720

tcttctacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgcag 780

cccctgtccc tgcgcccaga agcgtgccgg ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg 840

gggctggact tcgcctgtga tttctgggtg ctggtcgttg tgggcggcgt gctggcctgc 900

tacagcctgc tggtgacagt ggccttcatc atcttttggg tgaggagcaa gcggagcaga 960

ctgctgcaca gcgactacat gaacatgacc ccccggaggc ctggccccac ccggaagcac 1020

taccagccct acgccccctcc cagggatttc gccgcctacc ggagcaaacg gggcagaaag 1080

aaactcctgt atatattcaa acaaccattt atgagaccag tacaaactac tcaagaggaa 1140

gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag 1200

ttcagcagga gcgcagacgc ccccgcgtac aagcagggcc agaaccagct ctataacgag 1260

ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct 1320

gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag 1380

aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc 1440

aaggggcacg atggccttta ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc 1500

cttcacatgc aggccctgcc ccctcgctaa 1530

<210> 39
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 3'載體重疊序列

<400> 39
gcaactagaa ggcacagt 18

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種將編碼抗原受體之核酸導入目標生物之免疫細胞所包含之核酸中之規定部位的方法，其包括

將包含編碼該抗原受體之核酸之載體、及核酸酶導入該免疫細胞之步驟，

該核酸酶切斷該載體及該免疫細胞之基因組序列，

該載體係以如下方式構成：若被該核酸酶切斷，則會產生編碼該抗原受體之序列，該序列藉由微同源介導末端結合(MMEJ)而被導入至該免疫細胞之基因組序列之被該核酸酶切斷之部位。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中上述核酸酶切斷上述免疫細胞之內源性抗原受體之基因座。

【請求項3】

如請求項1之方法，其中上述免疫細胞之內源性抗原受體基因之剔除與上述抗原受體之導入同時發生。

【請求項4】

如請求項2之方法，其中上述內源性抗原受體基因為TRA基因。

【請求項5】

如請求項2之方法，其中上述內源性抗原受體基因為TRB基因。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之方法，其中編碼上述抗原受體之核酸編碼上述抗原受體之α鏈及β鏈。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之方法，其中上述導入之步驟係使用電穿孔法來進行。

【請求項8】

如請求項1至7中任一項之方法，其中在免疫細胞經CD3/CD28珠粒刺激後，於約48～約72小時之間進行上述導入之步驟。

【請求項9】

如請求項1至8中任一項之方法，其中上述抗原受體係選自由T細胞受體(TCR)、B細胞受體(BCR)、及嵌合抗原受體(CAR)所組成之群。

【請求項10】

如請求項1至9中任一項之方法，其中上述核酸酶於TRA基因之恆定部內進行切斷。

【請求項11】

如請求項1至9中任一項之方法，其中上述核酸酶於TRB基因之恆定部內進行切斷。

【請求項12】

如請求項1至11中任一項之方法，其中上述核酸酶為Cas9核酸酶。

【請求項13】

如請求項1至11中任一項之方法，其中上述核酸酶為同源二聚體型核酸酶，上述載體為環狀載體。

【請求項14】

如請求項1至11及13中任一項之方法，其中上述核酸酶為TALEN。

【請求項15】

如請求項14之方法，其中上述核酸酶為鉑TALEN。

【請求項16】

如請求項14或15之方法，其中

上述核酸酶包含DNA結合域，且

該DNA結合域自N末端側起連續地包含複數個DNA結合模組，自N末端起第4n－3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n－2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n－1個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n－3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自N末端起第4n－2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自N末端起第4n－1個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、及自N末端起第4n個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合互不相同，

此處，n為1～10之自然數，x為1～40之自然數，y為1～40之自然數，x與y為不同之自然數。

【請求項17】

如請求項1至16中任一項之方法，其中上述載體藉由上述核酸酶會產生於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、上述所

需核酸、及包含第2核苷酸序列之區域的核酸片段，

此處，上述細胞所包含之核酸於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、上述規定部位、及包含第2核苷酸序列之區域，

上述細胞所包含之核酸中之第1核苷酸序列與上述載體中之第1核苷酸序列藉由微同源介導性結合而連結，上述細胞所包含之核酸中之第2核苷酸序列與上述載體中之第2核苷酸序列藉由微同源介導性結合而連結，藉此插入上述所需核酸。

【請求項18】

如請求項1至17中任一項之方法，其中上述載體包括包含編碼上述抗原受體之核酸之複數個導入匣。

【請求項19】

一種載體，其係用以與核酸酶組合，將編碼抗原受體之核酸插入至細胞所包含之核酸中之規定部位者，且包括

導入匣，其包含編碼該抗原受體之核酸；及

用以產生微同源介導末端結合(MMEJ)之微同源序列，該微同源介導末端結合(MMEJ)用以將編碼該抗原受體之序列導入至該細胞之基因組序列之被該核酸酶切斷之部位，且

上述載體藉由上述核酸酶會產生於5'末端至3'末端之方向上依序包括包含第1核苷酸序列之區域、編碼上述抗原受體之核酸、及包含第2核苷酸序列之區域的核酸片段，

上述細胞所包含之核酸中之第1核苷酸序列與上述載體中之第1核苷酸序列藉由微同源介導性結合而連結，上述細胞所包含之核酸中之第2核苷酸序列與上述載體中之第2核苷酸序列藉由微同源介導性結合而連結，

藉此插入編碼上述抗原受體之序列。

【請求項20】

如請求項19之載體，其中上述規定部位存在於上述細胞之內源性抗原受體基因中，

編碼上述抗原受體之核酸在與上述細胞所包含之上述核酸酶之靶部位對應的序列中包括同義置換。

【請求項21】

如請求項19之載體，其中編碼上述抗原受體之核酸包含可作動地連結至上述抗原受體之EF-1α啟動子。

【請求項22】

如請求項19之載體，其中編碼上述抗原受體之核酸包含用以於該抗原受體之上游提高轉譯效率的前導序列。

【請求項23】

如請求項22之載體，其中上述前導序列係β血球蛋白基因之5'-UTR序列。

【請求項24】

如請求項22之載體，其中上述前導序列為爪蟾血球蛋白5'-UTR。

【請求項25】

如請求項19至24中任一項之載體，其中編碼上述抗原受體之核酸編碼上述抗原受體之α鏈及β鏈。

【請求項26】

如請求項19至25中任一項之載體，其中上述抗原受體係選自由T細胞受體(TCR)、B細胞受體(BCR)、及嵌合抗原受體(CAR)所組成之群。

【請求項27】

如請求項19至26中任一項之載體，其中上述所需部位處在TRA基因之恆定部內。

【請求項28】

如請求項19至26中任一項之載體，其中上述所需之部位處在TRB基因之恆定部內。

【請求項29】

如請求項19至28中任一項之載體，其中上述核酸酶為Cas9核酸酶。

【請求項30】

如請求項19至28中任一項之載體，其中上述核酸酶為同源二聚體型核酸酶，上述載體為環狀載體。

【請求項31】

如請求項19至28及30中任一項之載體，其中上述核酸酶為TALEN。

【請求項32】

如請求項31之載體，其中上述核酸酶為鉑TALEN。

【請求項33】

如請求項30或32之載體，其中上述核酸酶包含DNA結合域，

該DNA結合域自N末端側起連續地包含複數個DNA結合模組，自N末端起第4n－3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n－2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n－1個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之

