(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114901812 A
(43)申请公布日 2022.08.12

(21)申请号 202080090344.X
(22)申请日 2020.11.13
(30)优先权数据
2019-206448 2019.11.14 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.06.24
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2020/042429 2020.11.13
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/095847 JA 2021.05.20
(71)申请人 国立大学法人广岛大学
地址 日本广岛县东广岛市镜山1丁目3番2号
申请人 组库创世纪株式会社
(72)发明人 一户辰夫 山本卓 佐久间哲史 本庶仁子 川濑孝和 西泽正俊 铃木隆二 马郡健太 佐藤宽之
(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270
专利代理师 李雪 姚开丽
(51)Int.Cl.
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C12N 15/90(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 9/22(2006.01)
A61K 35/15(2015.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)

权利要求书4页 说明书40页
序列表27页 附图11页

(54)发明名称

使用环状DNA将抗原特异性受体基因导入至T细胞基因组的方法

(57)摘要

本发明提供将编码抗原受体的核酸导入靶标生物的免疫细胞所含的核酸中的规定部位的技术。在本发明的技术中，将包含编码抗原受体的核酸的载体和核酸酶导入至免疫细胞，核酸酶切断载体及免疫细胞的基因组序列，载体能够以如下方式构成：在该载体被核酸酶切断时，产生编码抗原受体的序列，该序列通过微同源介导的末端接合(MMEJ)被导入至免疫细胞的基因组序列的被核酸酶切断的部位。

CN 114901812 A

1.一种方法,其是将编码抗原受体的核酸导入靶标生物的免疫细胞所含的核酸中的规定部位的方法,

所述方法包括将载体和核酸酶导入至该免疫细胞的工序,所述载体包含编码该抗原受体的核酸,

该核酸酶切断该载体及该免疫细胞的基因组序列,

该载体以如下方式构成:在该载体被该核酸酶切断时,产生编码该抗原受体的序列,所述序列通过微同源介导的末端接合(MMEJ)被导入至该免疫细胞的基因组序列的被该核酸酶切断的部位。

2.根据权利要求1所述的方法,其中,所述核酸酶切断所述免疫细胞的内源性抗原受体的基因座。

3.根据权利要求1所述的方法,其中,所述免疫细胞的内源性抗原受体基因的敲除与所述抗原受体的导入同时发生。

4.根据权利要求2所述的方法,其中,所述内源性抗原受体基因为TRA基因。

5.根据权利要求2所述的方法,其中,所述内源性抗原受体基因为TRB基因。

6.根据权利要求1～5中任一项所述的方法,其中,编码所述抗原受体的核酸编码所述抗原受体的α链及β链。

7.根据权利要求1～6中任一项所述的方法,其中,所述导入的工序使用电穿孔来进行。

8.根据权利要求1～7中任一项所述的方法,其中,在用CD3/CD28珠粒刺激免疫细胞后在约48小时～约72小时的期间进行所述导入的工序。

9.根据权利要求1～8中任一项所述的方法,其中,所述抗原受体选自T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)及嵌合抗原受体(CAR)。

10.根据权利要求1～9中任一项所述的方法,其中,所述核酸酶将TRA基因的恒定区内进行切断。

11.根据权利要求1～9中任一项所述的方法,其中,所述核酸酶将TRB基因的恒定区内进行切断。

12.根据权利要求1～11中任一项所述的方法,其中,所述核酸酶为Cas9核酸酶。

13.根据权利要求1～11中任一项所述的方法,其中,所述核酸酶为同源二聚体型的核酸酶,所述载体为环状载体。

14.根据权利要求1～11及13中任一项所述的方法,其中,所述核酸酶为TALEN。

15.根据权利要求14所述的方法,其中,所述核酸酶为铂TALEN。

16.根据权利要求14或15所述的方法,其中,

所述核酸酶包含DNA结合域,

该DNA结合域自N末端侧起连续地包含多个DNA结合模块,自N末端起第4n-3个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

自N末端起第4n-2个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

自N末端起第4n-1个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

自N末端起第4n个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n

而言均相同，

自N末端起第4n-3个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、自N末端起第4n-2个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、自N末端起第4n-1个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、以及自N末端起第4n个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合互不相同，

此处，n为1～10的自然数，x为1～40的自然数，y为1～40的自然数，x和y是不同的自然数。

17.根据权利要求1～16中任一项所述的方法，其中，

所述载体通过所述核酸酶而产生核酸片段，所述核酸片段在从5’末端至3’末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、所述所期望的核酸、以及包含第二核苷酸序列的区域，

此处，所述细胞所含的核酸在从5’末端至3’末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、所述规定部位、以及包含第二核苷酸序列的区域，

所述细胞所含的核酸中的第一核苷酸序列与所述载体中的第一核苷酸序列通过微同源介导性接合来连接，所述细胞所含的核酸中的第二核苷酸序列与所述载体中的第二核苷酸序列通过微同源介导性接合来连接，由此插入所述所期望的核酸。

18.根据权利要求1～17中任一项所述的方法，其中，所述载体包含多个导入盒，所述导入盒包含编码所述抗原受体的核酸。

19.一种载体，其是用于与核酸酶组合而将编码抗原受体的核酸插入细胞所含的核酸中的规定部位的载体，

所述载体包含：

导入盒，其包含编码该抗原受体的核酸；和

微同源序列，其用于产生微同源介导的末端接合(MMEJ)，所述微同源介导的末端接合用于将编码该抗原受体的序列导入该细胞的基因组序列的被该核酸酶切断的部位，

所述载体通过所述核酸酶而产生核酸片段，所述核酸片段在从5’末端至3’末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、编码所述抗原受体的核酸、以及包含第二核苷酸序列的区域，

所述细胞所含的核酸中的第一核苷酸序列与所述载体中的第一核苷酸序列通过微同源介导性接合来连接，所述细胞所含的核酸中的第二核苷酸序列与所述载体中的第二核苷酸序列通过微同源介导性接合来连接，由此插入编码所述抗原受体的序列。

20.根据权利要求19所述的载体，其中，所述规定部位存在于所述细胞的内源性抗原受体基因中，

编码所述抗原受体的核酸在与所述细胞所含的基于所述核酸酶的靶标部位对应的序列中包含同义置换。

21.根据权利要求19所述的载体，其中，编码所述抗原受体的核酸包含EF-1α启动子，所述EF-1α启动子可操作地连接至所述抗原受体。

22.根据权利要求19所述的载体，其中，编码所述抗原受体的核酸包含用于在该抗原受体的上游提高翻译效率的前导序列。

23.根据权利要求22所述的载体，其中，所述前导序列为β球蛋白基因的5’-UTR序列。

24.根据权利要求22所述的载体,其中,所述前导序列为爪蟾球蛋白5'-UTR。

25.根据权利要求19～24中任一项所述的载体,其中,编码所述抗原受体的核酸编码所述抗原受体的α链及β链。

26.根据权利要求19～25中任一项所述的载体,其中,所述抗原受体选自T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)及嵌合抗原受体(CAR)。

27.根据权利要求19～26中任一项所述的载体,其中,所述所期望的部位处于TRA基因的恒定区内。

28.根据权利要求19～26中任一项所述的载体,其中,所述所期望的部位处于TRB基因的恒定区内。

29.根据权利要求19～28中任一项所述的载体,其中,所述核酸酶为Cas9核酸酶。

30.根据权利要求19～28中任一项所述的载体,其中,所述核酸酶为同源二聚体型的核酸酶,所述载体为环状载体。

31.根据权利要求19～28及30中任一项所述的载体,其中,所述核酸酶为TALEN。

32.根据权利要求31所述的载体,其中,所述核酸酶为铂TALEN。

33.根据权利要求30或32所述的载体,其中,

所述核酸酶包含DNA结合域,

该DNA结合域自N末端侧起连续地包含多个DNA结合模块,自N末端起第4n-3个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

自N末端起第4n-2个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

自N末端起第4n-1个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

自N末端起第4n个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

自N末端起第4n-3个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、自N末端起第4n-2个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、自N末端起第4n-1个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、以及自N末端起第4n个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合互不相同,

此处,n为1～10的自然数,x为1～40的自然数,y为1～40的自然数,x和y是不同的自然数。

34.根据权利要求19～33中任一项所述的载体,其中,所述载体在从5'末端至3'末端的方向上依次包括:包含5'侧的gRNA靶标序列或被第一DNA结合域识别的核苷酸序列与第一核苷酸序列的区域;所述所期望的核酸;包含第二核苷酸序列与3'侧的gRNA靶标序列或被第二DNA结合域识别的核苷酸序列的区域。

35.根据权利要求19～34中任一项所述的载体,其中,第一核苷酸序列为3个碱基长～10个碱基长,和/或第二核苷酸序列为3个碱基长～10个碱基长。

36.根据权利要求19～35中任一项所述的载体,其中,所述载体包含多个导入盒,所述导入盒包含编码所述抗原受体的核酸。

37.一种载体,其中,包含:

序列号4的核酸和序列号5的核酸、序列号6的核酸和序列号7的核酸、或者序列号8的核酸和序列号9的核酸；

序列号10的核酸和序列号11的核酸、序列号12的核酸和序列号13的核酸、或者序列号14的核酸和序列号15的核酸；和

包含编码抗原受体的核酸的导入盒。

38.根据权利要求37所述的载体，其中，所述导入盒包含编码抗原受体的α链的序列和编码抗原受体的β链的序列。

39.根据权利要求37或38所述的载体，其中，所述导入盒包含polyA附加序列、前导序列、和/或1或多个启动子序列。

40.根据权利要求37～39中任一项所述的载体，其中，所述导入盒在编码所述抗原受体的α链的序列及编码所述抗原受体的β链的序列之间包含P2A序列。

41.根据权利要求37～40中任一项所述的载体，其中，所述载体包含多个导入盒。

42.一种试剂盒，其是用于将编码抗原受体的核酸插入至细胞所含的核酸中的规定部位的试剂盒，所述试剂盒包含权利要求19～35中任一项所述的载体、和用于表达所述核酸酶的载体。

43.一种方法，其是在体外或于非人生物中在体内将编码抗原受体的核酸插入至免疫细胞所含的核酸中的规定部位的方法，所述方法包括将权利要求19～35中任一项所述的载体和用于表达所述核酸酶的载体导入免疫细胞的工序。

44.一种制造表达抗原受体的免疫细胞的方法，其包括通过权利要求43所述的方法将编码抗原受体的核酸插入所述免疫细胞所含的核酸中的规定部位的工序。

45.一种对受试者实施免疫疗法的方法，其包括：

(A)从受试者取得血液的工序；

(B)将该血液的单核细胞(PMBC)的TRB敲除的工序；

(C)将该单核细胞进行CD3阴性浓缩的工序；

(D)将该单核细胞的TRA敲除并导入抗原受体的工序；

(E)将该单核细胞进行CD3阳性浓缩的工序；以及

(G)根据需要进行该单核细胞的扩大培养的工序。

46.一种制造用于免疫疗法的细胞的方法，其包括：

(A)将从受试者取得的血液的单核细胞(PMBC)的TRB敲除的工序；

(B)将该单核细胞进行CD3阴性浓缩的工序；

(C)将该单核细胞的TRA敲除并导入抗原受体的工序；

(D)将该单核细胞进行CD3阳性浓缩的工序；以及

(E)根据需要进行该单核细胞的扩大培养的工序。

47.根据权利要求45或46所述的方法，其中，所述TRA和/或TRB的切断使用铂TALEN来进行。

48.根据权利要求45或46所述的方法，其中，所述免疫疗法包括TCR-T疗法或CAR-T疗法。

49.一种组合物，其包含用于在权利要求45或46所述的方法中使用的铂TALEN。

使用环状DNA将抗原特异性受体基因导入至T细胞基因组的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫细胞的生物工程学上的操作。特别是，涉及将所期望的抗原受体导入至免疫细胞的技术。

背景技术

[0002] 目前，作为对于恶性肿瘤的新治疗手段，正在急速地开展导入有嵌合型抗原受体(CAR)的T细胞(CAR-T)、导入有T细胞受体的T细胞(TCR-T)的开发，在制作上述T细胞时使用了病毒载体或转位子载体。这些技术不能特定出供体基因插入区域，在安全性的方面尚有顾虑。另一方面，未确立利用环状DNA载体来制作针对恶性肿瘤的基因改变T细胞的技术，通过以往的方法导入环状双链DNA载体时的细胞存活率显著低。

发明内容

[0003] 用于解决技术问题的技术手段

[0004] 在本发明中，提供一种技术，其中，与核酸酶并用，使用环状DNA载体能够将任意的抗原受体(例如人T细胞受体(TCR)α链及β链基因、嵌合抗原受体(CAR))插入至免疫细胞的基因组上的所期望的区域。另外，提供使用该技术来制作插入有所期望的抗原特异性基因的医疗用基因组编集T细胞的技术。

[0005] 另外，在本发明中，可提供将T细胞的基因组上的靶标区域用人工核酸酶切断、在DNA修复时准确地插入至切断序列间、可实现以下作用的环状双链DNA载体：1)能够使导入有载体的细胞持续地表达包含TCRα链及TCRβ链的所期望的TCR复合体或嵌合抗原受体(CAR)；并且2)仅通过采用特定限制酶的加工，能够置换为所期望表达的任意的TCRα链·TCRβ链序列或嵌合抗原受体(CAR)。

[0006] 在本发明中，可提供将编码抗原受体的核酸导入靶标生物的免疫细胞所含的核酸中的规定部位的方法，所述方法包括将包含编码抗原受体的核酸的载体和核酸酶导入该免疫细胞的工序。核酸酶可切断载体及免疫细胞的基因组序列。而且，载体能够以如下方式构成：在其被核酸酶切断时，会产生编码抗原受体的序列，该序列通过微同源介导的末端接合(MMEJ)被导入至免疫细胞的基因组序列的被核酸酶切断的部位。在本发明的一个方面，可提供能够通过MMEJ进行基因导入的载体。在本发明的一个方面，可提供适合在该技术中使用的核酸酶。

[0007] 作为本发明的实施方式，可列举例如以下的项目。

[0008] (项目1)一种方法，其是将编码抗原受体的核酸导入靶标生物的免疫细胞所含的核酸中的规定部位的方法，

[0009] 所述方法包括将载体和核酸酶导入至该免疫细胞的工序，所述载体包含该编码抗原受体的核酸，

[0010] 该核酸酶切断该载体及该免疫细胞的基因组序列，

[0011] 该载体以如下方式构成:在其被该核酸酶切断时,会产生编码该抗原受体的序列,该序列通过微同源介导的末端接合(MMEJ)被导入至该免疫细胞的基因组序列的被该核酸酶切断的部位。

[0012] (项目2)根据上述项目所述的方法,其中,上述核酸酶切断上述免疫细胞的内源性抗原受体的基因座。

[0013] (项目3)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,上述免疫细胞的内源性抗原受体基因的敲除与上述抗原受体的导入同时发生。

[0014] (项目4)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,上述内源性抗原受体基因为TRA基因。

[0015] (项目5)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,上述内源性抗原受体基因为TRB基因。

[0016] (项目6)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,编码上述抗原受体的核酸编码上述抗原受体的α链及β链。

[0017] (项目7)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,上述导入的工序使用电穿孔来进行。

[0018] (项目8)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,在用CD3/CD28珠粒刺激免疫细胞后在约48～约72小时的期间进行上述导入的工序。

[0019] (项目9)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,上述抗原受体选自T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)及嵌合抗原受体(CAR)。

[0020] (项目10)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,上述核酸酶将TRA基因的恒定区内进行切断。

[0021] (项目11)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,上述核酸酶将TRB基因的恒定区内进行切断。

[0022] (项目12)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,上述核酸酶为Cas9核酸酶。

[0023] (项目13)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,上述核酸酶为同源二聚体型的核酸酶,上述载体为环状载体。

[0024] (项目14)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,上述核酸酶为TALEN。

[0025] (项目15)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,上述核酸酶为铂TALEN。

[0026] (项目16)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,

[0027] 上述核酸酶包含DNA结合域,

[0028] 该DNA结合域自N末端侧起连续地包含多个DNA结合模块,自N末端起第4n-3个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

[0029] 自N末端起第4n-2个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

[0030] 自N末端起第4n-1个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

[0031] 自N末端起第4n个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

[0032] 自N末端起第4n-3个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、自

N末端起第4n-2个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、自N末端起第4n-1个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、以及及自N末端起第4n个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合互不相同，

[0033] 此处，n为1～10的自然数，x为1～40的自然数，y为1～40的自然数，x和y是不同的自然数。

[0034] (项目17)根据上述项目中任一项所述的方法，其中，

[0035] 上述载体通过上述核酸酶而产生核酸片段，所述核酸片段在从5'末端至3'末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、上述所期望的核酸、以及包含第二核苷酸序列的区域，

[0036] 此处，上述细胞所含的核酸在从5'末端至3'末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、上述规定部位、以及包含第二核苷酸序列的区域，

[0037] 上述细胞所含的核酸中的第一核苷酸序列与上述载体中的第一核苷酸序列通过微同源介导性接合来连接，上述细胞所含的核酸中的第二核苷酸序列与上述载体中的第二核苷酸序列通过微同源介导性接合来连接，由此插入上述所期望的核酸。

[0038] (项目18)根据上述项目中任一项所述的方法，其中，上述载体包含多个导入盒，所述导入盒包含编码上述抗原受体的核酸。

[0039] (项目19)一种载体，其用于与核酸酶组合而将编码抗原受体的核酸插入细胞所含的核酸中的规定部位的载体，

[0040] 所述载体包含：

[0041] 导入盒，其包含编码该抗原受体的核酸；和

[0042] 微同源序列，其用于产生微同源介导的末端接合(MMEJ)，所述微同源介导的末端接合用于将编码该抗原受体的序列导入该细胞的基因组序列的被该核酸酶切断的部位，

[0043] 上述载体通过上述核酸酶而产生核酸片段，所述核酸片段在从5'末端至3'末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、编码上述抗原受体的核酸、以及包含第二核苷酸序列的区域，