組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合關於任意之n相同，

自N末端起第4n－3個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自N末端起第4n－2個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、自N末端起第4n－1個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合、及自N末端起第4n個DNA結合模組中第x位胺基酸與第y位胺基酸之組合互不相同，

此處，n為1～10之自然數，x為1～40之自然數，y為1～40之自然數，x與y為不同之自然數。

【請求項34】

如請求項19至33中任一項之載體，其中上述載體於5'末端至3'末端之方向上依序包括：包含5'側之gRNA靶序列或由第一DNA結合域所識別之核苷酸序列、及第1核苷酸序列的區域；上述所需核酸；包含第2核苷酸序列、及3'側之gRNA靶序列或由第二DNA結合域所識別之核苷酸序列的區域。

【請求項35】

如請求項19至34中任一項之載體，其中第1核苷酸序列為3個鹼基長度～10個鹼基長度，及/或第2核苷酸序列為3個鹼基長度～10個鹼基長度。

【請求項36】

如請求項19至35中任一項之載體，其中上述載體包括包含編碼上述抗原受體之核酸之複數個導入匣。

【請求項37】

一種載體，其包含：

序列編號4之核酸及序列編號5之核酸、序列編號6之核酸及序列編號7之核酸、或序列編號8之核酸及序列編號9之核酸；

序列編號10之核酸及序列編號11之核酸、序列編號12之核酸及序列編號13之核酸、或序列編號14之核酸及序列編號15之核酸；及

包含編碼抗原受體之核酸之導入匣。

【請求項38】

如請求項37之載體，其中上述導入匣包含編碼抗原受體之α鏈的序列及編碼抗原受體之β鏈的序列。

【請求項39】

如請求項37或38之載體，其中上述導入匣包含polyA附加序列、前導序列、及/或1個或複數個啟動子序列。

【請求項40】

如請求項37至39中任一項之載體，其中上述導入匣於編碼上述抗原受體之α鏈的序列及編碼上述抗原受體之β鏈的序列之間包含P2A序列。

【請求項41】

如請求項37至40中任一項之載體，其中上述載體包含複數個導入匣。

【請求項42】

一種套組，其係用以將編碼抗原受體之核酸插入至細胞所包含之核酸中之規定部位者，且包含如請求項19至35中任一項之載體、及用以表現上述核酸酶之載體。

【請求項43】

一種將編碼抗原受體之核酸於活體外或於非人類生物之活體內插入至免疫細胞所包含之核酸中之規定部位的方法，其包括如下步驟：將如請求項19至35中任一項之載體、及用以表現上述核酸酶之載體導入至免疫細胞。

【請求項44】

一種製造表現抗原受體之免疫細胞之方法，其包括如下步驟：藉由如請求項43之方法，將編碼上述抗原受體之核酸插入至上述免疫細胞所包含之核酸中之規定部位。

【請求項45】

一種對受驗者實施免疫療法之方法，其包括如下步驟：

(A)自該受驗者取得血液；

(B)將該血液之單核細胞(PMBC)之TRB剔除；

(C)將CD3陰性之該單核細胞進行濃縮；

(D)將該單核細胞之TRA剔除，將抗原受體導入；

(E)將CD3陽性之該單核細胞進行濃縮；及

(G)視需要對該單核細胞進行擴大培養。

【請求項46】

一種製造用於免疫療法之細胞之方法，其包括如下步驟：

(A)將自受驗者取得之血液之單核細胞(PMBC)之TRB剔除；

(B)將CD3陰性之該單核細胞進行濃縮；

(C)將該單核細胞之TRA剔除，將抗原受體導入；

(D)將CD3陽性之該單核細胞進行濃縮；及

(E)視需要對該單核細胞進行擴大培養。

【請求項47】

如請求項45或46之方法，其中上述TRA及/或TRB之切斷係使用鉑TALEN來進行。

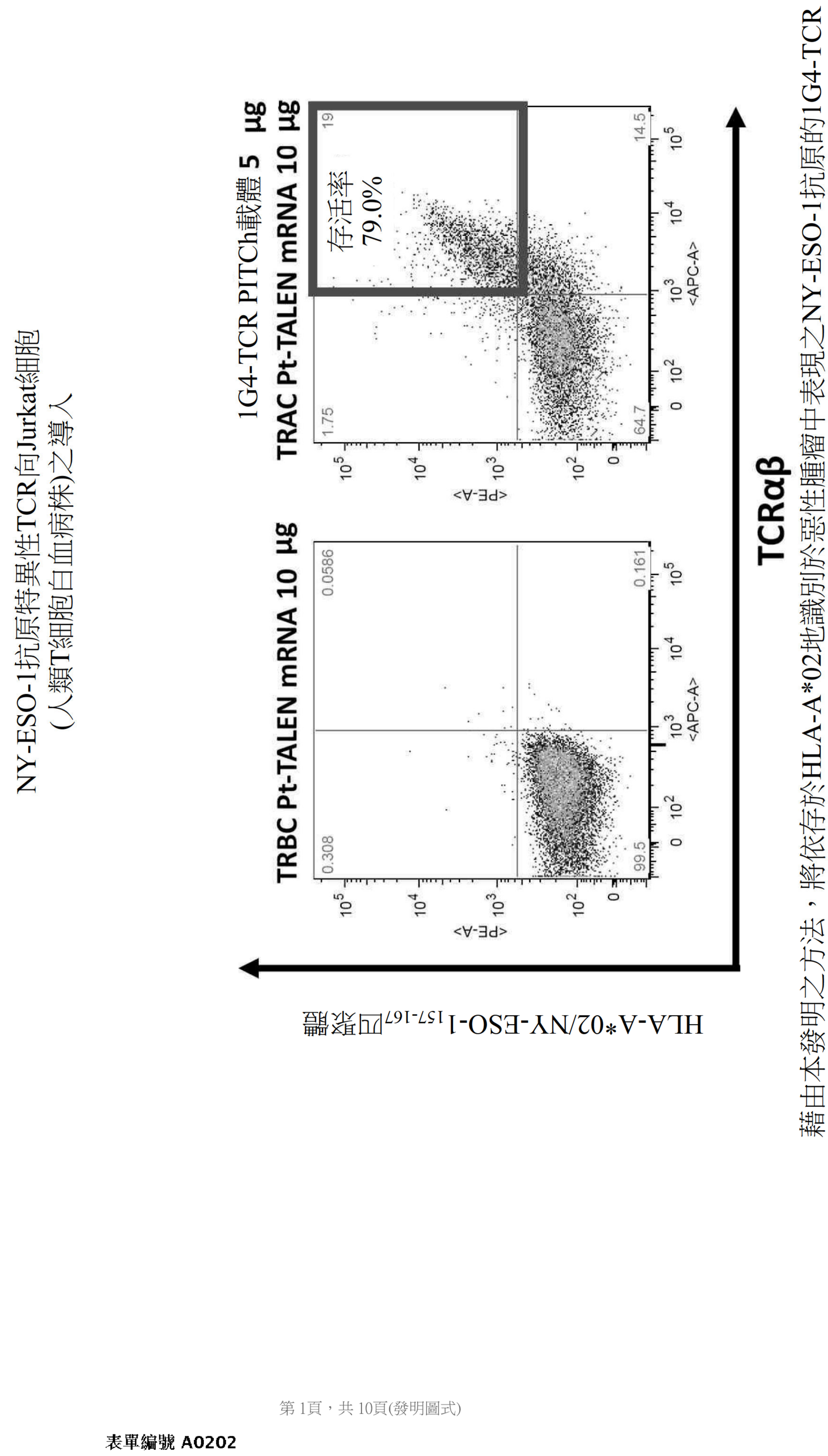
【請求項48】

如請求項45或46之方法，其中上述免疫療法包括TCR-T療法或CAR-T療法。

【請求項49】

一種組合物，其係用以於如請求項45或46之方法中使用且包含鉑TALEN。

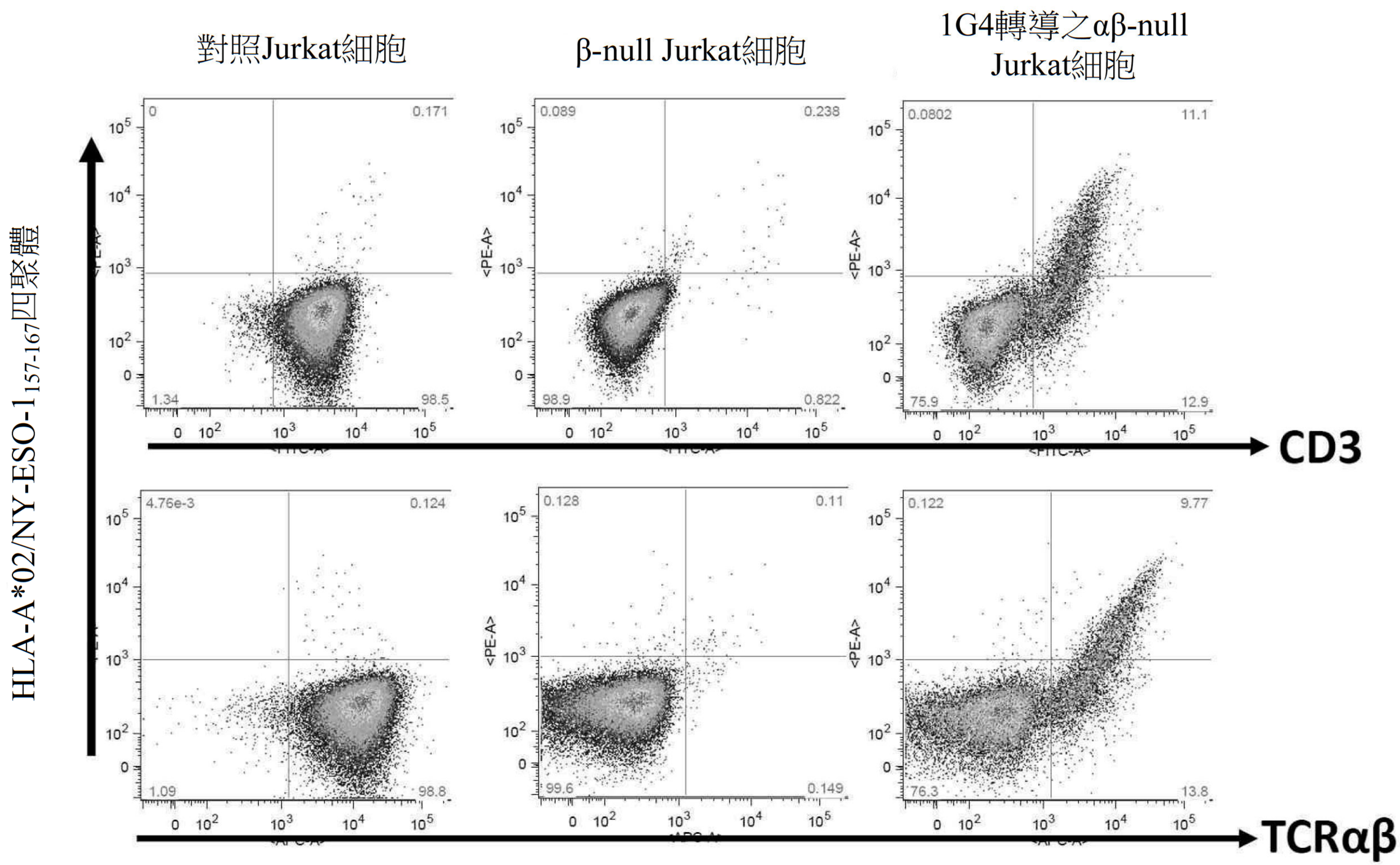
【發明圖式】


HLA-A*02/NY-ESO-1 $_{157-167}$四聚體
TRBC Pt-TALEN mRNA 5 µg
TRBC Pt-TALEN mRNA 10 µg
TRAC Pt-TALEN mRNA 5 µg
TRAC Pt-TALEN mRNA 10 µg
1G4-TCR PITCh載體 5 µg
1G4-TCR PITCh載體 10 µg
0.308
99.5
0.0586
99.9
1.75
64.7
19
14.5
存活率
79.0%
<PE-A>
<APC-A>
TCRαβ
NY-ESO-1抗原特異性TCR向Jurkat細胞
(人類T細胞白血病株)之導入
藉由本發明之方法，將依存於HLA-A*02地識別於惡性腫瘤中表現之NY-ESO-1抗原的1G4-TCR
導入人類T細胞株之例(使用鉑TALEN作為人工核酸酶)