[0044] 上述细胞所含的核酸中的第一核苷酸序列与上述载体中的第一核苷酸序列通过微同源介导性接合来连接，上述细胞所含的核酸中的第二核苷酸序列与上述载体中的第二核苷酸序列通过微同源介导性接合来连接，由此插入编码上述抗原受体的序列。

[0045] (项目19A)一种载体，其是用于与核酸酶组合而将所期望的核酸插入细胞所含的核酸中的规定部位的载体，

[0046] 此处，上述细胞所含的核酸在从5'末端至3'末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、上述规定部位、以及包含第二核苷酸序列的区域，

[0047] 上述核酸酶对上述细胞所含的上述规定部位进行特异性的切断，

[0048] 上述载体通过上述核酸酶而产生核酸片段，所述核酸片段在从5'末端至3'末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、上述所期望的核酸、以及包含第二核苷酸序列的区域，

[0049] 上述细胞所含的核酸中的第一核苷酸序列与上述载体中的第一核苷酸序列通过微同源介导性接合来连接，上述细胞所含的核酸中的第二核苷酸序列与上述载体中的第二核苷酸序列通过微同源介导性接合来连接，由此插入上述所期望的核酸，

[0050] 上述所期望的核酸包括编码抗原受体的核酸。

[0051] (项目19B)根据上述项目所述的载体,其具备上述项目的1个或多个所述的特征。

[0052] (项目20)根据上述项目中任一项所述的载体,其中,上述规定部位存在于上述细胞的内源性抗原受体基因中,

[0053] 编码上述抗原受体的核酸在与上述细胞所含的基于上述核酸酶的靶标部位对应的序列中包含同义置换。

[0054] (项目21)根据上述项目中任一项所述的载体,其中,编码上述抗原受体的核酸包含EF-1α启动子,所述EF-1α启动子可操作地连接至上述抗原受体。

[0055] (项目22)根据上述项目中任一项所述的载体,其中,编码上述抗原受体的核酸包含用于在该抗原受体的上游提高翻译效率的前导序列。

[0056] (项目23)根据上述项目中任一项所述的载体,其中,上述前导序列为β球蛋白基因的5‘-UTR序列。

[0057] (项目24)根据上述项目中任一项所述的载体,其中,上述前导序列为爪蟾球蛋白(Xenopus globin)5’-UTR。

[0058] (项目25)根据上述项目中任一项所述的载体,其中,编码上述抗原受体的核酸编码上述抗原受体的α链及β链。

[0059] (项目26)根据上述项目中任一项所述的载体,其中,上述抗原受体选自T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)及嵌合抗原受体(CAR)。

[0060] (项目27)根据上述项目中任一项所述的载体,其中,上述所期望的部位处于TRA基因的恒定区内。

[0061] (项目28)根据上述项目中任一项所述的载体,其中,上述所期望的部位处于TRB基因的恒定区内。

[0062] (项目29)根据上述项目中任一项所述的载体,其中,上述核酸酶为Cas9核酸酶。

[0063] (项目30)根据上述项目中任一项所述的载体,其中,上述核酸酶为同源二聚体型的核酸酶,上述载体为环状载体。

[0064] (项目31)根据上述项目中任一项所述的载体,其中,上述核酸酶为TALEN。

[0065] (项目32)根据上述项目中任一项所述的载体,其中,上述核酸酶为铂TALEN。

[0066] (项目33)根据上述项目中任一项所述的载体,其中,上述核酸酶包含DNA结合域,

[0067] 该DNA结合域自N末端侧起连续地包含多个DNA结合模块,自N末端起第4n-3个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

[0068] 自N末端起第4n-2个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

[0069] 自N末端起第4n-1个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

[0070] 自N末端起第4n个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同,

[0071] 自N末端起第4n-3个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、自N末端起第4n-2个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、自N末端起第4n-1个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、以及自N末端起第4n个

DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合互不相同，

[0072] 此处，n为1～10的自然数，x为1～40的自然数，y为1～40的自然数，x和y为不同的自然数。

[0073] (项目34)根据上述项目中任一项所述的载体，其中，上述载体在从5’末端至3’末端的方向上依次包括：包含5’侧的gRNA靶标序列或被第一DNA结合域识别的核苷酸序列与第一核苷酸序列的区域；上述所期望的核酸；包含第二核苷酸序列与3’侧的gRNA靶标序列或被第二DNA结合域识别的核苷酸序列的区域。

[0074] (项目35)根据上述项目中任一项所述的载体，其中，第一核苷酸序列为3个碱基长～10个碱基长，和/或第二核苷酸序列为3个碱基长～10个碱基长。

[0075] (项目36)根据上述项目中任一项所述的载体，其中，上述载体包含多个导入盒，所述导入盒包含编码上述抗原受体的核酸。

[0076] (项目37)一种载体，其包含：

[0077] 序列号4的核酸和序列号5的核酸、序列号6的核酸和序列号7的核酸、或者序列号8的核酸和序列号9的核酸；

[0078] 序列号10的核酸和序列号11的核酸、序列号12的核酸和序列号13的核酸、或者序列号14的核酸和序列号15的核酸；和

[0079] 包含编码抗原受体的核酸的导入盒。

[0080] (项目37A)根据上述项目所述的载体，其中，所述载体具备上述项目中的1个或多项目所述的特征。

[0081] (项目38)根据上述项目中任一项所述的载体，其中，上述导入盒包含编码抗原受体的α链的序列和编码抗原受体的β链的序列。

[0082] (项目39)根据上述项目中任一项所述的载体，其中，上述导入盒包含polyA附加序列、前导序列、和/或1个或多个启动子序列。

[0083] (项目40)根据上述项目中任一项所述的载体，其中，上述导入盒在编码上述抗原受体的α链的序列和编码上述抗原受体的β链的序列之间包含P2A序列。

[0084] (项目41)根据上述项目中任一项所述的载体，其中，上述载体包含多个导入盒。

[0085] (项目42)一种试剂盒，其是用于将编码抗原受体的核酸插入细胞所含的核酸中的规定部位的试剂盒，所述试剂盒包含上述项目中任一项所述的载体和用于表达上述核酸酶的载体。

[0086] (项目42A)根据上述项目所述的试剂盒，其中，所述试剂盒具备上述项目中的1个或多个项目所述的特征。

[0087] (项目43)一种方法，其是在体外(in vitro)或体内(in vivo)将编码抗原受体的核酸插入免疫细胞所含的核酸中的规定部位的方法(在一个实施方式中在非人生物中在体内进行插入的方法)，所述方法包括将上述项目中任一项所述的载体和用于表达上述核酸酶的载体导入免疫细胞的工序。

[0088] (项目43A)根据上述项目所述的方法，其中，所述方法具备上述项目中的1个或多个项目所述的特征。

[0089] (项目44)一种制造表达抗原受体的免疫细胞的方法，其包括通过上述项目中任一项所述的方法将编码抗原受体的核酸插入上述免疫细胞所含的核酸中的规定部位的工序。

[0090] (项目45)一种对受试者实施免疫疗法的方法,其包括:

[0091] (A)从受试者取得血液的工序;

[0092] (B)将该血液的单核细胞(PMBC)的TRB敲除的工序;

[0093] (C)将该单核细胞进行CD3阴性浓缩的工序;

[0094] (D)将该单核细胞的TRA敲除并导入抗原受体(例如T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)及嵌合抗原受体(CAR))的工序;

[0095] (E)将该单核细胞进行CD3阳性浓缩的工序;和

[0096] (G)根据需要进行该单核细胞的扩大培养的工序。

[0097] (项目46)一种制造用于免疫疗法的细胞的方法,其包括:

[0098] (A)将从受试者取得的血液的单核细胞(PMBC)的TRB敲除的工序;

[0099] (B)将该单核细胞进行CD3阴性浓缩的工序;

[0100] (C)将该单核细胞的TRA敲除并导入抗原受体的工序;

[0101] (D)将该单核细胞进行CD3阳性浓缩的工序;和

[0102] (E)根据需要进行该单核细胞的扩大培养的工序。

[0103] (项目46A)根据上述项目所述的方法,其中,所述方法具备上述项目中的1个或多个项目所述的特征。

[0104] (项目47)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,上述TRA和/或TRB的切断使用铂TALEN来进行。

[0105] (项目48)根据上述项目中任一项所述的方法,其中,上述免疫疗法包括TCR-T疗法或CAR-T疗法。

[0106] (项目49)一种组合物,其包含用于在上述项目中任一项所述的方法中使用的铂TALEN。

[0107] (项目49A)根据上述项目所述的组合物,其中,所述组合物具备上述项目中的1个或多个项目所述的特征。

[0108] (项目50)根据上述项目所述的方法、载体或组合物,其中,上述细胞包括人细胞。

[0109] 在本发明中旨在表明上述的1个或多个特征除了所明示的组合以外还可进一步组合来提供。对于本发明的进而其他的实施方式及优点,只要根据需要阅读以下的详细说明并加以理解,就能被本领域技术人员所认识。

[0110] 发明的效果

[0111] 通过本发明的技术,不使用病毒载体便能改变免疫细胞、特别是导入所期望的抗原受体。由于不需要用于稳定地生产病毒的主细胞(master cell),因此能够减轻细胞加工费用。另外,本发明的技术能够将导入基因导入至基因组上的准确的位置。例如,在以源自父系的等位基因和源自母系的等位基因的同一序列作为靶标的情况下,每个细胞可以向所期望的基因组区导入1个或2个拷贝的TCR基因,安全性显著地提高。另外,通过本发明的技术导入的抗原受体可被长期稳定地表达。

附图说明

[0112] 图1是表示向Jurkat细胞(人T细胞白血病株)中导入NY-ESO-1抗原特异性TCR的结果的图。

[0113] 图2是表示通过本发明的方法导入的所期望的TCR稳定表达的图。其表示在基因导入后1个月的时间点的各细胞的TCR表达状态。

[0114] 图3表示加入Vβ链库解析用的抗体混合物(cocktail)时的导入了1G4 TCR的βnull Jurkat细胞和Jurkat细胞(对照)的表达TCR的解析结果。根据图3明显可以理解为:通过本法制作的表达1G4的Jurkat细胞使在基因组编辑前所内含的Vβ8链的表达消失,表达与1G4-TCR一致的Vβ13.1链。

[0115] 图4是表示通过本发明的方法导入了1G4 TCR的βnull Jurkat细胞中的TCR Vβ库解析的结果的图。其表示:通过本发明的方法导入了1G4 TCR的βnull Jurkat细胞不表达除了与1G4-TCR一致的Vβ13.1链以外的V链,即在基因组编辑后未产生源自非重排等位基因的新Vβ链的表达。

[0116] 图5是表示导入TCR序列向基因组中在靶插入(on-target insertion)的确认结果的图。

[0117] 图6是表示使用了本发明的方法的免疫疗法的工艺的例子的图。

[0118] 图7是表示本发明的载体的构成的例的图。

[0119] 图8是表示在将DNA插入本发明的载体时合并为1个来插入的情况和分成2个来插入的情况的例子的示意图。

[0120] 图9是表示嵌合抗原受体(CAR)基因的插入DNA的设计例的图。

[0121] 图10是表示βnull Jurkat细胞中的导入1G4的以往型PITCh载体和改良型PITCh载体的比较结果的图。

[0122] 图11是表示使用了改良型PITCh载体并通过电穿孔向βnull Jurkat细胞中导入1G4的确认结果的图。

[0123] 图12是表示使用了人T细胞时的1G4导入结果的图。

具体实施方式

[0124] 以下,示出最佳方式来说明本发明。在整个说明书中,只要没有特别说明,单数形式的表达应理解为也包括其复数形式的概念。因此,只要没有特别说明,单数形式的冠词(例如,在英语的情况下为"a"、"an"、"the"等)应理解为也包括其复数形式的概念。另外,只要没有特别说明,本说明书中所使用的术语应理解为以该领域中通常所用的含义使用。因此,只要没有其他定义,本说明书中所使用的所有专业术语和科技术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。在矛盾的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0125] (1.定义及基本技术的说明)

[0126] 以下,对本说明书中特别使用的术语的定义和/或基本的技术内容进行适当说明。

[0127] 在本说明书中,"抗原受体"是指与作为靶标的抗原特异性结合且向表达该受体的细胞内传递信号的任意分子。在本发明中,抗原受体可以是天然的抗原受体,也而可以是人工分子,例如,除了T细胞受体(TCR)·B细胞受体(BCR)外,还包括嵌合抗原受体(CAR)。

[0128] 在本说明书中,"T细胞受体(TCR)"是指存在于T细胞中的受体。TCR是包含2个TCR多肽链的异源二聚物受体分子,存在通常的T细胞所表达的αβ型TCR和具有特殊功能的γδ型TCR。α及β链TCR分子与多个CD3分子(CD3ζ链、CD3ε链、CD3γ链、CD3δ链)形成复合体,传递

抗原识别后的细胞内信号，引发各种免疫应答。伴随病毒感染，在细胞内增殖的病毒抗原或源自癌细胞的癌抗原等内源性抗原于MHC I类分子上以抗原肽的形式呈递。另外，源自外来微生物的抗原因胞吞作用(endocytosis)而被引入至抗原呈递细胞，经过处理(processing)后被呈递在MHC II类分子上。这些抗原分别被CD8+T细胞或CD4+T细胞所表达的TCR识别。还已知在由TCR分子介导的刺激中CD28、ICOS、OX40分子等共刺激分子较为重要。就在本说明书中作为主要目的之一的αβ型TCR而言，α及β的各基因产物通过独特的组合来表达特异性。

[0129] 在本说明书中，“嵌合抗原受体(CAR)”是指将抗原特异性移植至免疫系细胞(例如初始T细胞、中央记忆性T细胞、效应记忆性T细胞、或它们的组合等的T细胞、NK细胞、巨噬细胞等)的改变受体。CAR例如可包含抗原特异性靶向区域、细胞外域、跨膜域、共刺激域、和/或细胞内信号传递域。另外，也可包含使用多个(大多为2种)抗原特异性靶向区域的嵌合抗原受体(双特异性CAR)。

[0130] 在本说明书中，“微同源介导的末端接合(MMEJ)”是指如下机制：在真核生物的细胞中的、DNA双链被切断时识别5～30个碱基对左右的较短相同序列(微同源)并进行修复。

[0131] 在本说明书中，“免疫细胞”可列举淋巴细胞、巨噬细胞、树状细胞等，其是指可能损伤靶标细胞的全部效应细胞。例如包括CD8+T细胞、CD4+T细胞、NK细胞、γδT细胞、NKT细胞、B细胞及骨髓细胞等。这些细胞包括基因改变细胞，例如也包括将病毒或癌细胞特异性CD8+T细胞制成iPS细胞的免疫细胞、或者在初始CD8+T细胞中组入抗原受体(Tcell antigen receptor:TCR)基因而成的免疫细胞、或者组入有识别癌细胞表面表达分子的嵌合抗体(嵌合型抗原受体chimericantigen receptor:CAR)基因而成的免疫细胞。

[0132] (2.PITCh载体)

[0133] 在本发明的一方面，可提供一种载体，其用于与核酸酶组合而将所期望的核酸插入细胞所含的核酸中的规定部位。所期望的核酸可以包含编码抗原受体的核酸。此处，细胞所含的核酸在从5’末端至3’末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、上述规定部位、以及包含第二核苷酸序列的区域，核酸酶对细胞所含的规定部位进行特异性切断。载体能够以如下方式构成：其可通过核酸酶而产生核酸片段，所述核酸片段在从5’末端至3’末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、所期望的核酸、以及包含第二核苷酸序列的区域，而且，细胞所含的核酸中的第一核苷酸序列与载体中的第一核苷酸序列通过微同源介导性接合来连接，细胞所含的核酸中的第二核苷酸序列与载体中的第二核苷酸序列通过微同源介导性接合来连接，由此可插入所期望的核酸。对于这样的与核酸酶组合而能够导入由MMEJ介导的所期望的核酸的载体，例如记载于日本专利5900942号说明书中，其全部内容作为参考而援引在本说明书中。本发明的载体例如可以为具有以下记载的特征的载体。

[0134] 本发明中所使用的载体可以在从5’末端至3’末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、以插入为目的的所期望的核酸、以及包含第二核苷酸序列的区域。此处，该载体可与如下核酸酶组合使用，该核酸酶对如下部分进行特异性切断，该部分夹着以插入核酸为目的的规定部位的包括包含第一核苷酸序列的区域与包含第二核苷酸序列的细胞内的核酸的区域。将上述载体导入细胞，使上述核酸酶作用于细胞，在细胞内的核酸中的上述规定部位进行切断，同时也使上述核酸酶作用于载体，由此可产生在从5’末端至3’末

端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、上述所期望的核酸、以及包含第二核苷酸序列的区域的核酸片段。由此，在细胞内，上述细胞内的核酸中的第一核苷酸序列与上述载体中的第一核苷酸序列可通过微同源介导性接合(MMEJ)来连接，上述细胞内的核酸中的第二核苷酸序列与上述载体中的第二核苷酸序列可通过MMEJ来连接。由此，可将所期望的核酸准确地插入细胞的核酸的规定部位。插入能够对抗原受体基因序列之类的达到数kb以上的较长链的核酸来进行。核酸酶可对插入前的细胞内的核酸所含的包括包含第一核苷酸序列的区域、以及包含第二核苷酸序列的区域的部分进行特异性切断，但连接后的核酸可能因上述所期望的核酸的插入而失去上述部分的一部分。由此，不会发生由存在于细胞内的核酸酶引起的再次切断，能稳定地保持，可高频率地插入所期望的核酸。

[0135] 该载体及利用其的方法是通过在较多细胞中发挥功能的微同源介导性末端接合来进行连接的，因此即便对于同源重组效率较低的发育阶段的细胞等，也可准确且高频率地插入所期望的核酸，可应用的细胞的种类的范围较广。另外，关于该载体及利用其的方法，可同时进行用于导入核酸酶的载体、以及用于插入核酸的载体对于细胞的插入，操作较为简单。进而，该载体及利用其的方法通过由微同源介导性末端接合引起的细胞内的核酸的局部变化，可防止插入后的核酸的再次切断，因此也可使用活性较高的同源二聚体型结构域作为核酸酶所含的DNA切断域，材料的选择范围较广。