【圖1】

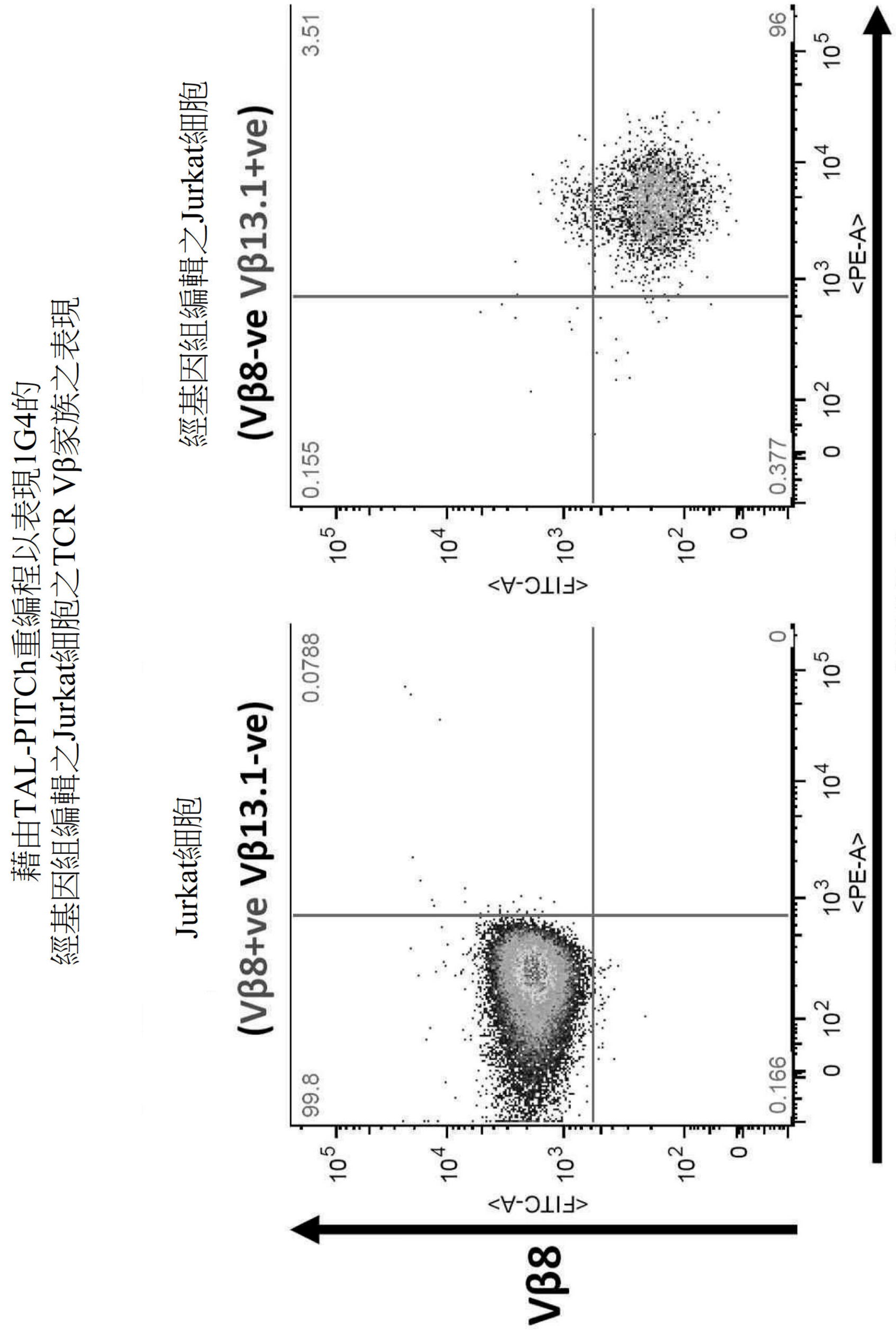
藉由本發明之方法所導入之所需TCR之穩定表現

基因導入後1個月時點之表現狀態



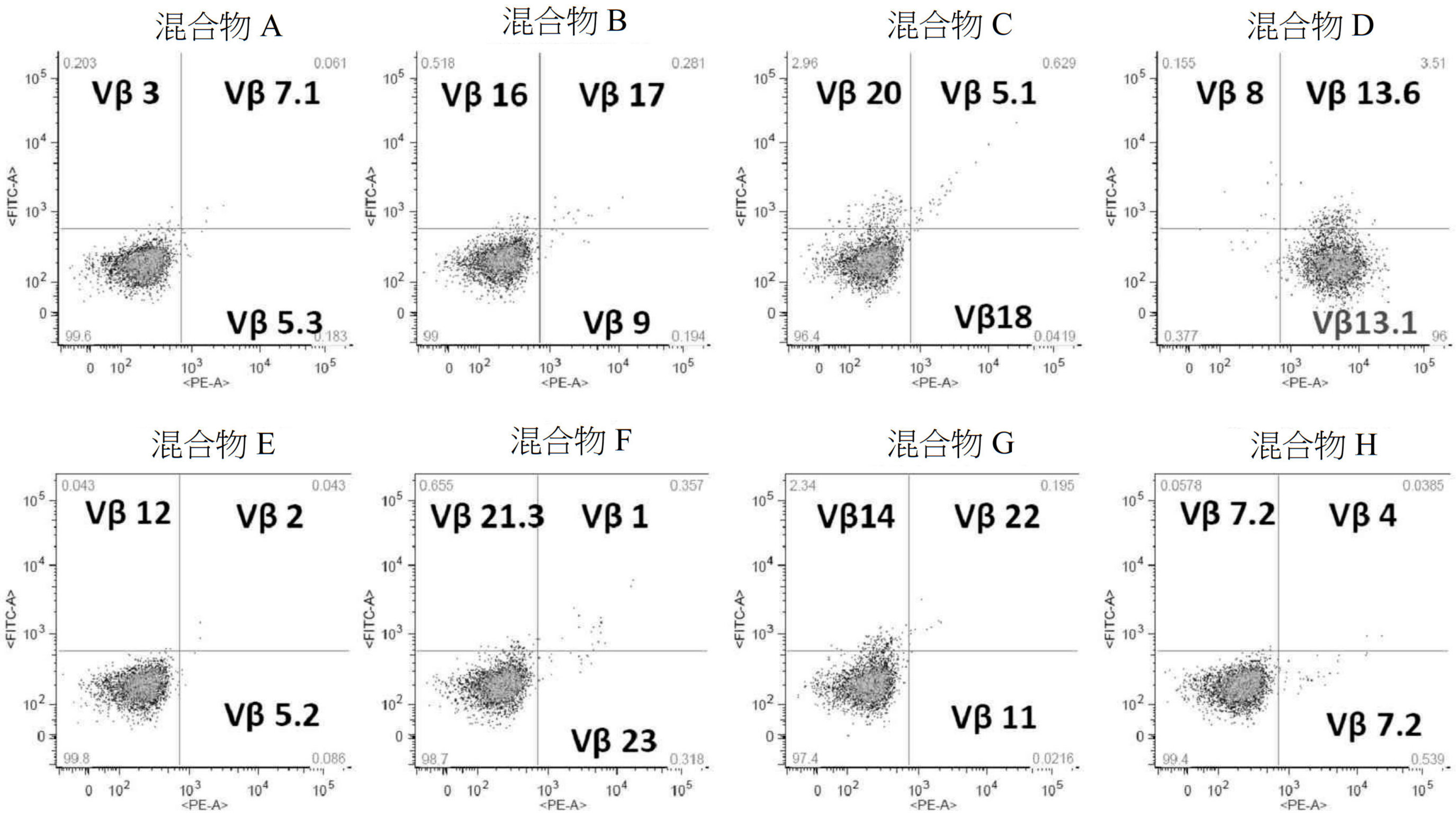
【圖2】

藉由TAL-PITCh重編程以表現1G4的經基因組編輯之Jurkat細胞之TCR Vβ家族之表現