[0136] 本发明的载体是用于通过核酸酶而将所期望的核酸插入细胞所含的核酸中的规定部位的载体，此处，上述细胞所含的核酸在从5’末端至3’末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、上述规定部位、以及包含第二核苷酸序列的区域，上述核酸酶对上述细胞所含的包括上述的包含第一核苷酸序列的区域以及上述的包含第二核苷酸序列的区域的部分进行特异性切断，上述载体可以为在从5’末端至3’末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、上述所期望的核酸、以及包含第二核苷酸序列的区域的载体。

[0137] 另外，本发明的载体用于通过包含第一DNA结合域及第二DNA结合域的核酸酶而将所期望的核酸插入细胞所含的核酸中的规定部位，此处，上述细胞所含的核酸在从5’末端至3’末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、上述规定部位、以及包含第二核苷酸序列的区域，在上述细胞所含的核酸中，包含第一核苷酸序列的区域、上述规定部位、以及包含第二核苷酸序列的区域分别处于包含被第一DNA结合域识别的核苷酸序列的区域与包含被第二DNA结合域识别的核苷酸序列的区域之间，此处，上述载体在从5’末端至3’末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、上述所期望的核酸、以及包含第二核苷酸序列的区域，在上述载体中，包含第一核苷酸序列的区域以及包含第二核苷酸序列的区域分别处于包含被第一DNA结合域识别的核苷酸序列的区域与包含被第二DNA结合域识别的核苷酸序列的区域之间，上述载体可以为通过上述核酸酶而产生核酸片段的载体，所述核酸片段在从5’末端至3’末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、上述所期望的核酸、以及包含第二核苷酸序列的区域。

[0138] 另外，在本发明的载体中，上述细胞所含的核酸中的第一核苷酸序列与上述载体中的第一核苷酸序列通过微同源介导性接合(MMEJ)来连接，上述细胞所含的核酸中的第二核苷酸序列与上述载体中的第二核苷酸序列通过MMEJ来连接，由此可插入上述所期望的核酸。

[0139] 在本发明中，核酸酶可以为同源二聚体型的核酸酶，载体可以为环状载体。

[0140] 在本发明中，可提供一种试剂盒，其是用于将所期望的核酸插入细胞所含的核酸中的规定部位的试剂盒，所述试剂盒包含本发明的载体和用于表达核酸酶的载体。在本发明中，可提供一种方法，其是将所期望的核酸插入细胞所含的核酸中的规定部位的方法，所述方法包括将本发明的载体和用于表达核酸酶的载体导入细胞的工序。

[0141] 若使用本发明的载体，则无需制作长链的载体等烦杂的工序，便可不依赖于同源重组效率而在不会发生框移的情况下将所期望的核酸准确且简单地插入人免疫系细胞，也可插入达到数kb以上的较长链的核酸。另外，使用本发明的载体的核酸的插入方法可与核酸酶组合来使用，该核酸酶包含具有高核酸酶活性的同源二聚体型的DNA切断域。或者，使用本发明的载体的核酸的插入方法也可与CRISPR/Cas系统等RNA诱导型核酸酶组合来使用。

[0142] 插入本发明的载体的细胞包含核酸，所述核酸在从5’末端至3’末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、以插入核酸为目的的规定部位、以及包含第二核苷酸序列的区域。第一核苷酸序列及第二核苷酸序列是用于表示与插入的载体所含的序列的关系的简单表述。第一核苷酸序列及第二核苷酸序列可与上述规定部位直接邻接，也可隔着包含特定碱基序列的区域邻接。在隔着包含特定碱基序列的区域邻接的情况下，该特定的碱基序列优选为1个碱基长～7个碱基长，更优选为1个碱基长～3个碱基长。第一核苷酸序列优选为3个碱基长～10个碱基长，更优选为4个碱基长～8个碱基长，进一步优选为5个碱基长～7个碱基长。另外，第二核苷酸序列优选为3个碱基长～10个碱基长，更优选为4个碱基长～8个碱基长，进一步优选为5个碱基长～7个碱基长。

[0143] 本发明的载体可以为用于通过核酸酶而将所期望的核酸插入细胞所含的核酸中的规定部位的载体。在本发明中，上述核酸酶可以对上述细胞所含的包括上述的包含第一核苷酸序列的区域及上述的包含第二核苷酸序列的区域的部分进行特异性切断。作为这样的核酸酶，可列举包含第一DNA结合域及第二DNA结合域的核酸酶。作为进行特异性切断的其他核酸酶，可列举基于CRISPR/Cas系统的核酸酶等RNA诱导型核酸酶。在CRISPR/Cas系统中，对于由Cas9核酸酶引起的双链切断而言称作PAM的部分是必须的。作为Cas9核酸酶，可列举例如源自酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)的SpCas9、源自嗜热链球菌(Streptococcus thermophilus)的StCas9。SpCas9的PAM是“5’-NGG-3’”序列(N为任意的核苷酸)，发生双链切断的部位位于PAM上游3个碱基处(5’末端侧)。CRISPR/Cas系统中的向导RNA(gRNA)识别位于发生双链切断的部位的5’侧的碱基序列。而且，CRISPR/Cas系统中的发生双链切断的部位与在细胞所含的核酸中以插入所期望的核酸为目的的上述的规定部位相对应。在该规定部位的两端存在包含第一核苷酸序列的区域和包含第二核苷酸序列的区域。因此，使用gRNA(gRNA识别细胞中的核酸所含的位于较PAM更靠5’末端侧的碱基序列)的CRISPR/Cas系统可对包括包含第一核苷酸序列的区域及包含第二核苷酸序列的区域的部分进行特异性切断。

[0144] 本发明的载体可在从5’末端至3’末端的方向上依次包括包含第一核苷酸序列的区域、以插入细胞为目的的所期望的核酸、以及包含第二核苷酸序列的区域。载体所含的包含第一核苷酸序列的区域可以与上述的细胞所含的核酸中的包含第一核苷酸序列的区域相同。另外，载体所含的包含第二核苷酸序列的区域可以与上述的细胞所含的核酸中的包含第二核苷酸序列的区域相同。

[0145] 本发明的载体可优选为环状载体。另外，在载体为环状载体的情况下，本发明的载体所含的第二核苷酸序列的3’末端与第一核苷酸序列的5’末端优选邻接或直接连接。在本发明的载体为环状载体、且第二核苷酸序列与第一核苷酸序列邻接的情况下，第二核苷酸序列的3’末端与第一核苷酸序列的5’末端被包含优选1～7个碱基长、更优选1～5个碱基长、进一步优选1～3个碱基长的碱基序列的区域隔开。

[0146] 在以利用本发明的载体进行插入为目的的细胞所含的核酸中，包含第一核苷酸序列的区域可处于包含被第一DNA结合域识别的核苷酸序列的区域与包含被第二DNA结合域识别的核苷酸序列的区域之间。另外，包含第二核苷酸序列的区域可处于包含被第一DNA结合域识别的核苷酸序列的区域与包含被第二DNA结合域识别的核苷酸序列的区域之间。另外，上述规定部位可处于包含被第一DNA结合域识别的核苷酸序列的区域与包含被第二DNA结合域识别的核苷酸序列的区域之间。在该核酸中，包围包含第一核苷酸序列的区域的被DNA结合域识别的2个核苷酸序列的组合也可与包围包含第二核苷酸序列的区域的被DNA结合域识别的2个核苷酸序列的组合不同。在该情况下，用于切断包含第一核苷酸序列的区域的周边的核酸酶与用于切断包含第二核苷酸序列的区域的周边的核酸酶可使用不同的核酸酶。在上述细胞所含的核酸中，包含被第一DNA结合域识别的核苷酸序列的区域与包含被第二DNA结合域所识别的核苷酸序列的区域被包含优选5～40个碱基长、更优选10～30个碱基长、进一步优选12～20个碱基长的核苷酸序列的区域隔开。隔开两者的区域的碱基长可与第一核苷酸序列的碱基长及第二核苷酸序列的碱基长的合计碱基长度相同，也可不同。例如，在上述细胞所含的核酸中，在满足第一核苷酸序列的3’末端与第二核苷酸序列的5’末端直接接触、被第一DNA结合域识别的核苷酸序列与第一核苷酸序列之间无重复、以及第二核苷酸序列与被第二DNA结合域识别的核苷酸序列之间无重复的条件的情况下，隔开上述两者的区域的碱基长与第一核苷酸序列的碱基长及第二核苷酸序列的碱基长的合计碱基长相同。然而，在不满足选自这些条件中的1个或多个条件的情况下，隔开上述两者的区域的碱基长与第一核苷酸序列的碱基长及第二核苷酸序列的碱基长的合计碱基长不同。在细胞所含的核酸中，包含第一核苷酸序列的区域可以与包含被第一DNA结合域识别的核苷酸序列的区域局部地重复。另外，在细胞所含的核酸中，包含第二核苷酸序列的区域可以与包含被第二DNA结合域识别的核苷酸序列的区域局部地重复。在存在局部地重复的情况下，重复的部分包含优选1～6个碱基长、更优选1～5个碱基长、进一步优选2～4个碱基长的核苷酸序列。在存在局部地重复的情况下，通过基于微同源介导性末端接合进行的连接，包括包含第一核苷酸序列的区域及包含第二核苷酸序列的区域的部分(其为隔开被DNA结合域识别的2个区域的部分)的长度更大幅地减少，因此更不易发生连接后的再次切断，所插入的核酸得以更稳定地保持，故而优选。

[0147] 在本发明的载体中，包含第一核苷酸序列的区域以及包含第二核苷酸序列的区域可以分别处于包含被第一DNA结合域识别的核苷酸序列的区域与包含被第二DNA结合域识别的核苷酸序列的区域之间。在该载体中，包围包含第一核苷酸序列的区域的被DNA结合域识别的2个核苷酸序列的组合也可与包围包含第二核苷酸序列的区域的被DNA结合域识别的2个核苷酸序列的组合不同。在该情况下，用于切断包含第一核苷酸序列的区域的周边的核酸酶与用于切断包含第二核苷酸序列的区域的周边的核酸酶可使用不同的核酸酶。在载体中，对于包含被第一DNA结合域识别的核苷酸序列的区域而言，与包含被第二DNA结合域

识别的核苷酸序列的区域相比，可存在于5'末端侧，也可存在于3'末端侧。然而，在载体中，位于第一核酸酶序列的3'末端侧且被第一DNA结合域或第二DNA结合域识别的核苷酸序列优选与位于细胞所含的核酸中的第二核苷酸序列的3'末端侧且被第一DNA结合域或第二DNA结合域识别的序列不同。另外，在载体中，位于第二核酸酶序列的5'末端侧且被第一DNA结合域或第二DNA结合域识别的核苷酸序列优选与位于细胞所含的核酸中的第一核苷酸序列的5'末端侧且被第一DNA结合域或第二DNA结合域识别的序列不同。在这些情况下，通过将异源二聚物型的包含DNA切断域的核酸酶组合使用，可进一步降低在插入所期望的核酸后所发生的再次切断的频率。另外，载体可以为通过包含第一DNA结合域及第二DNA结合域的1个或多个核酸酶而产生1处切断部位的载体，也可以为产生2处以上的切断部位的载体。作为产生2处切断部位的载体，可列举例如下述载体：在从5'末端至3'末端的方向上依序包括包含被第一DNA结合域识别的核苷酸序列的区域、包含第一核苷酸序列的区域、包含被第二DNA结合域识别的核苷酸序列的区域、以插入细胞为目的的所期望的核酸、包含被第一DNA结合域识别的核苷酸序列的区域、包含第二核苷酸序列的区域、以及包含被第二DNA结合域识别的核苷酸序列的区域。在使用产生2处切断部位的载体的情况下，可通过利用核酸酶进行切断而将载体所含的多余核酸去除，因此可更安全地取得不包含多余核酸的所期望的细胞。

[0148] 在本发明的载体中，对于将包含被第一DNA结合域识别的核苷酸序列的区域与包含被第二DNA结合域识别的核苷酸序列的区域隔开的区域(该区域包括包含第一核苷酸序列的区域或包含第二核苷酸序列的区域)，包含优选5～40个碱基长、更优选10～30个碱基长、进一步优选12～20个碱基长的核苷酸序列。在将包含被第一DNA结合域识别的核苷酸序列的区域与包含被第二DNA结合域识别的核苷酸序列的区域隔开的区域包含第一核苷酸序列及第二核苷酸序列两者的情况下，上述隔开区域的碱基长与第一核苷酸序列的碱基长及第二核苷酸序列的碱基长的合计相同或大致相同。如上所述，第一核苷酸序列优选为3个碱基长～10个碱基长，更优选为4个碱基长～8个碱基长，进一步优选为5个碱基长～7个碱基长。另外，如上所述，第二核苷酸序列优选为3个碱基长～10个碱基长，更优选为4个碱基长～8个碱基长，进一步优选为5个碱基长～7个碱基长。在包含第一核苷酸序列或第二核苷酸序列的区域与包含被DNA结合域识别的核苷酸序列的区域存在重复的情况、包含第一核苷酸序列的区域与包含第二核苷酸序列的区域存在重复的情况、或者包含第一核苷酸序列的区域与包含第二核苷酸序列的区域不直接连接的情况下，上述隔开区域的碱基长不与第一核苷酸序列的碱基长及第二核苷酸序列的碱基长的合计碱基长相同，只不过会大致相同。

[0149] 在本发明的载体中，例如，上述细胞所含的核酸中的第一核苷酸序列与上述载体中的第一核苷酸序列通过微同源介导性接合(MMEJ)来连接，上述细胞所含的核酸中的第二核苷酸序列与上述载体中的第二核苷酸序列通过MMEJ来连接，由此可将上述所期望的核酸插入上述细胞所含的核酸中的规定部位。

[0150] 所期望的核酸可优选为编码抗原受体的核酸。抗原受体可选自T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)及嵌合抗原受体(CAR)。抗原受体可为包含2个以上的链的多聚体。所期望的核酸可为编码抗原受体的多个链(例如α链及β链)的核酸。

[0151] 在本发明的载体中，包含第一核苷酸序列的区域与上述所期望的核酸可直接邻接。另外，上述所期望的核酸与包含第二核苷酸序列的区域可直接邻接。另外，在上述所期

望的核酸包含基因等功能性因子的情况下,该载体所含的第一核苷酸序列及第二核苷酸序列也可为编码上述功能性因子的一部分的核苷酸序列。

[0152] 本发明的载体可以为环状载体,也可以为直链状载体。优选使通过本发明提供的载体为环状载体。

[0153] (2-1.用于导入抗原受体的PITCh载体)

[0154] 在本发明中,可使用根据需要具备上述特征的载体,该载体以用于导入抗原受体的方式构成。这样的载体可具备下述说明的1个或多个特征。

[0155] 载体可包含编码抗原受体的核酸,此处,与该载体组合使用的核酸酶可为切断免疫细胞的内源性抗原受体的基因座的核酸酶。免疫细胞的内源性抗原受体基因的敲除与抗原受体的导入可同时发生。内源性抗原受体基因可为TRA基因或TRB基因。由于TRB基因的恒定区存在4个部位,因此通过进行导入直至4个拷贝,从而能够使TCR的表达量增加。编码抗原受体的核酸可共同编码抗原受体的α链及β链。

[0156] 同义置换:在规定部位存在于细胞的内源性抗原受体基因中的情况下,编码抗原受体的核酸在与该细胞所含的基于核酸酶的靶标部位对应的序列中可包含同义置换。同义置换可在维持所表达的抗原受体的基本结构的状态下防止所导入的抗原受体序列被核酸酶切断,可实现较高的导入效率。例如,可对存在于供体TCR盒序列上的向导RNA或TALEN靶标相同序列的密码子进行改变以成为同义置换。

[0157] 启动子:本发明的技术是将编码抗原受体的核酸导入基因组上,此处,编码抗原受体的核酸可包含启动子,所述启动子可操作地连接至抗原受体,可包括启动子在内导入基因组上。在本发明的技术中,由于理论上仅将1个拷贝的抗原受体插入与核酸酶的靶标部位对应的序列内,因此有时优选选择能够高表达且稳定表达的启动子。启动子序列例如可为EF-1α启动子或出于导入抗原受体基因的细胞用途所开发出的合成启动子(Colamartino A,Biol Blood Marrow Transplant、2019;3:Suppl S164,https://www.bbmt.org/article/S1083-8791(18)31286-2/abstract等)。

[0158] 前导序列:编码抗原受体的核酸可包含用于在抗原受体的上游提高翻译效率的前导序列。在本发明的技术中,由于理论上仅将1个拷贝的抗原受体插入与核酸酶的靶标部位对应的序列内,因此包括提高翻译效率的序列在内一起导入是有利的。作为前导序列,例如可使用β球蛋白基因的5'-UTR序列。另外,据报道其中的爪蟾球蛋白5'-UTR序列为翻译效率最优异的前导序列(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2017171),并且被认为适合在本发明的载体中使用。

[0159] 萤光色素:为了制作能够临床利用的细胞,本发明的载体较理想为不包含EGFP、mKATE等萤光色素序列。

[0160] 盒长:对于本发明的载体的用于导入的序列(抗原受体盒),有时为了容易组入被核酸酶切断的部位,优选为设为最小限度的长度。例如本发明的载体的抗原受体盒的长度例如可为小于约5000个碱基对、小于约4900个碱基对、小于约4800个碱基对、小于约4700个碱基对、小于约4600个碱基对、小于约4500个碱基对、小于约4400个碱基对、小于约4300个碱基对、小于约4200个碱基对、小于约4100个碱基对、小于约4000个碱基对、小于约3900个碱基对、小于约3800个碱基对、小于约3700个碱基对、小于约3600个碱基对、或者小于约3500个碱基对、例如为约3400个碱基对。由于载体尺寸超过10kb的质粒的导入效率·向核

内的转移效率均降低，因此包含多克隆位点的未插入盒的核心载体的尺寸例如可以为小于约6500个碱基对、小于约6400个碱基对、小于约6300个碱基对、小于约6200个碱基对、小于约6100个碱基对、小于约6000个碱基对、小于约5900个碱基对、小于约5800个碱基对、小于约5700个碱基对、小于约5600个碱基对、小于约5500个碱基对、小于约5400个碱基对、小于约5300个碱基对、小于约5200个碱基对、小于约5100个碱基对、小于约5000个碱基对、小于约4900个碱基对、小于约4800个碱基对、小于约4700个碱基对、小于约4600个碱基对、小于约4500个碱基对、或者小于约4400个碱基对、例如为约4300个碱基对。在抗原受体盒较大的情况(例如使用IRES序列等使多个抗原受体(例如多个TCR和/或CAR)同时表达的情况)下，也可利用较小的核心载体。

[0161] 载体量：本发明的载体可以按照每2×10^6至10^7个细胞为约1～约5μg左右的量导入。通过使用该程度的量，可避免质粒的毒性、并且以较高的存活率进行导入。

[0162] 本发明中可使用的载体例如可以为具有序列号1、2或3所示的序列、或对其施加适当改变而成的载体。本领域技术人员可理解到编码抗原受体的部分可置换为编码所期望的抗原受体的部分来使用。

[0163] 本发明中可使用的载体可包含导入至细胞基因组中的盒部分、基于核酸酶的识别序列和载体骨架。载体骨架部分例如可为序列号4及序列号5、序列号6及序列号7、序列号8及序列号9等。作为基于核酸酶的识别序列，可为选自序列号10～15的序列。作为盒部分的子，可列举序列号16～18所示的序列。可根据需要从该序列中对要素进行置换、追加、删除而作为盒部分来使用。

[0164] 盒部分除包含编码抗原受体的序列以外还可包含例如polyA附加序列、前导序列、1个或多个启动子序列。作为polyA附加序列的一例，可列举序列号19的序列。作为前导序列的一例，可列举序列号21的序列。作为启动子序列，可列举例如序列号22或23的序列。需要说明的是，在本发明中，关于启动子序列、前导序列、polyA附加序列，只要可实现所期望的的表达，则在载体中可根据需要进行删除，另外，可进行改变，或者可与具有同样效果的不同序列置换来使用。

[0165] 应注意的是，在本发明中，关于具体示出的序列，只要维持所期望的活性即可，可使用施加改变后而成的序列。例如在本发明中可使用相对于具体示出的序列具有至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％的一致性的序列。在本发明中，关于具体示出的核酸序列，只要维持所期望的活性，则可施加1个或多个(优选为1个或数个或者1、2、3、或4个)的突变(置换、插入、缺失)来使用。

[0166] 改变氨基酸序列也可为具有1个或多个(优选为1个或数个或者1、2、3、或4个)的保守性置换的氨基酸序列。此处所谓“保存性置换”是指：以实质上不会改变蛋白质的功能的方式，利用其他化学上类似的氨基酸残基来置换1个或多个氨基酸残基。例如可列举：通过另一疏水性残基来置换某一疏水性残基的情况、通过具有相同电荷的另一极性残基来置换某一极性残基的情况等。关于可进行这样的置换的功能上类似的氨基酸，每种氨基酸在该领域中是公知的。若列举具体例，则作为非极性(疏水性)氨基酸，可列举：丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、脯氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸等。作为极性(中性)氨基酸，可列举：甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、半胱氨酸等。作为具有阳电荷的

(碱性)氨基酸,可列举:精氨酸、组氨酸、赖氨酸等。另外,作为具有负电荷的(酸性)氨基酸,可列举天冬氨酸、谷氨酸等。

[0167] 由于通过多个基因密码子可编码同一氨基酸,因此可能存在编码同一氨基酸序列的多个核酸序列,只要目的在于编码氨基酸序列,则可利用不同的核酸序列。

[0168] (3.核酸酶)

[0169] 在本说明书中,对用于与载体组合而将所期望的核酸插入细胞所含的核酸中的规定部位的核酸酶或其用途进行说明。在本发明中,对于免疫细胞,可对其内源性抗原受体基因进行改变(例如敲除),但也可使用核酸酶来对其进行改变,其后通过同样的核酸酶进行使用载体且由MMEJ介导的抗原受体的导入。内源性抗原受体的敲除可通过核酸酶来进行,除此以外,还可利用反义法、或RNAi等。另外,内源性抗原受体的去除可通过内源性TCR基因的敲除来进行。内源性TCR基因的改变例如可通过使编码区域的全部或一部分缺失、向调节区域导入突变、导入无义突变或错义突变等来进行。

[0170] 优选可使用基因组编辑技术来进行内源性TCR基因的改变和/或编码抗原受体的核酸的导入。基因组编辑是利用部位特异性核酸酶而对靶基因进行改变的技术。作为基因组编辑技术,可列举:ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9等。分别具有结合域以及切断域,所述结合域实现DNA序列向所期望序列的特异性结合,所述切断域在所期望序列的部位切断DNA。

[0171] ZFN是包含锌指域和DNA切断域的人工限制酶。锌指域能够以识别任意的DNA碱基序列的方式进行改变,由此,锌指核酸酶能够将复杂的基因组中的单一序列作为靶标。

[0172] 相对于ZFN、TALEN基本上作为一个蛋白质来使用,CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9(Crispr ASsociated protein9)系统包含向导RNA和Cas9这两个不同的分子。通过使向导RNA中包含与DNA的靶标部位互补的序列,从而向导RNA能够与靶标部位特异性结合。如此,以覆盖向导RNA和DNA的方式结合Cas9蛋白质而切断DNA。Cas9本身可重复使用,仅需基于靶标部位来制作向导RNA,因此多重化较为容易。

[0173] TALEN(转录活化因子样效应子核酸酶)是人工酶,以作为限制酶的Fok1为DNA切断域,并融合了从植物病原细菌黄单胞菌属(Xanthomonas)分泌出的TALE蛋白质的DNA结合域。TALE蛋白质的DNA结合域采取34个左右的氨基酸的重复结构。将该重复单元称为模块。其中,第12位和第13位氨基酸是可变的,在与靶标序列结合的部分中称为“重复可变二残基”(RVD)。TALEN使用与靶标DNA的相反链分别结合的分子作为成对的L TALEN和R TALEN。为了Fok1显示切断活性,TALEN需要维持适当的距离来形成二聚体。关于TALEN中的容许错配或脱靶活性,几乎没有报告,其特征是高特异性。在改变T细胞时,因脱靶发生改变的情况下,可能引起意想不到的有害作用,因此在本发明中优选使用具有高特异性的TALEN。

[0174] 除以往型的TALEN以外,还制作各种改变TALEN。从高特异性及高改变效率的方面考虑,优选通过这样的TALEN来进行内源性TCR基因的改变。在本说明书的实施例中,证实了能够使用改变TALEN来实现T细胞的内源性TCR的完全去除。

[0175] 本发明中可使用的载体可为用于通过本说明书中所记载的任意核酸酶来插入所期望的核酸的载体。核酸酶可为包含第一DNA结合域及第二DNA结合域的核酸酶。

[0176] 作为DNA结合域的来源,可列举:植物病原菌黄单胞菌属的TALE(Transcription Activator-Like Effector,转录活化因子样效应子)、锌指(Zinc finger)等。DNA结合域优

选自N末端侧起连续地包含特异性地识别碱基对的1个或多个DNA结合模块。1个DNA结合模块特异性地识别1个碱基对。因此，第一DNA结合域及第二DNA结合域分别识别包含特定核苷酸序列的区域。第一DNA结合域所识别的核苷酸序列与第二DNA结合域所识别的核苷酸序列可相同也可不同。关于DNA结合域所含的DNA结合模块的数量，从兼顾DNA切断域的高核酸酶活性与DNA序列的高识别特异性的观点考虑，优选为8～40，更优选为12～25，进一步优选为15～20。作为DNA结合模块，例如可列举TAL效应子重复序列(effector repeat)等。作为1个DNA结合模块的长度，可列举例如20～45、30～38、32～36、或34等。DNA结合域所含的DNA结合模块的长度优选就所有DNA结合模块而言均相同。第一DNA结合域及第二DNA结合域优选来源、特性等相同。

[0177] 在使用RNA诱导型Fok1核酸酶(Fok1-dCas9)的情况下，与gRNA形成复合体的Fok1-dCas9可相当于包含DNA结合域的核酸酶。dCas9是其催化剂活性已失活的Cas9，将其引导至识别位于发生双链切断的部位附近的碱基序列的gRNA，与核酸结合。即，与gRNA形成复合体的dCas9可相当于DNA结合域。

[0178] 包含第一DNA结合域及第二DNA结合域的核酸酶优选包括：包含第一DNA结合域及第一DNA切断域的第一核酸酶亚单元；以及包含第二DNA结合域及第二DNA切断域的第二核酸酶亚单元。

[0179] 第一DNA切断域及第二DNA切断域优选的是：第一DNA结合域及第二DNA结合域分别与DNA结合后，相互接近而形成多聚体，取得得到提高的核酸酶活性。作为这样的DNA切断域，可列举源自限制酶Fok1的DNA切断域等。DNA切断域可为异源二聚体型DNA切断域，也可为同源二聚体型DNA切断域。若第一DNA切断域与第二DNA切断域接近，则形成多聚体，可获得得到提高的核酸酶活性，但是，即便第一DNA切断域与第一DNA切断域接近，也不形成多聚体，无法获得得到提高的核酸酶活性，另外，即便第二DNA切断域与第二DNA切断域接近，也不形成多聚体，无法获得得到提高的核酸酶活性，在此情况下，该第一DNA切断域和该第二DNA切断域为异源二聚体型DNA切断域。另外，若第一DNA切断域与第一DNA切断域接近，则形成多聚体，使核酸酶活性提高，在此情况下，该第一DNA切断域为同源二聚体型DNA切断域。在使用同源二聚体型DNA切断域的情况下，通常可获得较高的核酸酶活性。第一DNA切断域及第二DNA切断域优选的是来源、特性等相同。

[0180] 在使用TALEN的情况下，在第一核酸酶亚单元中，第一DNA结合域与第一DNA切断域通过多肽来连接，该多肽包含20～70个、25～65个或30～60个、优选35～55个、更优选40～50个、进一步优选45～49个、最优选47个氨基酸。在使用ZFN的情况下，在第一核酸酶亚单元中，第一DNA结合域与第一DNA切断域通过多肽来连接，该多肽包含0～20个或2～10个、优选3～9个、更优选4～8个、进一步优选5～7个氨基酸。使用Fok1-dCas9的情况下，于第一核酸酶亚单元中，dCas9与Fok1系通过多肽连接，该多肽包含1～20个、1～15个、或1～10个、优选为2～8个、更优选3～7个、进一步优选4～6个、最优选5个氨基酸。关于第二核酸酶亚单元，也同样。通过这样的长度的多肽来连接的第一核酸酶亚单元对于包括包含第一核苷酸序列的区域以及包含第二核苷酸序列的区域的部分的长度而言的特异性较高，并且对特定长度的间隔区域进行特异性切断，因此，通过非特异性切断而将核酸插入目标外部位的频率较低，另外，下述利用微同源介导性末端接合进行连接后的核酸发生再次切断的频率较低，故而优选。

[0181] 在本发明的载体中，例如核酸酶也可与基于CRISPR/Cas系统的核酸酶等RNA诱导型核酸酶组合，例如核酸酶可为Cas9核酸酶。

[0182] 在本发明的载体中，核酸酶为ZFN、TALEN或Fokl-dCas9，优选为TALEN。ZFN、TALEN或Fokl-dCas9可为同源二聚体型，也可为异源二聚体型。上述核酸酶优选为同源二聚体型的ZFN、TALEN或Fokl-dCas9，更优选为同源二聚体型的TALEN。

[0183] 上述核酸酶也包括它们的突变体。这样的突变体只要显示上述核酸酶的活性，则可为任意的核酸酶。作为这样的突变体，可列举例如如下核酸酶，该核酸酶包含在上述核酸酶的氨基酸序列中置换、缺失和/或附加了数个例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸而成的氨基酸序列。

[0184] 核酸酶可为切断免疫细胞的内源性抗原受体的基因座的核酸酶。免疫细胞的内源性抗原受体基因的敲除和抗原受体的导入能够同时发生。内源性抗原受体基因可为TRA基因或TRB基因。另外，可以将TRA基因或TRB基因的恒定区作为靶标。

[0185] (3-1.改变TALEN)

[0186] 在本发明的一方面，核酸酶优选为TALEN，更优选为铂TALEN。如该领域中所公知那样，TALEN是使用了转录活化因子样(TAL)蛋白质的基因组编辑技术(例如参照美国专利8,470,973号、美国专利8,586,363号)。作为铂TALEN的代表性的例子，可列举通过设为周期性配置而使活性较Voytas TALEN得到上升的铂TALEN，该周期性配置是使TALEN的DNA结合重复序列所含的34个氨基酸中的第4个和第32个的氨基酸产生变化(variations)(Sakuma et al.,Sci Rep,2013)。在本发明的方法中，优选的是可使用铂TALEN进行内源性TCR基因的编辑和/或抗原受体的导入。关于铂TALEN，已记载于日本特开2016-175922中，且其全部内容作为参考被援引于本说明书中。本发明的改变TALEN例如可为具有以下所记载的特征的TALEN。在本发明的1个实施方式中，可兼顾功能域的高功能与对于DNA序列的高识别特异性，而以高概率且安全地发挥所期望的功能，而且，使用能够以简便的操作制作的多肽或编码其的核酸，进行内源性TCR基因的改变和/或抗原受体的导入。

[0187] 下述多肽可兼顾功能域的高功能和对于DNA序列的高识别特别性，该多肽中DNA结合域和功能域通过包含35～55个氨基酸的多肽来连接、且DNA结合域所含的DNA结合模块中的2个特定位置的氨基酸在每4个DNA结合模块中呈现不同的重复方式。用于表达该多肽的载体可通过使用具有特定特征的载体集及具有特定特征的载体库而简单地制作。

[0188] 在本发明的1个实施方式中，本发明可利用包含DNA结合域及功能域的多肽。关于该多肽，可使用如下的多肽或编码其的核酸，即，DNA结合域和功能域通过包含35～55个氨基酸的多肽来连接，DNA结合域自N末端侧连续地包含多个DNA结合模块，且自N末端起第4n-3个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同，自N末端起第4n-2个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同，自N末端起第4n-1个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同，自N末端起第4n个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的n而言均相同，自N末端起第4n-3个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、自N末端起第4n-2个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、自N末端起第4n-1个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、以及自N末端起第4n个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合互不相同，此处，n

为1～10的自然数，x为1～40的自然数，y为1～40的自然数，x和y是不同的自然数。功能域可以为DNA切断域。该多肽包括编码多肽的多核苷酸。

[0189] 另外，本发明可利用载体库，该载体库用于制作包含编码上述多肽的多核苷酸的载体，此处，载体库由自5'末端起依次具有第一限制酶切断部位、编码4个DNA结合模块的多核苷酸、以及第二限制酶切断部位的多个载体构成，此处，第一限制酶切断部位及第二限制酶切断部位的组合是A型限制酶切断部位及B型限制酶切断部位的组合、A型限制酶切断部位及C型限制酶切断部位的组合、A型限制酶切断部位及D型限制酶切断部位的组合、A型限制酶切断部位及E型限制酶切断部位的组合、B型限制酶切断部位及C型限制酶切断部位的组合、C型限制酶切断部位及D型限制酶切断部位的组合、以及D型限制酶切断部位及E型限制酶切断部位的组合中的任意组合，此处，A型限制酶切断部位～E型限制酶切断部位通过基于同一限制酶的切断，均会产生互不相同的切断末端，4个DNA结合模块中，自5'末端起第一个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的载体而言均相同，自5'末端起第二个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的载体而言均相同，自5'末端起第3个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的载体而言均相同，自5'末端起第4个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合就任意的载体而言均相同，自5'末端起第一个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、自5'末端起第二个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、自5'末端起第3个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合、以及自5'末端起第4个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合互不相同，此处，x为1～40的自然数，y为1～40的自然数，x和y是不同的自然数。

[0190] 本发明还可利用用于制作上述载体库的载体集。此处，该载体集包含多个载体，该载体自5'末端起依次包括第一限制酶切断部位、DNA结合模块及第二限制酶切断部位，第一限制酶切断部位及第二限制酶切断部位通过基于同一限制酶的切断而产生互不相同的切断末端，DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合是4个不同的组合中的任意组合，此处，x为1～40的自然数，y为1～40的自然数，x和y是不同的自然数。

[0191] 对于上述多肽，为了在实现功能域的高功能的同时，实现对于DNA序列的高识别特异性，可通过将包含编码上述多肽的多核苷酸的载体导入细胞，从而安全且高概率地实现所期望的TCR基因的改变和/或抗原受体的导入。另外，若使用上述载体库，则可简便且迅速地制备兼顾功能域的高功能和对于DNA序列的高识别特异性的多肽表达用载体。

[0192] 作为DNA结合域的来源，可列举：植物病原菌黄单胞菌属的TALE(Transcription Activator-Like Effector，转录活化因子样效应子)、锌指(Zinc finger)等。

[0193] 作为功能域，可列举：编码酶、转录调节因子、报道蛋白质等的结构域。作为酶，可列举：重组酶、核酸酶、连接酶、激酶、磷酸酶等DNA修饰酶；内酰胺酶等其他酶。在本说明书中，将编码核酸酶的结构域称为DNA切断域。作为转录调节因子，可列举活化因子、抑制因子等。作为报道蛋白，可列举：绿色萤光蛋白质(GFP)、人源化海肾绿色荧光蛋白(humanized Renilla reniformis green fluorescent protein，hrGFP)、增强绿色萤光蛋白质(eGFP)、增强蓝色萤光蛋白质(eBFP)、增强青色萤光蛋白质(enhanced cyan fluorescent protein，eCFP)、增强黄色萤光蛋白质(eYFP)、红色萤光蛋白质(RFP或DsRed)、mCherry等萤光蛋白质；萤火虫萤光素酶、海肾萤光素酶(Renilla luciferase)等生物发光蛋白质；碱性