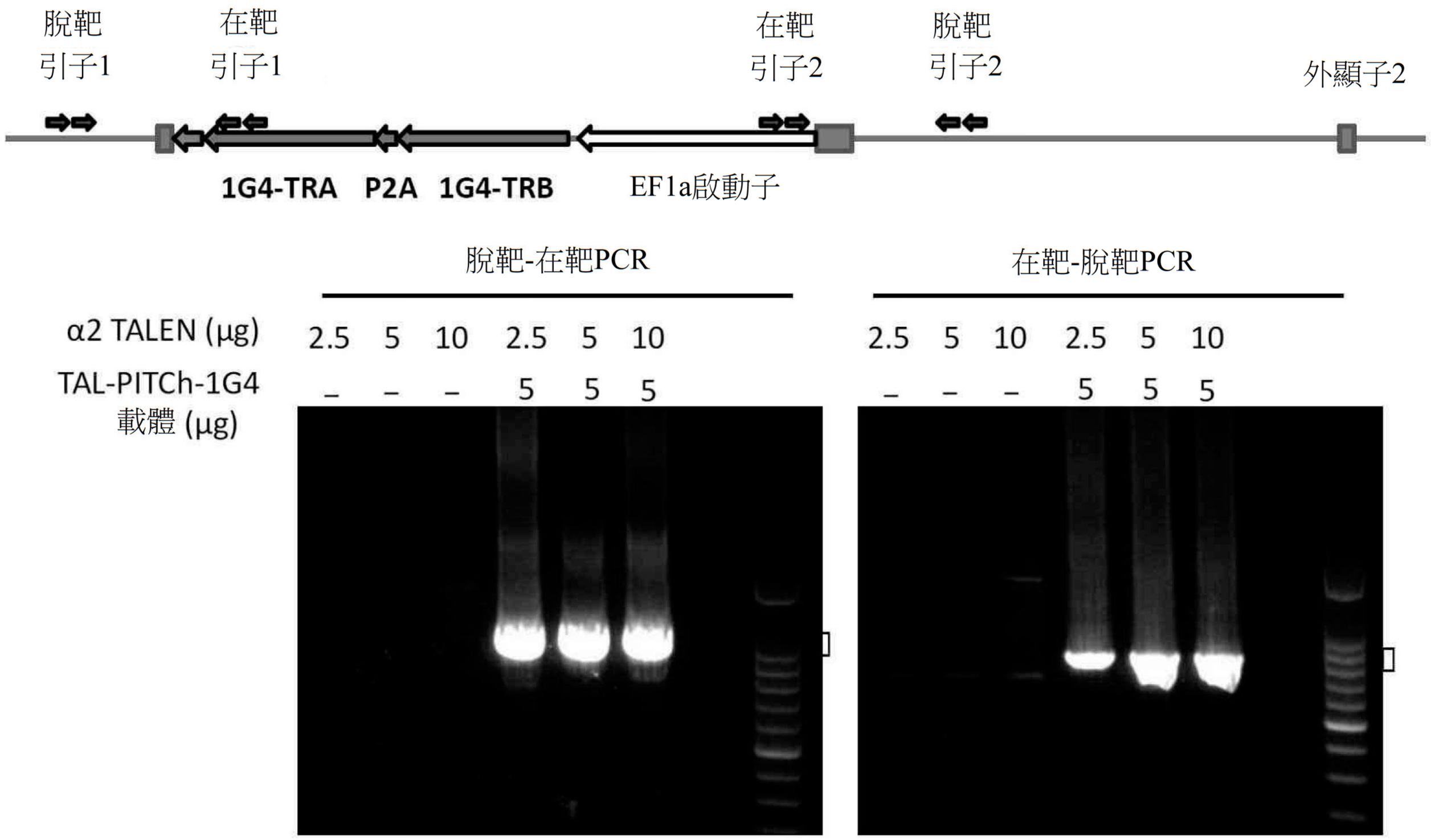
【圖3】

僅表現Vβ13.1家族TCR之經基因組編輯之1G4-Jurkat細胞



【圖4】

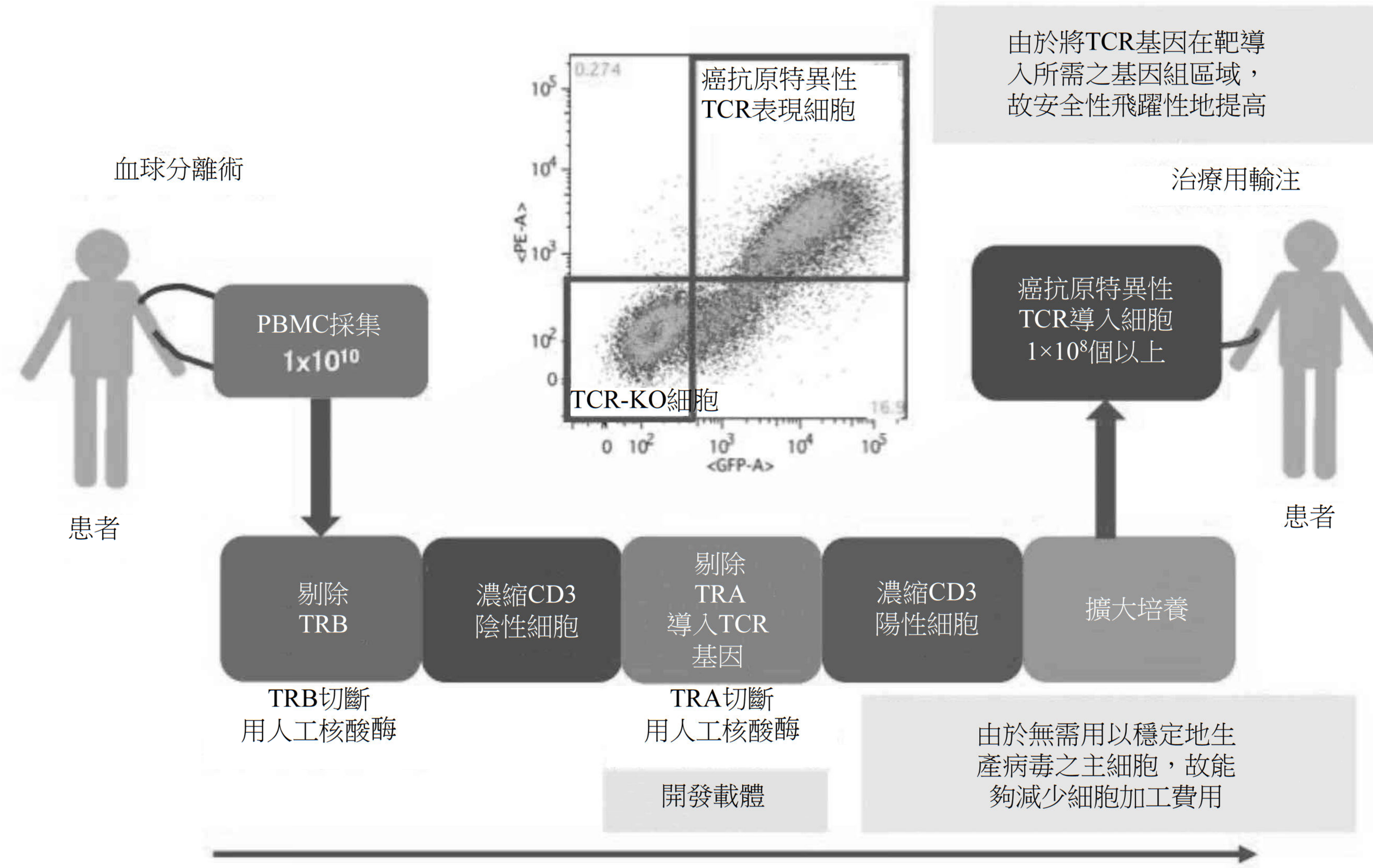
導入TCR序列向基因組之在靶插入之確認