磷酸酶、过氧化酶、氯霉素乙酰转移酶、β-半乳糖苷酶等将化学发光受质进行转化的酶等。DNA切断域优选为与其他DNA切断域接近而形成多聚体并取得得到提高的核酸酶活性的DNA切断域。作为这样的DNA切断域，可列举源自Fok1的DNA切断域等。

[0194] DNA结合域和功能域通过包含35～55个、优选40～50个、更优选45～49个、最优选47个氨基酸的多肽来连接。

[0195] DNA结合域可自N末端侧起连续地包含多个DNA结合模块。1个DNA结合模块特异性地识别1个碱基对。对于DNA结合域所含的DNA结合模块的数量，从兼顾功能域的高功能和DNA序列的高识别特异性的观点考虑，优选为8～40，更优选为12～25，进一步更优选为15～20。作为DNA结合模块，可列举例如TAL效应子重复序列(effector repeat)等。作为1个DNA结合模块的长度，可列举例如20～45、30～38、32～36、或34等。DNA结合域所含的DNA结合模块的长度优选就所有DNA结合模块而言均相同。

[0196] 自N末端起第4n－3个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合可就任意的n而言均相同。另外，自N末端起第4n－2个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合可就任意的n而言均相同。另外，自N末端起第4n－1个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合可就任意的n而言均相同。另外，自N末端起第4n个DNA结合模块中的第x个的氨基酸与第y个的氨基酸的组合可就任意的n而言均相同。此处，n可为1～10的自然数，优选为1～7的自然数，更优选1～5的自然数。n优选为足以示出DNA结合域所含的所有DNA结合模块的自然数。另外，x为1～40的自然数，优选为1～10的自然数，更优选为2～6的自然数，进一步更优选为3～5的自然数，最优选为自然数4。另外，y为1～40的自然数，优选为25～40的自然数，更优选为30～36的自然数，进一步优选为31～33的自然数，最优选为自然数32。x和y是不同的自然数。x和y的数值根据所使用的DNA结合模块的长度而可能不同。x优选为下述数值，该数值表示与包含34个氨基酸的DNA结合模块中的第4个氨基酸相当的位置。y优选为下述数值，该数值表示与包含34个氨基酸的DNA结合模块中的第32个氨基酸相当的位置。

[0197] 自N末端起第4n－3个DNA结合模块中的第x个氨基酸与第y个氨基酸的组合、自N末端起第4n－2个DNA结合模块中的第x个氨基酸与第y个氨基酸的组合、自N末端起第4n－1个DNA结合模块中的第x个氨基酸与第y个氨基酸的组合、以及自N末端起第4n个DNA结合模块中的第x个氨基酸与第y个氨基酸的组合可互不相同。此处，n为1～10的自然数，优选为1～7的自然数，更优选为1～5的自然数。n优选为足以示出DNA结合域所含的所有DNA结合模块的自然数。另外，x为1～40的自然数，优选为1～10的自然数，更优选为2～6的自然数，进一步优选为3～5的自然数，最优选为自然数4。另外，y为1～40的自然数，优选为25～40的自然数，更优选为30～36的自然数，进一步优选为31～33的自然数，最优选为自然数32。x和y是不同的自然数。优选地，对于自N末端起第4n－3个DNA结合模块中的第x个氨基酸与第y个氨基酸的组合、自N末端起第4n－2个DNA结合模块中的第x个氨基酸与第y个氨基酸的组合、以及自N末端起第4n个DNA结合模块中的第x个氨基酸与第y个氨基酸的组合，可分别按照x与y的顺序选自D与D的组合、E与A的组合、D与A的组合、以及A与D的组合。

[0198] 作为可使用的载体，可列举质粒载体、粘粒(cosmid)载体、病毒载体、人工染色体载体等。作为人工染色体载体，可列举酵母人工染色体载体(YAC)、细菌人工染色体载体(BAC)、P1人工染色体载体(PAC)、小鼠人工染色体载体(MAC)、人源人工染色体载体(HAC)。

另外，作为载体的成分，可列举：DNA、RNA等核酸；GNA、LNA、BNA、PNA、TNA等核酸类似物(analog)等。载体也可通过糖类等除核酸以外的成分进行修饰。

[0199] 通过将载体导入细胞等并使之表达，可制备上述多肽。另外，通过将载体导入细胞等并使之表达，可在细胞内发挥功能域所对应的所期望的功能，即，DNA重组、DNA切断等DNA修饰；转录调节等其他酶活性的表达；利用报道蛋白对DNA区域进行标记化和/或由MMEJ介导的抗原受体的导入等。在本发明的一个方面，可提供一种组合物，其用于在本发明的任意方法中使用且包含铂TALEN。

[0200] (4.TCR改变)

[0201] 在本发明中，可提供一种将编码抗原受体的核酸导入靶标生物的免疫细胞所含的核酸中的规定部位的方法。该方法可包括将包含编码抗原受体的核酸的载体和核酸酶导入该免疫细胞的工序。核酸酶切断该载体和该免疫细胞的基因组序列，载体能够以如下方式构成：在其被核酸酶切断时，会产生编码抗原受体的序列，该序列通过微同源介导的末端接合(MMEJ)被导入至免疫细胞的基因组序列的被核酸酶切断的部位。

[0202] 本说明书中记载的技术并无限定，例如可在如图6所示的免疫疗法工艺中使用。

[0203] 在一个方面，本发明提供一种对受试者实施免疫疗法的方法，其包括：(A)从受试者取得血液的工序；(B)将该血液的单核细胞(PMBC)的TRB敲除的工序；(C)将该单核细胞进行CD3阴性浓缩的工序；(D)将该单核细胞的TRA敲除并导入抗原受体(TCR或CAR-T)的工序；(E)将该单核细胞进行CD3阳性浓缩的工序；以及(G)根据需要进行该单核细胞的扩大培养的工序。

[0204] A)从受试者取得血液的工序具有以下特征。

[0205] 使用已经在成分献血或末梢血干细胞采集等中使用的Spectra Optia(注册商标)(TERUMO BCT公司)或COM.TEC(注册商标)(FRESENIUS KABI Japan)等医疗用途所认可的连续血球成分分离装置，采集1×10^{10}左右的末梢血单核细胞(PBMC)。为了尽可能地避免在采集时的低钙血症等不良事件的发病，而以60ml/分钟以下的采集速度来进行采集。

[0206] B)将该血液的单核细胞(PBMC)的第一个抗原受体基因座(例如TRB)敲除的工序具有以下特征。

[0207] 使用GMP等级的Dynabeads(注册商标)(Thermo Fisher公司)CD3/CD28，进行T细胞的活化、增殖后，在48～72小时以内的最佳时期内使用电穿孔法，将以TRB恒定区域作为靶标序列的核酸酶的载体导入增殖期的T细胞。更优选该过程如下进行，使用MACS GMP CD3 pure(注册商标)(Miltenyi Biotec公司)等GMP等级的CD3阳性细胞分离用珠粒，自PBMC纯化CD3阳性细胞级分。

[0208] C)将该单核细胞进行CD3阴性浓缩的工序具有以下特征。

[0209] 对于导入核酸酶而使TCRβ链的表达缺失的T细胞，由于同时使CD3的表达消失，因此使用MACS GMP CD3 pure(注册商标)(Miltenyi Biotec公司)等GMP等级的CD3阳性细胞分离用珠粒，进行CD3阴性细胞级分的纯化浓缩。

[0210] D)将该单核细胞的第二个抗原受体基因座(例如TRA)敲除并导入抗原受体(TCR或CAR-T)的工序具有以下特征。

[0211] 通过上述C)的工序，使TCRβ链的表达缺失的T细胞在IL-2存在下进行增殖，在距初次电穿孔大致48～72小时的最佳时机，通过第二次电穿孔将用于导入所期望的TCR的本发

明的环状DNA载体与TCRα链切断用的核酸酶的载体同时导入。

[0212] 需要说明的是,省略C)过程,利用电穿孔,将用于导入所期望的CAR的本发明的环状DNA载体与TCRα链切断用的核酸酶的载体同时导入,进行CD3阴性细胞级分的纯化,由此切断TCRα链,能够实现表达CAR的T细胞的浓缩。

[0213] E)将该单核细胞进行CD3阳性浓缩的工序具有以下特征。

[0214] 在导入有TCR的情况下,通过导入载体而恢复了TCR表达的T细胞由于一并恢复CD3的表达,因此使用MACS GMP CD3 pure(注册商标)(Miltenyi Biotec公司)等GMP等级的CD3阳性细胞分离用珠粒,再次进行CD3阳性细胞级分的纯化浓缩。

[0215] G)根据需要进行该单核细胞的扩大培养的工序具有以下特征。

[0216] 对通过上述E)的工序进行了纯化浓缩的表达所期望的TCR的T细胞(或者TCR缺失而表达CAR的T细胞)进行扩大培养时,以适当的浓度添加IL-2,并且为了将细胞浓度保持在大致1×10^6/ml而适当追加培养基,并根据需要更换为尺寸较大的细胞培养用袋。

[0217] 在一个优选的实施方式中,本发明的上述TRA和/或TRB的切断可使用铂TALEN来进行。

[0218] 进而,在特定的实施方式中,上述免疫疗法包括TCR-T疗法或CAR-T疗法。在本说明书中,“TCR-T疗法”是指利用对T细胞受体(TCR)进行改变的细胞疗法,例如可用于癌症治疗。在本说明书中,“CAR-T疗法”是指基因、细胞治疗法,其是将嵌合抗原受体(CAR)(例如,加入了用于克服肿瘤免疫逃逸机制的基因操作)基因导入患者T细胞,将该T细胞在体外进行扩增培养后对患者进行输注。

[0219] 本发明提供一种组合物,其用于在对受验者实施免疫疗法的方法中使用且包含铂TALEN,该方法包括如下工序:(A)从受试者取得血液的工序;(B)将该血液的单核细胞(PMBC)的TRB敲除的工序;(C)将该单核细胞进行CD3阴性浓缩的工序;(D)将该单核细胞的TRA敲除并导入抗原受体(TCR或CAR-T)的工序;(E)将该单核细胞进行CD3阳性浓缩的工序;以及(G)根据需要进行该单核细胞的扩大培养的工序。

[0220] (4-1.导入工序)

[0221] 在本发明中,导入载体的工序可使用电穿孔来进行。需要说明的是,在本发明中,核酸酶的导入也可通过导入编码核酸酶的核酸(载体)而与包含编码抗原受体的核酸的载体同时进行。

[0222] 电穿孔有时优选在流动腔室内进行。电穿孔有时因缓冲液处于高温而使细胞死亡,但通过在设置于流路中的腔室(流动腔室)内将缓冲液保持在低温,能够减少对细胞的损害,防止细胞随着过度加热而死亡。另外,在电穿孔后可使用细胞容易存活的缓冲液。电穿孔可通过MaxCyte Flow Electroporatin™、NEPA21(注册商标)、NEON(注册商标)、CliniMACS Electroporator(注册商标)等来进行。

[0223] 在本发明中,确认细胞的状态并在最佳时机进行导入是有利的。例如,可利用CD3/CD28珠粒刺激免疫细胞后,在约48小时～约72小时的期间内进行基于电穿孔进行的核酸酶和载体的导入。导入可在刺激后约48～约72小时的期间内的最佳时机进行。本领域技术人员在实施本工序时可确认最佳的时机。另外,有利的是:在导入工序之前,通过光学显微镜对随着细胞的活化·增殖而发生细胞的肿胀或团簇形成的情况进行确认,并且使用流式细胞仪来确认前向散射(forward scatter)、侧向散射(side scatter)的值均比处于静止期

的细胞增加。

[0224] 在本发明中,导入的PITCh载体的DNA量可设为约1～5μg左右。

[0225] (5.优选的实施方式)

[0226] 以下,对本发明的优选实施方式进行说明。以下提供的实施方式是为了更好地理解本发明而提供的,可理解为本发明的范围不应受到以下记载限定。因此,表明本领域技术人员可以参酌本说明书中的记载而在本发明的范围内进行适当改变。另外,可理解为本发明的以下的实施方式可以单独使用或将它们组合使用。

[0227] 另外,以下说明的实施方式均表示概括性或具体性的例子。以下的实施方式中所示的数值、形状、材料、构成要素、构成要素的配置位置及连接形态、工序(step)、工序的顺序等仅为一个示例,并非旨在限定权利要求的范围。另外,关于以下实施方式中的构成要素中未记载于表示最上位概念的独立权利要求中的构成要素,按照任意的构成要素来进行说明。

[0228] (5-1.试剂盒)

[0229] 在本发明中,可提供一种试剂盒,其是用于将编码抗原受体的核酸插入细胞所含的核酸中的规定部位的试剂盒,所述试剂盒包含本说明书中记载的载体、和用于使本说明书中记载的核酸酶表达的载体。

[0230] (5-2.方法)

[0231] 在本发明中,可提供一种方法,该方法在体外(in vitro)或在体内(in vivo)将编码抗原受体的核酸插入免疫细胞所含的核酸中的规定部位(在一个实施方式中是在非人生物中在体内进行插入的方法),所述方法包括将本说明书中记载的载体和用于使本说明书中记载的核酸酶表达的载体导入免疫细胞的工序。另外,可提供一种制造表达抗原受体的免疫细胞的方法,其包括通过上述方法将编码抗原受体的核酸插入上述免疫细胞所含的核酸中的规定部位的工序。

[0232] (5-3.免疫疗法)

[0233] 本发明的方法、试剂盒、或通过它们制作的细胞等能够在免疫疗法中使用。认为免疫疗法对于如下疾病有效,即,产生具有抗原性的病变的疾病(例如癌症);或对于特定抗原的异常免疫应答与发病或病情的发展相关的疾病。

[0234] 癌症免疫疗法是使用生物所具有的生物体防御机制来治疗癌症的方法。癌症免疫疗法大致分为:强化对于癌的免疫功能的癌症免疫疗法;以及抑制癌的免疫逃逸功能的癌症免疫疗法。进而,癌症免疫疗法包括在体内激活免疫功能的主动免疫疗法、以及在体外激活免疫功能或使已增殖的免疫细胞回到体内的被动免疫疗法。作为癌症免疫疗法的例子,可列举:非特异性免疫活化药、细胞激素疗法、癌疫苗疗法、树状细胞疗法、过继免疫疗法、非特异性淋巴细胞疗法、癌抗原特异性T细胞疗法、抗体疗法、免疫检查点抑制疗法等。认为通过本发明的方法制作的细胞对于过继细胞转移有效。

[0235] 通过本发明的方法制作的细胞可适当与其他癌症治疗组合,以并用疗法的形式来使用。代表性地,可与1种或多种其他药剂组合来施用。或者,并用疗法也可是与放射线治疗的组合。1种或多种其他药剂也可为任意的化学疗法药,或者也可包含免疫检查点抑制剂。或者,作为并用疗法中所使用的其他癌症治疗,可列举:其他癌症免疫疗法(例如免疫检查点抑制剂)、温热疗法、外科手术程序等,但并不限定于此。

[0236] 作为本发明中被视为对象的癌症，可列举：黑色素瘤(恶性黑色素瘤)、非小细胞肺癌、肾细胞癌、恶性淋巴瘤(霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤)、头颈部癌、泌尿科癌(膀胱癌、尿路上皮癌、前列腺癌)、小细胞肺癌、胸腺癌、胃癌、食道癌、胃食道交界部癌、肝癌(肝细胞癌、肝内胆管细胞癌)、原发性脑瘤(成胶质细胞瘤、中枢神经系统原发淋巴瘤)、恶性胸膜间皮瘤、妇科癌症(卵巢癌、宫颈癌、子宫体癌、)、软组织肉瘤、胆道癌、多发性骨髓瘤、乳癌、大肠癌等，但并不限定于此。

[0237] 本发明中所制作的免疫细胞可用于自体免疫疾病、过敏疾病、或移植时的移植物抗宿主病(GVHD)、排斥反应或移植失败的处置、治疗或预防。作为自体免疫疾病，可列举例如类风湿性关节炎(RA)、干燥综合征、全身性红斑狼疮(SLE)、抗磷脂综合征、多发性肌炎·皮肌炎、全身性硬化症、混合性结缔组织病、血管炎综合征、I型糖尿病、葛瑞夫兹氏病(Graves'disease)、桥本氏病(Hashimoto Disease)、特发性艾迪生病、自体免疫性肝炎、肺出血肾炎综合征(Goodpasture syndrome)、肾小球性肾炎、自体免疫性溶血性贫血(AIHA)、自体免疫性血小板减少紫斑病、自体免疫性嗜中性球减少症、重症肌无力症、天疱疮、白斑、特发性无精子症等，但并不限定于此。作为过敏疾病，可列举花粉症、过敏性鼻炎、支气管哮喘、特应性皮炎等，但并不限定此。此外，关于对特定抗原的异常免疫应答与发病或病情的发展相关的疾病，可使用利用本发明的抗原特异性控制性T细胞进行的处置或预防。

[0238] (5-4.细胞)

[0239] 在本发明的一个实施方式中，可提供一种细胞或其细胞集群，其包含通过本发明的方法或载体等进行了改变的目标的外源性抗原受体。在细胞集群中，包含除该目标的外源性抗原受体以外的抗原受体的细胞的比例被降低，且包含除目标的外源性抗原受体以外的抗原受体的细胞的比例例如为小于约20％、小于约15％、小于约12％、小于约10％、小于约7％、小于约5％、小于约3％、小于约2％或小于约1％，或者本发明的细胞集群实质上不含有包含除目标的外源性抗原受体以外的抗原受体的细胞。目标的外源性抗原受体可为针对所期望的抗原的T细胞受体或嵌合抗原受体。

[0240] 本发明的细胞集群包含如下细胞，该细胞在抗原受体的导入中降低或实质上没有突变向除内源性抗原受体基因座以外的部位的导入。在本发明的细胞集群中，向除内源性抗原受体基因座以外的部位导入突变的细胞的比例例如为小于约20％、小于约15％、小于约12％、小于约10％、小于约7％、小于约5％、小于约3％、小于约2％或小于约1％，或者本发明的细胞集群实质上不包含向除内源性抗原受体基因座以外的部位导入突变的细胞。