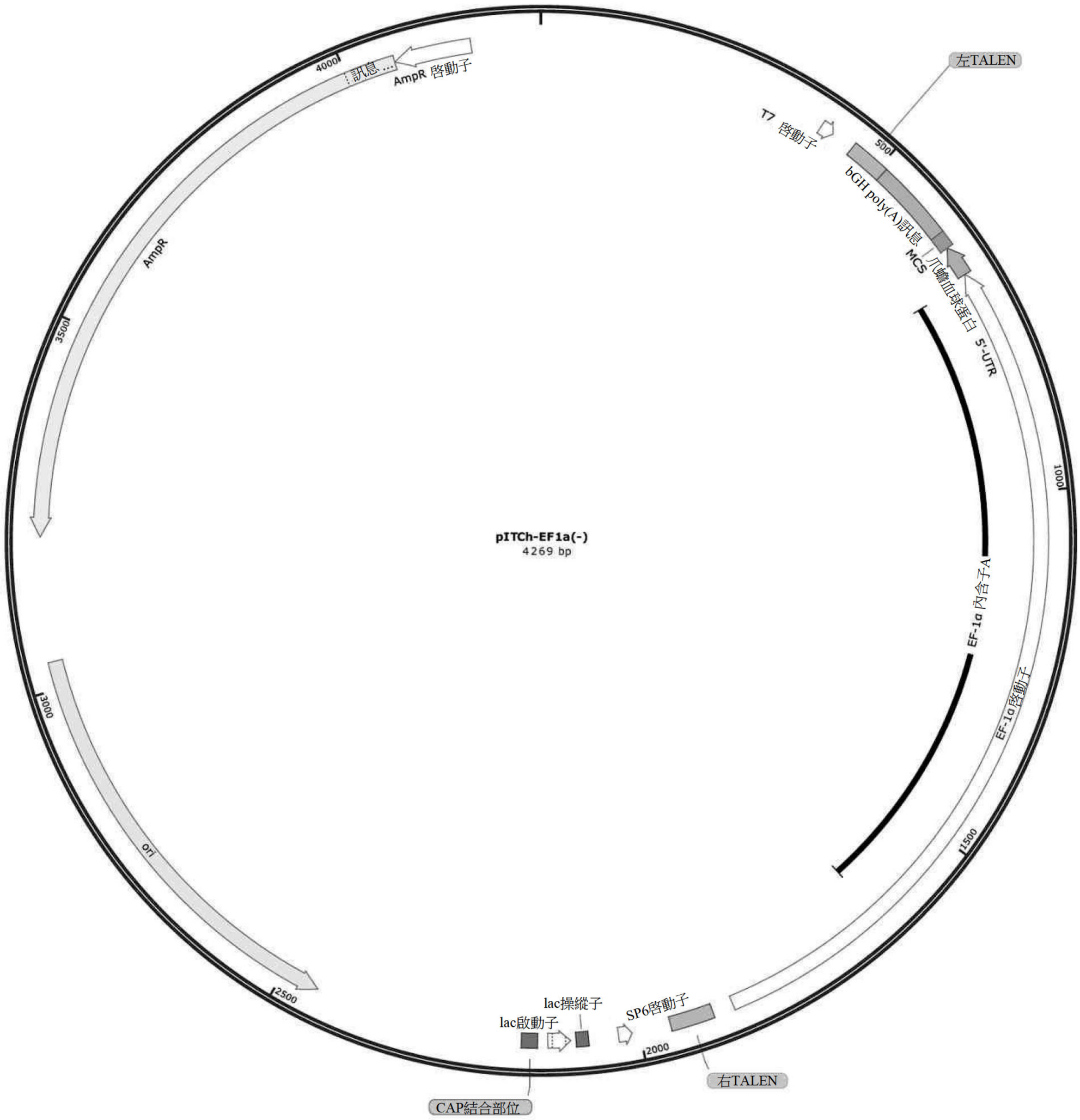
【圖5】

表單編號 A0202

202124718



【圖6】



【圖7】

將插入DNA彙總為一條而設計之情形

5'載體重疊序列	Kozak序列	TCRβ基因(去除終止密碼子)	GSG P2A序列	TCRα基因	3'載體重疊序列

將插入DNA分成兩條而設計之情形

TCRβ插入序列：	5'載體重疊序列	Kozak序列	TCRβ基因(去除終止密碼子)	3'GSG P2A序列(重疊)

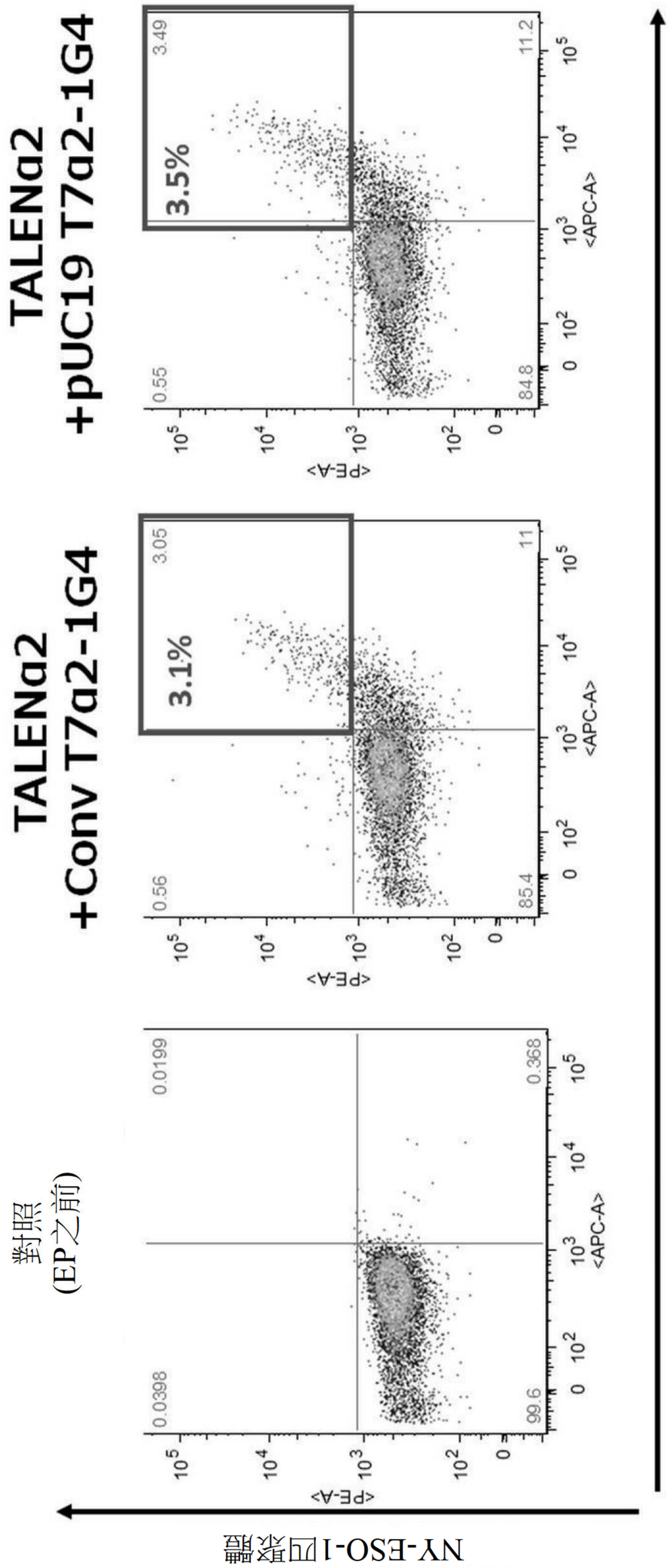
TCRα插入序列：	5' GSG P2A序列(重疊)	TCRα基因	3'載體重疊序列