[0241] (一般技术)

[0242] 在本说明书中，所使用的分子生物学方法、生化学方法、微生物学方法是在该领域中公知且常用的方法。

[0243] (注释)

[0244] 在本说明书中，“或”在能够采用文章中所列举的事项的“至少1个以上”时使用。“或者”也同样。在本说明书中，在明确记载为“2个值”的“范围内”的情况下，该范围也包括2个值本身。

[0245] 在本说明书中所引用的科学文献、专利、专利申请等参考文献其全部内容作为参考以与各自具体记载的情况相同的程度援用于本说明书中。

[0246] 以上，为了便于理解而示出优选的实施方式来说明本发明。以下，基于实施例来说

明本发明，但是，上述的说明及以下的实施例仅以例示的目的来提供，并不以限定本发明的目的来提供。因此，本发明的范围并不限定于本说明书中具体记载的实施方式和实施例，而仅受到权利要求书的限定。

[0247] 实施例

[0248] 以下，记载实施例。以下的实施例中使用的对象的处理在需要时需遵守日本规定的与人基因组基因·解析研究相关的伦理准则、与以人为对象的医学系研究相关的伦理准则、广岛大学中所规定的基准，即使在没有明示的情况下，也需依据相关的法规来进行。

[0249] (实施例1-1：使用MaxCyte并利用TAL-PITCh法进行1G4 TCR向βnull Jurkat细胞中的导入)

[0250] (材料及方法)

[0251] 依据以下的操作规程，利用TAL-PITCh法进行1G4 TCR向βnull Jurkat细胞中的导入。

[0252] 1)利用电穿孔法导入以TRBC区域外显子1为靶标的铂TALEN mRNA后，进行CD3阴性级分的分选，制作不表达TCRβ链的βnull Jurkat细胞。

[0253] 2)对βnull Jurkat细胞进行计数。

[0254] 3)将βnull Jurkat细胞2×10^6cells/samples通过离心(400G，10分钟，室温)制成细胞颗粒。

[0255] 4)将上清液废弃，添加PBS，通过离心(400G，10分钟，室温)制成细胞颗粒。

[0256] 5)将上清液废弃，添加MaxCyte缓冲液，通过离心(400G，10分钟，室温)制成细胞颗粒。

[0257] 6)用TCRα2TALEN mRNA、1G4 TCR TAL-PITCh载体(序列号1，图7)制作下述表1的溶液，并使细胞颗粒悬浮。

[0258] 7)将细胞悬浮液移至比色管(SOC-25)，使用MaxCyte来实施电穿孔(程序：Jurkat)。

[0259] 8)将细胞悬浮液移至培养板，在CO_2培养箱内静置40分钟。

[0260] 9)添加培养基(RPMI1640+10％FBS+2mmol/l L-谷氨酰胺+1％青霉素/链霉素)，在培养箱(37℃，5％CO_2)中开始培养。

[0261] 10)在96小时后利用FACS进行解析。

[0262] [表1]

[0263] 【条件设定】

[0264]

样品 #	细胞类型	EP操作规程	DNA (ug/25ul)	α2TALEN (ug/25ul)	细胞 (Cells/25ul)	加工组装
1	β null Jurkat	No EP	0	0	1.00E+07	
2	β null Jurkat	Jurkat	0	0	1.00E+07	OC-25x3
3	β null Jurkat	Jurkat	0	10	1.00E+07	OC-25x3
4	β null Jurkat	Jurkat	5	10	1.00E+07	OC-25x3

[0265] 进而，继上述实验之后，按照以下的操作规程对表达的稳定性进行了试验。

[0266] 1)在上述实验中使用的Jurkat细胞(Control Jurkat cells)、β-null Jurkat细胞(β-null Jurkat cells)、上述实验中所制作的表达1G4的Jurkat细胞(αβ-null Jurkat cells)2×10^6cells中，加入Jurkat细胞培养用的培养基(RPMI1640+10％FBS+2mmol/l L-

谷氨酰胺+1%青霉素/链霉素)，在通常的CO_2培养箱(37℃，5%CO_2)中同时进行培养。

[0267] 2)在培养开始后第32天，使用流式细胞分析，对各细胞群中的CD3、TCRαβ、1G4-TCR的表达量进行分析。

[0268] (结果)

[0269] 结果如图1所示。表明：通过本发明的方法，不使用病毒载体便能将1G4-TCR(依赖于HLA-A*02地识别在恶性肿瘤中表达的NY-ESO-1抗原)导入人T细胞株。

[0270] 关于基因导入后的表达的稳定性，表明利用本法制作的表达1G4-TCR的αβ-null Jurkat细胞持续30天以上稳定地表达1G4-TCR(图2)。

[0271] (实施例1-2：TCR Vβ库解析)

[0272] (材料及方法)

[0273] 通过下述操作规程，对导入T细胞的除TCR以外的受体的表达进行了确认。

[0274] 1.准备在5ml管(tube)中加入有通过实施例1-1中所记载的方法导入有1G4 TCR的βnull Jurkat细胞和作为对照的Jurkat细胞1×10^6cell的试样各8个。

[0275] 2.第一次清洗：利用PBS定容至3ml，进行10分钟离心(400g，4℃)。将上清液去除。

[0276] 3.与2.同样地进行第二次清洗

[0277] 4.在各管中添加IOTest Beta Mark(Beckman Coulter)的流式细胞分析用抗体混合物A～H(参照下图：Beckman Coulter公司“IOTest(注册商标)Beta Mark”根据Manufacture's Instruction)各10μl并进行搅拌。

[0278] 5.在暗处、室温下静置20分钟。

[0279] 6.与2.同样地进行第一次清洗

[0280] 7.与2.同样地进行第二次清洗

[0281] 8.将0.5%BSA PBS缓冲液500μl加入各管中进行移液。

[0282] 9.通过FACS Canto II进行解析。

[0283] [表2]

[0284]

管	Volume / No. of tests (20 μL / test)	Vβ * (#) / 荧光染料		克隆 (Refs)	同型（物种）
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 (not published)	IgM（小鼠）
		Vb 7.2 (TRBV4-3)	FITC	ZIZOU4 (not published)	IgG2a（小鼠）

[0285] (结果)

[0286] 图3是表示添加有抗体混合物D时的、导入有1G4 TCR的βnull Jurkat细胞和Jurkat细胞(对照)的表达TCR的解析结果。根据图3可明确理解,利用本法所制作的表达1G4的Jurkat细胞使基因组编辑前所内含的Vβ8链的表达消失,表达出与1G4-TCR一致的Vβ13.1链。

[0287] 图4示出导入有1G4 TCR的βnull Jurkat细胞未表达除与1G4-TCR一致的Vβ13.1链以外的V链,即在基因组编辑后源自非重排等位基因的新Vβ链未表达。

[0288] (实施例1-3:通过Nested PCR进行的1G4 TCR盒(cassette)的集合(integration)的确认)

[0289] (材料及方法)

[0290] 通过下述操作规程,确认到导入的TCR盒被准确地组入靶标。

[0291] 1.将通过实施例1-1中记载的方法导入有1G4 TCR的βnull Jurkat细胞和作为对照的βnull Jurkat细胞1×10^6cell通过离心(400G,10分钟,室温)制成细胞颗粒。

[0292] 2.通过QIAamp DNA血液试剂盒(Qiagen)自各细胞中提取基因组DNA。

[0293] 3.如下述方式设计引物,使得利用巢式PCR对将1G4 TCR盒基因导入靶部位(TRCA基因的外显子1)时所形成的接点(junction)(1G4 TCR盒与TRCA的结合部位)进行扩增。

[0294] 用于扩增5'侧的包含接点的基因序列的第一次PCR用引物对

[0295] 5'-CTCTGCATGACTCACTAGCACTCTAT-3'(序列号24)

[0296] 5'-AGACCGACACCAACCTGAAC-3'(序列号25)

[0297] 以第一次PCR产物作为模板DNA的、用于扩增5'侧的包含接点的基因序列的第二次PCR用引物对

[0298] 5'-TGGCTAGGAAGGTGGATGAG-3'(序列号26)

[0299] 5'-ATCGTGCTGAGAATCCTGCT-3'(序列号27)

[0300] 用于扩增3'侧的包含接点的基因序列的第一次PCR用引物对

[0301] 5'-CACGGCGACTACTGCACTTA-3'(序列号28)

[0302] 5'-GACTGACTTAGTGAGCTGGGAAAGAT-3'(序列号29)

[0303] 以第一次PCR产物作为模板DNA的、用于扩增3'侧的包含接点的基因序列的第二次PCR用引物对

[0304] 5'-GGAGCCAGTACACGACATCA-3'(序列号30)

[0305] 5'-TTTGGCAGACAGGGAGAAAT-3'(序列号31)

[0306] 4.使用Kapa HiFi HotStart Ready Mix(KAPA Biosystems),通过巢式PCR对5′侧及3′侧的包含接点的基因序列进行扩增。PCR的条件设定如下所示。

[0307] [表3]

[0308]

初期变性	95℃	5 分钟	
变性	98℃	20 秒	30 个循环
退火	60℃	15 秒	
延伸	72℃	1 分钟	
最终延伸	72℃	5 分钟	

[0309] 5.通过电泳来确认PCR产物的条带(bands)

[0310] 6.通过序列来确认PCR产物的基因序列

[0311] (结果)

[0312] 结果如图5所示。图5示出了已将载体所含的1G4-TCR表达用序列准确地插入下述区域，该区域是利用本法的1G4表达Jurkat细胞的基因组上的与TRA基因C区域第一外显子一致的区域。脱靶引物(Out primer)1和在靶引物(In primer)1设定在内源性TRA基因C区域第一外显子的5′侧非翻译区域及1G4-TCR盒的TRA编码序列，被准确插入时的序列长度为1006bp。另一方面，在靶引物2与脱靶引物2设计在EF1a启动子区域及TRA基因C区域第一外显子下游侧的内含子内，被准确插入时的序列长度为742bp。根据图5表明所有引物的组合均仅扩增一条所预测长度的PCR产物。

[0313] (实施例2:使用人T细胞株对向所期望区域插入准确拷贝数的载体序列的确认)

[0314] 1)依据使用以往的逆转录病毒载体的公知方法(例如根据Morgan Science 2006;314:126-129,Zhao Y,J Immunol 2005;174:4415-4423,Robbins PF,CLin Cancer Res 2015;21:1019-27所记载的操作规程)制作1G4-TCR表达人Jurkat细胞，并进行克隆。

[0315] 2)使用本说明书中所记载的DNA载体来制作基因组编辑型1G4-TCR表达Jurkat细胞。

[0316] 3)使用Illumina公司Hi-Seq或具有同等性能的下一代测序仪，对1)工序中通过逆转录病毒所制作的1G4-TCR表达Jurkat细胞与2)工序中所制作的1G4-TCR表达Jurkat细胞的全基因组序列进行比较，比较插入部位及所插入的1G4序列的拷贝数。特别是对COSMIC等与致癌性相关的基因的数据库所含的插入部位的有无也进行了比较。

[0317] (实施例3:向人T细胞基因组的所期望区域插入准确拷贝数的载体序列的确认)

[0318] 1)依据使用以往的逆转录病毒载体的公知方法(例如根据Morgan Science 2006;314:126-129,Zhao Y,J Immunol 2005;174:4415-4423,Robbins PF,CLin Cancer Res 2015;21:1019-27所记载的操作规程)制作1G4-TCR表达人T细胞，并进行克隆。

[0319] 2)使用本说明书中所记载的DNA载体来制作1G4-TCR表达人T细胞，并进行克隆。

[0320] 3)使用Illumina公司Hi-Seq或具有同等性能的下一代测序仪，对1)工序中通过逆转录病毒所制作的1G4-TCR表达T细胞与2)工序中所制作的1G4-TCR表达T细胞的全基因组序列进行比较，比较插入部位及所插入的1G4序列的拷贝数。特别是对COSMIC等与致癌性相关的基因的数据库所含的插入部位的有无也进行了比较。

[0321] (实施例4:通过本法制作的基因组编辑型1G4表达T细胞与通过病毒载体制作的1G4表达T细胞的制造时间和细胞毒杀性的比较)

[0322] 1)依据使用以往的逆转录病毒载体的公知方法(例如根据Morgan Science 2006;314:126-129,Zhao Y,J Immunol 2005;174:4415-4423,Robbins PF,CLin Cancer Res 2015;21:1019-27所记载的操作规程)制作1G4-TCR表达人T细胞。

[0323] 2)使用本法来制作1G4-TCR表达人T细胞。

[0324] 3)对1)及2)工序中的从原料获取直至制作1G4-TCR表达人T细胞为止所需的时间(天数)进行比较。

[0325] 4)通过如WO/2019/073964所记载的细胞毒性检测(将效应子(1G4-TCR表达细胞)与靶细胞(表位肽添加细胞)以各种比进行混合，通过铬-51释放检测(Chromium-51 release assay)来评价细胞杀伤活性)，根据E:T比来比较1)和2)工序中所制作的2种1G4-

TCR表达细胞的细胞毒杀性。

[0326] (实施例5:利用MaxCyte公司的基因导入装置进行的流式电穿孔(Flow Electroporation))

[0327] 通过并非流式电穿孔的电穿孔进行与实施例1-1同样的步骤。与实施例1-1中进行导入的结果进行比较,确认到在实施例1-1中进行导入的情况下导入后的细胞的存活率更高,导入效率更高。

[0328] (实施例6:细胞的状态·电穿孔的时机)

[0329] 利用CD3/CD28珠粒刺激免疫细胞后,在经过各种时间后进行导入工序。除此以外,遵循实施例1-1的步骤。确认到在刺激后48～72小时的期间内进行导入时导入效率较高。

[0330] 在导入工序之前,利用光学显微镜确认是否发生细胞肿胀、团簇形成等,使用流式细胞仪来确认前向散射(forward scatter)、侧向散射(side scatter)的值与处于静止期的细胞相比是否增加。确认到:在向细胞(该细胞发生细胞肿胀或团簇形成且前向散射、侧向散射的值与处于静止期的细胞相比均增加)的导入中,导入效率较高。

[0331] (实施例7:在供体TCR盒序列上存在的向导RNA或TALEN靶标相同序列的密码子的同义置换)

[0332] 在未对在供体TCR盒序列上存在的向导RNA或TALEN靶表相同序列的密码子进行同义置换的情况下,进行与实施例1-1同样的步骤来进行导入。在未进行密码子的置换的情况下,预定导入的TCR序列本身被CRISPR或TALEN切断,因此认为无法获得供体TCR的表达。

[0333] (实施例8:启动子序列)

[0334] 利用并非EF-1α启动子的启动子进行与实施例1-1同样的步骤来进行导入。确认到:在实施例1-1中进行导入的情况下,与使用EF-1α启动子的实施例1-1中的结果相比,导入后的细胞中的抗原受体的表达量更多且更稳定地表达。

[0335] (实施例9:前导序列)

[0336] 利用不包含爪蟾球蛋白前导序列(Xenopus globin leader)的载体进行与实施例1-1同样的步骤来进行导入。确认到:在实施例1-1中进行导入的情况下,与使用爪蟾球蛋白前导序列的实施例1-1中的结果相比,导入后的细胞中的抗原受体的表达量更多且更稳定地表达。

[0337] (实施例10:向通用pITCh载体中组入T细胞受体对基因的实验)

[0338] (巨细胞病毒(CMV)特异性T细胞受体对)

[0339] (试剂·设备)

[0340] 1.pITCh-EF1α-α2载体

[0341] 2.Xba I(Takara Bio公司)

[0342] 3.MinEluteReaction Cleanup kit(Qiagen公司)

[0343] 4.NanoDrop2000(Thermo Fisher Scientific公司)

[0344] 5.NEBuilderHiFi DNA Assembly Master Mix(New England Biolabs公司)

[0345] 6.CompetentQuick DH5α(东洋纺公司)

[0346] 7.LB培养基(Sigma-Aldrich公司)

[0347] 8.LB琼脂培养基(Sigma-Aldrich公司)

[0348] 9.氨苄西林(Sigma-Aldrich公司)

[0349] 10.QIAGENPlasmid Midi kit(Qiagen公司)

[0350] (实验方法)

[0351] 1.靶标基因的人工DNA的设计·合成

[0352] 在将TCR(T细胞受体)α/β基因对组入通用pITCh载体的EF1α启动子的下游的情况下,依据以下的条件进行插入DNA的设计。

[0353] ·TCRβ基因与TCRα基因通过GSGP2A序列来连接。

[0354] ·TCRβ基因的终止密码子删除。

[0355] ·在TCRβ基因的近前组入Kozak序列。

[0356] ·在插入DNA的前后附加15-25bp的重叠序列。

[0357] 所设计的插入DNA通过PCR或人工DNA合成等方法来制备。另外,现在的通常的人工DNA合成是1kbp左右,因此插入DNA也可分多次来合成(图8)。

[0358] 2.插入DNA向通用pITCh载体中的组入·质粒DNA的制备

[0359] (1)通用pITCh载体的直链化

[0360] 利用XbaI对通用pITCh载体进行处理。由此,通用pITCh载体在具有Xba I位点的克隆位点被切断而使其直链化。经Xba I直链化的通用pITCh载体利用MinEluteReaction Cleanup kit进行纯化,使用NanoDrop等DNA浓度测定设备进行DNA定量。

[0361] (2)插入DNA向载体中的组入

[0362] 经直链化的通用pITCh载体和插入DNA使用NEBuilderHiFi DNA Assembly Master Mix来连在一起。制备以下的反应液,在50℃保温30分钟。

[0363]

经直链化的通用 pITCh 载体	50fmole
插入 DNA	100fmole （载体的 2 倍量）
NEBuilderHiFi DNA Assembly Master Mix	10 μL
H_2O	以使总量为 20μL 的方式进行添加
总量	20μL

[0364] (3)组入有插入DNA的通用pITCh载体的大量制备

[0365] 组入有插入DNA的通用pITCh载体转化为DH5α感受态细胞(competent cell)。转化成的感受态细胞接种至包含氨苄西林的LB琼脂培养基培养板。采集在培养板中出现的大肠杆菌的单克隆,用包含氨苄西林的LB培养基振荡培养16小时并进行集菌。使用QIAGENPlasmid Midi Kit等质粒纯化试剂盒,自所收集的大肠杆菌纯化质粒DNA。调查所制备的质粒的全长DNA序列,确认目标TCRα/β对基因被组入至通用pITCh载体。

[0366] 5'载体重叠序列

[0367] 5'-TAAACGCTCAACTTTGGT-3'(序列号32)

[0368] Kozak序列

[0369] 5'-GCCACC-3'

[0370] CMV特异性TCRβ序列

[0371] 5'-ATG～终止密码子删除-3'

[0372] 5’ ATGGGCACCAGGCTCCTCTGTCGTGTGGCCTTTTGTTTCCTGGCTGTAGGCCTCGTAGATGTGAAA
GTAACCCAGAGCTCGAGATATCTAGTCAAAAGGACGGGAGAGAAAGTTTTTCTGGAATGTGTCCAGGAT
ATGGACCATGAAAATATGTTCTGGTATCGACAAGACCCAGGTCTGGGGCTACGGCGGATCTATTTCTCA
TATGATGTTAAAATGAAAGAAAAAGGAGATATTCCTGAGGGGTACAGTGTCTCTAGAGAGAAGAAGGAG
CGCTTCTCCCTGATTCTGGAGTCCGCCAGCACCAACCAGACATCTATGTACCTCTGTGCCAGCAGTTTC
CAGGGGTTCACTGAAGCTTTCTTTGGACAAGGCACCAGACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTG
TTCCCACCCGANGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGANATCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTG
GTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAACGGCAAGGAGGTG
CACAGCGGCGTGTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAGGAGCAGCCCGCCCTGAACGACAGCAGATACTGC
CTGAGCAGCAGACTGAGAGTGAGCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCAGAAACCACTTCAGATGCCAGGTG
CAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTG
AGCGCCGAGGCCTGGGGCAGAGCCGACTGCGGCTTCACCAGCGTGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGC
GCCACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGAGCGCCCTGGTG
CTGATGGCCATGGTGAAGAGAAAGGACTTCGGAAGCGGA-3’ （序列号33）

[0373] GSGP2A序列

[0374] 5’-GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGAC
CT-3’(序列号34)

[0375] CMV特异性TCRα序列

[0376] 5’-ATG～终止密码子-3’

5’ ATGGCCTCTGCACCCATCTCGATGCTNGCGATGCTCTTCACATTGAGTGGGCTGAGAGCTCAGTCA

GTGGCTCAGCCGGAAGATCAGGTCAACGTTGCTGAAGGGAATCCTCTGACTGTGAAATGCACCTATTCA

GTCTCTGGAAACCCTTATCTTTTTTGGTATGTTCAATACCCCAACCGAGGCCTCCAGTTCCTTCTGAAA

TACATCACAGGGGATAACCTGGTTAAAGGCAGCTATGGCTTTGAAGCTGAATTTAACAAGAGCCAAACC

TCCTTCCACCTGAAGAAACCATCTGCCCTTGTGAGCGACTCCGCTTTGTACTTCTGTGCTGACTATTAT

GGTCAGAATTTTGTCTTTGGTCCCGGAACCAGATTGTCCGTGCTGCCCTATATCCAGAACCCTGACCCT

[0377] GCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGACTTCGACAGC

CAGACCAACGTGAGCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGACAAGTGCGTGCTGGACATGAGA

AGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGAGCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCC

TTCAACAACAGCATCATCCCCGAGGACACCTTCTTCCCCAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTG

GTGGAGAAGAGCTTCGAGACCGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTGCTGGTGATCGTGCTGAGAATC

CTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGAGACTGTGGAGCAGCTGA-3’

（序列号35）

[0378] 3’载体重叠序列

[0379] 5’-GCAACTAGAAGGCACAGT-3’(序列号36)

[0380] (实施例11:嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor:CAR)基因向通用pITCh载体中组入的实验)

[0381] (人CD19特异性嵌合抗原受体)

[0382] (试剂·设备)

[0383] 1.pITCh-EF1α-α2载体

[0384] 2.Xba I(Takara Bio公司)

[0385] 3.MinEluteReaction Cleanup Kit(Qiagen公司)

[0386] 4.NanoDrop2000(Thermo Fisher Scientific公司)

[0387] 5.NEBuilderHiFi DNA Assembly Master Mix(New England Biolabs公司)

[0388] 6.CompetentQuick DH5α(东洋纺公司)

[0389] 7.LB培养基(Sigma-Aldrich公司)

[0390] 8.LB琼脂培养基(Sigma-Aldrich公司)

[0391] 9.氨苄西林(Sigma-Aldrich公司)

[0392] 10.QIAGENPlasmid Midi Kit(Qiagen公司)

[0393] (实验方法)

[0394] 1.靶标基因的人工DNA的设计·合成

[0395] 在将嵌合抗原受体(CAR)组入通用pITCh载体的EF1α启动子的下游的情况下,依据以下的条件进行插入DNA的设计。

[0396] ·在CAR基因的近前组入Kozak序列。

[0397] ·在插入DNA的前后向15-25bp的载体附加重叠序列。

[0398] 所设计的插入DNA通过PCR或人工DNA合成等方法来制备(图9)。

[0399] 2.插入DNA向通用pITCh载体中的组入·质粒DNA的制备

[0400] (1)通用pITCh载体的直链化

[0401] 利用XbaI对通用pITCh载体进行处理。由此,通用pITCh载体在具有Xba I位点的克隆位点被切断而使其直链化。经Xba I直链化的通用pITCh载体利用MinEluteReaction Cleanup kit进行纯化,使用NanoDrop等DNA浓度测定设备进行DNA定量。

[0402] (2)插入DNA向载体中的组入

[0403] 经直链化的通用pITCh载体和插入DNA使用NEBuilderHiFi DNA Assembly Master Mix来连在一起。制备以下的反应液,在50℃保温30分钟。

经直链化的通用 pITCh 载体	50fmole
插入 DNA	100fmole （载体的 2 倍量）

[0404]

NEBuilderHiFi DNA Assembly Master Mix	10 μL
H_2O	以使总量为 20μL 的方式进行添加
总量	20μL

[0405] (3)组入有插入DNA的通用pITCh载体的大量制备

[0406] 组入有插入DNA的通用pITCh载体转化为DH5α感受态细胞(competent cell)。转化成的感受态细胞接种至包含氨苄西林的LB琼脂培养基培养板。采集在培养板中出现的大肠杆菌的单克隆,在包含氨苄西林的LB培养基中振荡培养16小时并进行集菌。使用QIAGENPlasmid Midi Kit等质粒纯化试剂盒,自所收集的大肠杆菌纯化质粒DNA。调查所制备的质粒的全长DNA序列,确认目标嵌合抗原受体基因被组入至通用pITCh载体。

[0407] 5’载体重叠序列

[0408] 5’-TAAACGCTCAACTTTGGT-3’(序列号37)

[0409] Kozak序列

[0410] 5’-GCCACC-3’

[0411] 人CD19特异性嵌合抗原受体序列

5’-ATGACCCAGACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGTAGAGC

CAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGAT

CTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTA

CAGCCTGACAATCAGCAACCTGGAACAAGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCT

GCCTTACACCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGCTCTACAAGCGGCAGCGGCAAACCTGG

ATCTGGCGAGGGATCTACCAAGGGCGAAGTGAAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACTGGTGGCCCCATC

TCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTCAGCGGAGTGTCCCTGCCTGATTACGGCGTGTCCTGGATCAG

ACAGCCTCCTCGGAAAGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAACAG

CGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAGGTGTTCCTGAAGATGAACAG

CCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCAT

GGATTATTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTTTCTTCTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAAC

[0412] ACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAAGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGG

CGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTCTGGGTGCTGGTCGTTGTGGGCGGCGTGCT

GGCCTGCTACAGCCTGCTGGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAGGAGCAAGCGGAGCAGACT

GCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCCGGAGGCCTGGCCCCACCCGGAAGCACTACCAGCCCTA

CGCCCCTCCCAGGGATTTCGCCGCCTACCGGAGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAA

ACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGA

AGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGG

CCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACG

TGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACT

GCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGG

GCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGC

CCTGCCCCCTCGCTAA-3’ （序列号38）

[0413] 3’载体重叠序列

[0414] 5’-GCAACTAGAAGGCACAGT-3’(序列号39)

[0415] (实施例12:使用通用pITCh载体将嵌合抗原受体基因(CAR)导入至源自健康人的T细胞的实验)

[0416] (实验方法)

[0417] 1.CD3阳性细胞自健康人末梢血的分离

[0418] (试剂·设备)

[0419] 1.RPMI1640(Thermo Fisher Scientific公司)

[0420] 2.比重分离液Lymphoprep(AbbottDiagnostics Technologies AS公司)

[0421] 3.PBS(pH7.2)

[0422] 4.MACS缓冲液(Miltenyi Biotec公司)

[0423] 5.CD3微珠(Miltenyi Biotec公司)

[0424] 6.MACS柱(Miltenyi Biotec公司)

[0425] 7.MACS分离器(Miltenyi Biotec公司)

[0426] 8.血细胞计数器(Hemocytometer)

[0427] (1)在进行T细胞分离实验的当天,采集约50mL的健康人全血。将所采集的健康人全血利用等量的RPMI1640进行稀释,在37℃下进行保存。

[0428] (2)向50mL的离心管中添加15mL比重分离液Lymphoprep,使30mL的经稀释的全血叠层于比重分离液。该作业制作多个样品以用尽所有经稀释的全血。

[0429] (3)将添加有比重分离液和全血的离心管在常温下以800×g进行30分钟离心。

[0430] (4)使用巴斯德吸管(Pasteur pipette),将通过离心所形成的包含白细胞的中间层回收至15mL离心管中。

[0431] (5)向所回收的中间层中添加PBS(pH值7.2)直至总量达到14mL为止。使离心管轻轻地涡旋以使细胞悬浮。

[0432] (6)将细胞悬浮液在4℃下以250×g进行10分钟离心。

[0433] (7)确认通过离心而形成细胞颗粒。将上清液保留1mL将其余去除,将离心管轻轻地涡旋以使细胞悬浮。将所有样品回收至1根15mL离心管中,向所回收的中间层中添加PBS(pH值7.2)直至总量达到14mL为止。将离心管轻轻地涡旋以使细胞悬浮。

[0434] (8)将细胞悬浮液在4℃下以250×g进行10分钟离心。

[0435] (9)将上清液保留2mL将其余去除,将离心管轻轻地涡旋以使细胞悬浮。

[0436] (10)使用血细胞计数器对细胞数进行计数。

[0437] (11)将细胞悬浮液在4℃下以300×g离心10分钟。将上清液完全去除。

[0438] (12)对每1×10^7cells添加80μL MACS缓冲液。

[0439] (13)对每1×10^7cells添加20μL CD3微珠。

[0440] (14)充分搅拌细胞悬浮液,并在4-8℃下进行15分钟保温。

[0441] (15)对每1×10^7cells添加1-2mL MACS缓冲液。将细胞悬浮液平稳地搅拌并将细胞清洗。

[0442] (16)将细胞悬浮液在4℃下以300×g离心10分钟。将上清液完全去除。

[0443] (17)对每1×10^8cells添加500μL MACS缓冲液。将离心管轻轻地涡旋以使细胞悬浮。

[0444] (18)将MACS柱设置于MACS分离器。

[0445] (19)利用MACS缓冲液对MACS柱进行冲洗。

[0446] (20)将细胞悬浮液添加于柱中。

[0447] (21)将通过MACS柱的非标记细胞回收。接着,利用MACS缓冲液将柱清洗3次。

[0448] (22)将MACS柱自MACS分离器卸下,并设置于收集管中。

[0449] (23)将5mL的MACS缓冲液添加于MACS柱中,将柱塞设置于MACS柱。

[0450] (24)猛烈地按压柱塞,将柱所保持的细胞回收至15mL离心管中。所回收的CD3阳性

细胞继续用于通过CD3/CD28固相化珠粒进行的T细胞活化。

[0451] 2.通过CD3/CD28固相化珠粒进行的T细胞活化

[0452] (试剂·设备)

[0453] 1.CTL-培养基(有10%AB血清(Gibco)的X-VIVO 20(Lonza)、2mmol/l L-谷氨酰胺(Gibco)和1%青霉素/链霉素(Sigma))

[0454] 2.DynabeadsHuman T-Activator CD3/CD28(Thermo Fisher Scientific公司)

[0455] 3.磁性支架(Magnetic stand)

[0456] 4.人IL-2(R&D Systems)

[0457] (1)将加入有1×10^6个CD3阳性细胞的1mL的CTL-培养基分取至50mL离心管,预先加热至37℃。

[0458] (2)将所回收的CD3阳性细胞在4℃下以300×g离心10分钟。将上清液完全去除。细胞预先在冰上保存。

[0459] (3)将悬浮有1×10^6个CD3阳性细胞的25μL的Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28分取至1.5mL微管中。

[0460] (4)添加与所分取的珠粒等量或至少1mL的PBS,利用涡旋进行5秒悬浮。

[0461] (5)将微管设置在磁性支架,放置1分钟以上而将珠粒分离,去除上清液。

[0462] (6)向珠粒中添加与最初分取的珠粒等量的CTL-培养基以使珠粒悬浮。

[0463] (7)将悬浮的珠粒添加于预先加热至37℃的CTL-培养基中。

[0464] (8)将人IL-2添加于预先加热至37℃的CTL-培养基中使其为30U/mL。

[0465] (9)向预先在冰上保存的CD3阳性细胞中以成为1×10^6cells/mL的方式添加加入有珠粒及人IL-2的CTL-培养基。将细胞平稳地搅拌并使其悬浮。

[0466] (10)将所悬浮的CD3阳性细胞以成为1mL/well的方式接种至24孔培养板中。

[0467] (11)将所接种的细胞在37℃、5%CO_2的条件下培养72小时。

[0468] 2.TCRβ的敲除

[0469] (试剂·设备)

[0470] 1.血细胞计数器

[0471] 2.磁性支架

[0472] 3.Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific公司)

[0473] 4.TALENRNA(β3-TALEN-L·β3-TALEN-R)

[0474] 5.CTL-培养基

[0475] 6.人IL-2

[0476] 7.NEPA21电穿孔仪(Nepa Gene公司)

[0477] 8.比色皿电极(Cuvette electrode)(NepaGene社)

[0478] 9.比色皿电极用腔室(Nepa Gene公司)

[0479] 10.CD3微珠(Miltenyi Biotec公司)

[0480] 11.MACS柱(MiltenyiBiotec公司)

[0481] (1)使用磁性支架并使用血细胞计数器,自将CD3/CD28珠粒经72小时培养的CD3阳性细胞中对细胞数进行计数。

[0482] (2)将经CD3/CD28珠粒刺激并培养72小时的CD3阳性细胞移至1.5mL微管,设置在

磁性支架上。将细胞悬浮液放置1分钟以上，分离CD3/CD28珠粒。将上清液回收至新的15mL离心管中。

[0483] (3)将细胞悬浮液以300×g离心5分钟。去除上清液。

[0484] (4)添加1mL/tube的Opti-MEM，使管轻轻地涡旋以清洗细胞。

[0485] (5)将细胞悬浮液以300×g离心5分钟。去除上清液。

[0486] (6)添加少量的Opti-MEM以使细胞悬浮，使用血细胞计数器对细胞数进行计数。

[0487] (7)将Opti-MEM以成为1×10^6cells/90μL的方式进行添加。

[0488] (8)将β3-TALEN-L和β3-TALEN-R的TALEN-RNA分别以各10μg/tube分注至1.5mL微管。

[0489] (9)将所悬浮的细胞添加于90μL/tube的Opti-MEM，并平稳地进行搅拌。

[0490] (10)将细胞·RNA悬浮液各100μL添加于比色皿电极。

[0491] (11)测定各比色皿电极的电阻值。以电阻值落在0.043-0.047的范围内的方式进行调整。在电阻值较低的情况下，将细胞·RNA悬浮液自2-3μL比色皿电极去除。在电阻值较高的情况下，将Opti-MEM添加于2-3μL比色皿电极。

[0492] (12)将包含30U/mL人IL-2的CTL-培养基以各1mL/well分注于24孔培养板的样品数量相应量的孔中。分注有培养基的培养板预先在CO_2培养箱(incubator)内加热。

[0493] (13)轻轻地拍击比色皿电极以搅拌悬浮液。将比色皿电极设置于比色皿电极用腔室。

[0494] (14)将NEPA21电穿孔仪的参数以如下方式设定。

[0495] 穿孔脉冲(PoringPulse)：275V(2.5msec-50msec)×2、50％

[0496] 传送脉冲(TransferPulse)：20V(50msec-50msec)×5、40％

[0497] (15)测定比色皿电极的电阻值，按下Start按钮以进行电穿孔法。

[0498] (16)使用比色皿电极所附带的玻璃吸管(pipette)，将经过电穿孔的细胞悬浮液添加于经预先加热的24孔培养板的培养基。

[0499] (17)将接种的细胞在37℃、5％CO_2的条件下进行72小时培养。

[0500] (18)使用CD3微珠和MACS柱，自经72小时培养的细胞中分离CD3阴性细胞。

[0501] (19)将分离的CD3阴性细胞接种于包含30U/mL人IL-2的CTL-培养基。

[0502] (20)将所接种的细胞在37℃、5％CO_2的条件下培养48小时。

[0503] 3.TCRα的敲除和通过TALEN-PITCh法进行CAR的导入

[0504] (试剂·设备)

[0505] 1.CTL-培养基

[0506] 2.DynabeadsHuman T-Activator CD3/CD28(Thermo Fisher Scientific公司)

[0507] 3.人IL-2

[0508] 4.血细胞计数器

[0509] 5.磁性支架

[0510] 6.Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific公司)