【圖8】

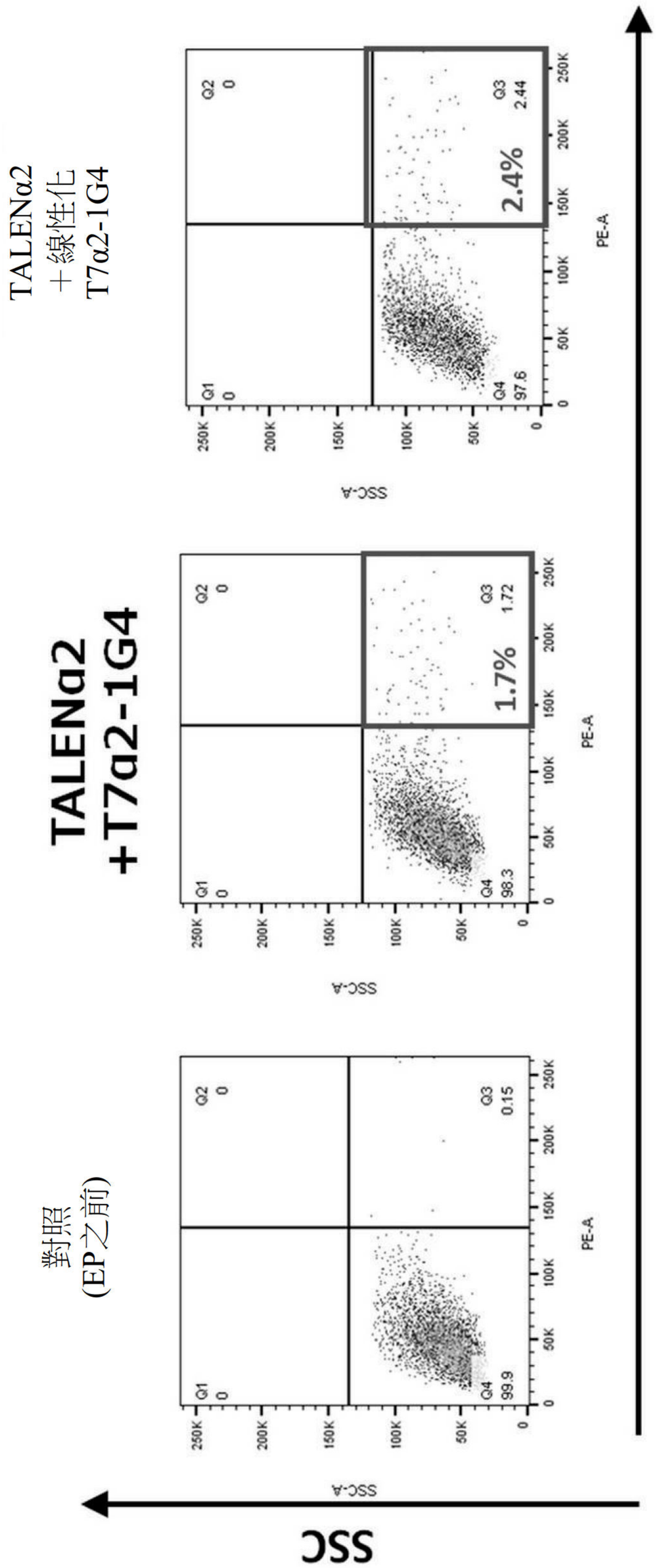
嵌合抗原受體(CAR)基因之插入DNA設計例

5'載體重疊序列	Kozak序列	嵌合抗原受體基因序列	3'載體重疊序列

【圖9】

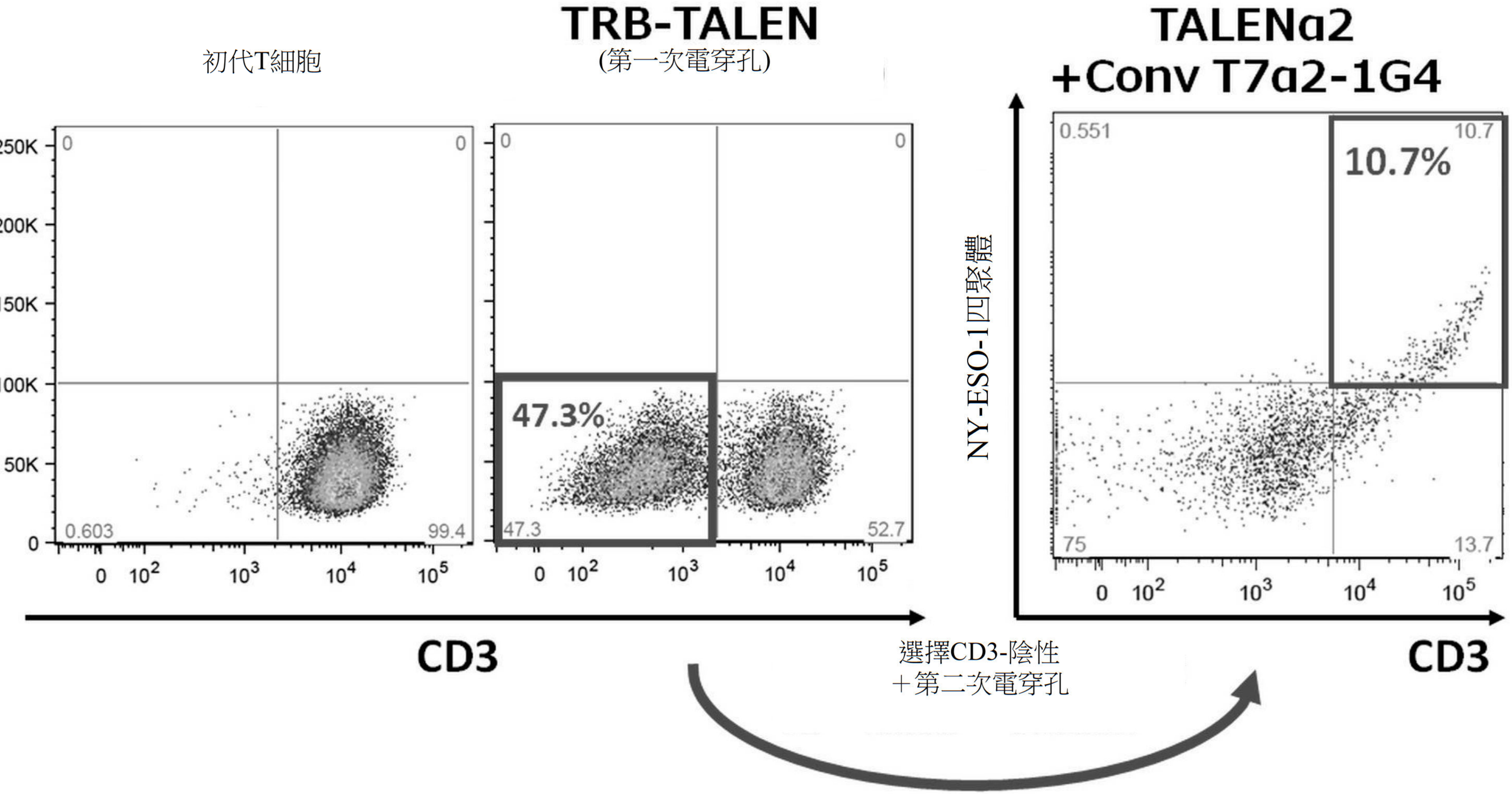

對照
(EP之前)
TALENa2
+Conv T7a2-1G4
TALENa2
+pUC19 T7a2-1G4
NY-ESO-1四聚體
CD3
<APC-A>
<PE-A>
0.0398
0.0199
99.6
0.368
0.56
3.05
85.4
11
0.55
3.49
84.8
11.2
3.5%
3.1%

【圖10】



NY-ESO-1 MHC 四聚體-PE

【圖11】


初代T細胞
TRB-TALEN
(第一次電穿孔)
TALENα2
+Conv T7α2-1G4
SSC-A
250K
200K
150K
100K
50K
0
0.603
99.4
47.3%
47.3
52.7
0.551
10.7
10.7%
75
13.7
0
10^2
10^3
10^4
10^5
CD3
NY-ESO-1四聚體
選擇CD3-陰性
＋第二次電穿孔

【圖12】