[0511] 7.TALENRNA(α2-TALEN-L·α2-TALEN-R)

[0512] 8.NEPA21电穿孔仪(Nepa Gene公司)

[0513] 9.比色皿电极(NepaGene社)

[0514] 10.比色皿电极用腔室(Nepa Gene公司)

[0515] (1)将经48小时培养的CD3阴性细胞移至包含CD3/CD28珠粒·30U/mL人IL-2的CTL-培养基。将所接种的细胞在37℃、5%CO_2的条件下培养72小时。

[0516] (2)通过电穿孔,将α2-TALEN-L和α2-TALEN-R的TALEN-RNA各10μg/tube以及5ug/tube的pITCh-EF1α-α2-FMC63导入经72小时培养的CD3阴性细胞。方法与"2.TCRβ的敲除"同样。

[0517] (3)将经过电穿孔的细胞接种至包含30U/mL人IL-2的CTL-培养基。将所接种的细胞在37℃、5%CO_2的条件下培养72小时。

[0518] (4)通过FACSCant II进行FMC64-CAR阳性细胞的解析。

[0519] (实施例13:使用改变型载体将1G4向TRB缺失Jurkat细胞中的导入)

[0520] 准备TRAC切断用TALENmRNA 10μg和1G4导入用PITCh载体5μg,将它们导入β-null Jurkat细胞。培养该细胞,为了在72小时后确认1G4表达,而使用NY-ESO-1MHC四聚体来进行FACS解析。

[0521] 将其结果示于图10。在图10中,Conv表示以往型PITCh载体,pUC19表示改变型PITCh载体。如图10所示,可知:在使用以往型PITCh载体的情况和使用改变型PITCh载体的情况下,1G4的表达效率分别为3.1%、3.5%,在使用任意载体的情况下,均可导入1G4,其表达成功。

[0522] 另外,准备TALEN-RNA和改变型PITCh载体,通过电穿孔来导入至β-null Jurkat细胞。培养该细胞,为了在72小时后确认1G4表达,而使用NY-ESO-1MHC四聚体来进行FACS解析。将其结果示于图11。根据该图可知,可确认到改变型PITCh载体的导入,1G4的表达成功。

[0523] (实施例14:由健康人T细胞制作1G4-TCR-T)

[0524] 实验方法:

[0525] (试剂·设备)

[0526] 1.CD3(+)PBMC

[0527] 2.磁性支架

[0528] 3. 0.4w/v%台盼蓝(trypan blue)溶液

[0529] 4.Opti-MEM(Gibco,31985-070)

[0530] 5.NEPA21(NepaGene)

[0531] 6.比色皿电极用腔室(Nepa Gene,CU500)

[0532] 7.比色皿电极(Nepa Gene,EC-002S))

[0533] 8.TALEN RNA(α2-TALEN-L/R、β3-TALEN-L/R)

[0534] 9. 1G4 PITCh载体

[0535] 10. 1G4片段

[0536] 11.血细胞计数器

[0537] 12.增殖用培养基CTL-M(30units/mL human IL-2)

[0538] 13.IL-2(50,000IU/mL)

[0539] 14.CD3微珠(Miltenyi Biotec,#130-050-101)

[0540] 15.MACS柱

[0541] 16.MACS缓冲液(4℃)

[0542] (步骤)

[0543] 1.TRB的KO

[0544] (1-1)使用血细胞计数器,对经CD3/CD28珠粒刺激·经培养的CD3(+)PBMC进行计数(培养时间:72小时)

[0545] (1-2)将用于电穿孔法的培养细胞移至1.5mL管,设置于磁性支架,注入CD3/CD28珠粒,将上清液回收至新的15mL管。

[0546] (1-3)以300×g离心5分钟。

[0547] 使用自动移液器(PIPETMAN)尽可能地去除上清液。

[0548] (1-4)添加1mL/tube的Opti-MEM,轻轻地涡旋将细胞清洗。

[0549] 以300×g离心5分钟。

[0550] (1-5)使用自动移液器尽可能地去除上清液。

[0551] (1-6)添加电穿孔条件数×100μL的Opti-MEM,使用血细胞计数器进行细胞计数。

[0552] (1-7)以成为1×10^6cells/90μL的方式添加Opti-MEM来进行调整。

[0553] (1-8)将TALEN RNA 10μg/tube分注于1.5mL管。

[0554] (1-9)添加在90μL/tube的Opti-MEM中悬浮的细胞,并平稳地进行搅拌。

[0555] (1-10)对比色皿电极进行编号,各添加100μL/well的细胞/RNA悬浮液。

[0556] (1-11)测定各比色皿电极的电阻值。

[0557] (1-12)以全比色皿的电阻值成为0.045前后(0.043～0.047)的方式进行调整。

[0558] 在电阻值较低的情况下,自比色皿中去除溶液2～3μL。

[0559] 在电阻值较高的情况下,在比色皿中添加2～3μL的Opti-MEM。

[0560] (1-13)在开始电穿孔之前,向24孔培养板中条件数相应量的孔中分注1mL/well的CTL-M(30units/mL human IL-2),预先在CO_2培养箱内进行加热。

[0561] (1-14)轻轻拍击比色皿电极并进行搅拌,设置于比色皿电极用腔室。

[0562] (1-15)参数设定

[0563] 穿孔脉冲(Poring Pulse):275V(2.5msec-50msec)×2、50%

[0564] 传送脉冲(Transfer Pulse):20V(50msec-50msec)×5、40%

[0565] (1-16)测定电阻值,按下Start按钮来进行电穿孔。

[0566] (1-17)使用比色皿所附带的玻璃吸管,将经过电穿孔的细胞液添加于预先加热过的24孔培养板的培养基。

[0567] (1-18)以未进行电穿孔的细胞作为对照,添加于24孔培养板的培养基。

[0568] (1-19)在37℃、5%CO_2的条件下培养72小时。

[0569] (1-20)利用CD3微珠(Miltenyi Biotec,#130-050-101)分离CD3阴性成分。

[0570] (1-21)利用CTL-M(30units/mL human IL-2),在37℃、5%CO_2的条件下培养48小时。

[0571] 2.TRA的KO和通过TAL-PITCh法进行的1G4TCR的导入

[0572] (2-1)利用CD3/CD28珠粒进行刺激、培养(培养时间:72小时)。

[0573] (2-2)利用电穿孔,将α2-TALENRNA 10μg/tube、1G4 PITCh载体5μg/tube导入培养细胞。方法与1.同样。

[0574] (2-3)利用CTL-M(30units/mL human IL-2),在37℃、5%CO_2的条件下培养72小

时。

[0575] (2-4)利用FACSCanto II进行解析。

[0576] 3.扩大培养

[0577] (3-1)利用CD3/CD28珠粒进行刺激。

[0578] (3-2)利用CTL-M(30units/mL human IL-2),在37℃、5%CO_2的条件下培养9天

[0579] (3-3)利用CD3/CD28珠粒进行第二次刺激。

[0580] (3-4)利用CTL-M(30units/mL human IL-2),在37℃、5%CO_2的条件下培养9天

[0581] (3-5)利用FACSCanto II进行解析。

[0582] 将使用人T细胞时的1G4导入结果示于图12。通过第一次电穿孔将TRB敲除,通过第二次的电穿孔将TRA敲除且通过TAL-PITCh法导入1G4TCR。如图12所示,可知:即便在使用人T细胞的情况下,1G4的表达效率也为10.7%,确认到PITCh载体的导入,1G4的表达成功。

[0583] (注释)

[0584] 综上所述,使用本发明的优选实施方式来例示了本发明,但是可理解为本发明应当仅通过权利要求书来解释其范围。在本说明书中引用的专利、专利申请及其他文献可理解为与其内容本身具体记载于本说明书的情况同样地援引该内容作为针对本说明书的参考。本申请对在2019年11月14日向日本专利局申请的日本特愿2019-206448主张优先权,其内容如同其整体构成本申请的内容而同样作为参考援引于此。

[0585] 产业上的可利用性

[0586] 本发明涉及免疫细胞的生物工程学上的操作。特别是,涉及将所期望的抗原受体导入免疫细胞的技术。上述技术能够利用于应用生命科学、临床医学的领域。尤其是对于制作用于向人施用的改变细胞较为有用,认为能够应用于治疗自体免疫疾病或癌症。

[0587] 序列号1:PITCh_1G4载体的全长序列

[0588] 序列号2:PITCh_1G4改良型载体的全长序列

[0589] 序列号3:PITCh_NLV48改良型载体的全长序列

[0590] 序列号4、5:PITCh_1G4载体的骨架序列

[0591] 序列号6、7:PITCh_1G4改良型载体的骨架序列

[0592] 序列号8、9:PITCh_NLV48改良型载体的骨架序列

[0593] 序列号10～15:核酸酶识别序列

[0594] 序列号16～18:导入盒部分序列

[0595] 序列号19:polyA附加序列

[0596] 序列号20:P2A序列

[0597] 序列号21:爪蟾球蛋白5'-UTR序列

[0598] 序列号22:T7启动子序列

[0599] 序列号23:EF-1α启动子序列

[0600] 序列号24～31:实施例中使用的启动子序列

[0601] 序列号32:实施例10中使用的5'载体重叠序列

[0602] 序列号33:CMV特异性TCRβ序列

[0603] 序列号34:GSGP2A序列

[0604] 序列号35:CMV特异性TCRα序列

[0605] 序列号36:实施例10中使用的3’载体重叠序列

[0606] 序列号37:实施例11中使用的5’载体重叠序列

[0607] 序列号38:人CD19特异性嵌合抗原受体序列

[0608] 序列号39:实施例11中使用的3’载体重叠序列

序列表

<110> 国立大学法人广岛大学(Hiroshima University)

组库创世纪株式会社(Repertoire Genesis Incorporation)

<120> 使用环状DNA将抗原特异性受体基因导入T细胞基因组的方法

<130> EC010PCT

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6207

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PITCh_1G4载体

<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 gctgattttt 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 gccccccctga 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 gatcccccat 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 改变型载体
<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 tcaggccctt 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 cccccctgacg 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改变型载体

<220>
<221> misc_feature
<222> (1427)..(1427)
<223> n为a、c、g、t或u
<220>
<221> misc_feature
<222> (1991)..(1991)
<223> n为a、c、g、t或u
<220>
<221> misc_feature
<222> (2021)..(2021)
<223> n为a、c、g、t或u
<400> 3

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 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 cctcccccca 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 cgtttttcca 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载体骨架
<400> 4
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 tctgtct 477
<210> 5
<211> 2312
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> PITCh_1G4载体骨架
<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 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 ggcccttttcg tc 2312

<210> 6
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> PITCh_1G4改变型载体骨架
<400> 6
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 ctgtct 456

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

<220>

<223> PITCh_1G4改变型载体骨架

<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 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 tattataagc atttatcagg gttattgtct 2160

catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 2220
atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta 2280
taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tc 2312

<210> 8
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> PITCh_NLV48改变型载体骨架
<400> 8
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 ctgtct 456

<210> 9
<211> 2312
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> PITCh_NLV48改变型载体骨架
<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 ggcccttttcg tc 2312

<210> 10
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 左TALEN位点
<400> 10
gtctgcctat tcaccgattg aagattttga ttcaatgtgt cacaaagtaa ggattc 56

<210> 11
<211> 61
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 右TALEN位点

<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位点
<400> 12
gtctgcctat tcaccgattg aagattttga ttcaatgtgt cacaaagtaa gga 53
<210> 13
<211> 61
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 右TALEN位点
<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位点
<400> 14
gtctgcctat tcaccgattg aagattttga ttcaatgtgt cacaaagtaa gga 53
<210> 15
<211> 61
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 右TALEN位点
<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载体盒
<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
gggcggggcg atacacggcg gcgcgaggcc aggcaccaga gcaggccggc cagcttgaga 2580
ctacccccgt ccgattctcg gtggccgcgc tcgcaggccc cgcctcgccg aacatgtgcg 2640
ctgggacgca cgggccccgt 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 改变型载体盒
<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
aaaaccccctc 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 改变型载体盒
<220>
<221> misc_feature
<222> (918)..(918)
<223> n为a、c、g、t或u
<220>
<221> misc_feature
<222> (1482)..(1482)
<223> n为a、c、g、t或u
<220>
<221> misc_feature
<222> (1512)..(1512)
<223> n为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 ggcctttggg 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)信号
<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启动子
<400> 22
cctatagtga gtcgtatta 19
<210> 23
<211> 1182
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> EF-1a启动子

<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 tacccccgtc 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
ctcccccacc 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> 引物序列
<400> 24
ctctgcatga ctcactagca ctctat 26

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物序列
<400> 25
agaccgacac caacctgaac 20

<210> 26
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物序列
<400> 26
tggctaggaa ggtggatgag 20
<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物序列
<400> 27
atcgtgctga gaatcctgct 20
<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物序列
<400> 28
cacggcgact actgcactta 20
<210> 29
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物序列
<400> 29
gactgactta gtgagctggg aaagat 26
<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物序列
<400> 30
ggagccagta cacgacatca 20
<210> 31

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物序列
<400> 31
tttggcagac agggagaaat 20
<210> 32
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 5’载体重叠序列
<400> 32
taaacgctca actttggt 18
<210> 33
<211> 933
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CMV特异性TCRβ
<220>
<221> misc_feature
<222> (423)..(423)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (453)..(453)
<223> n为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特异性TCRβ
<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> n为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’载体重叠序列
<400> 36
gcaactagaa ggcacagt 18
<210> 37
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 5’载体重叠序列
<400> 37
taaacgctca actttggt 18
<210> 38
<211> 1530
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人CD19特异性嵌合抗原受体
<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’载体重叠序列
<400> 39
gcaactagaa ggcacagt 18

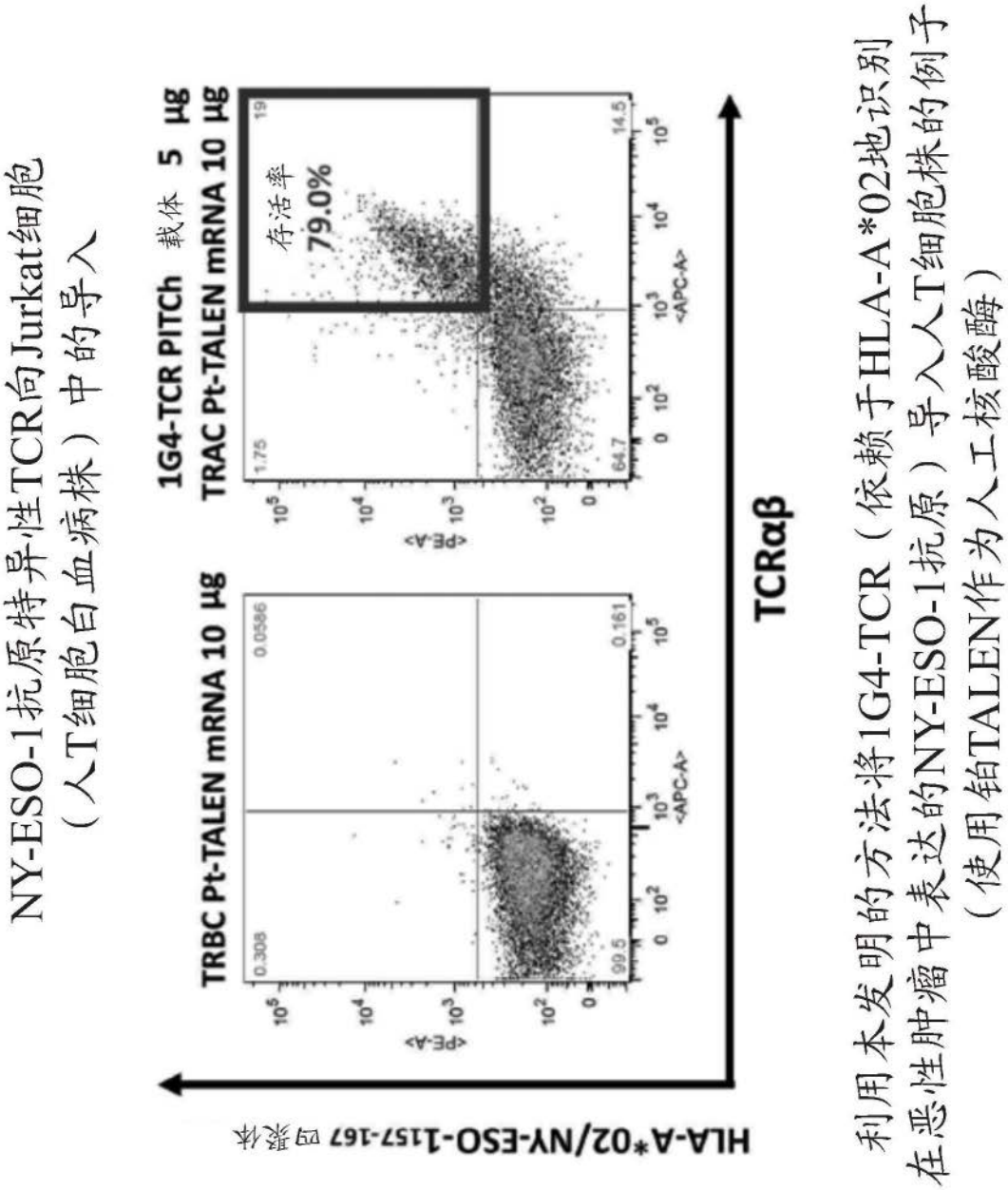

NY-ESO-1抗原特异性TCR向Jurkat细胞
（人T细胞白血病株）中的导入
利用本发明的方法将1G4-TCR（依赖于HLA-A*02地识别
在恶性肿瘤中表达的NY-ESO-1抗原）导入人T细胞株的例子
（使用铂TALEN作为人工核酸酶）
TRBC Pt-TALEN mRNA 10 μg
1G4-TCR PITCh 载体 5 μg
TRAC Pt-TALEN mRNA 10 μg
存活率
79.0%
HLA-A*02/NY-ESO-1157-167 四聚体
TCRαβ
<APC-A>
<PE-A>

图1

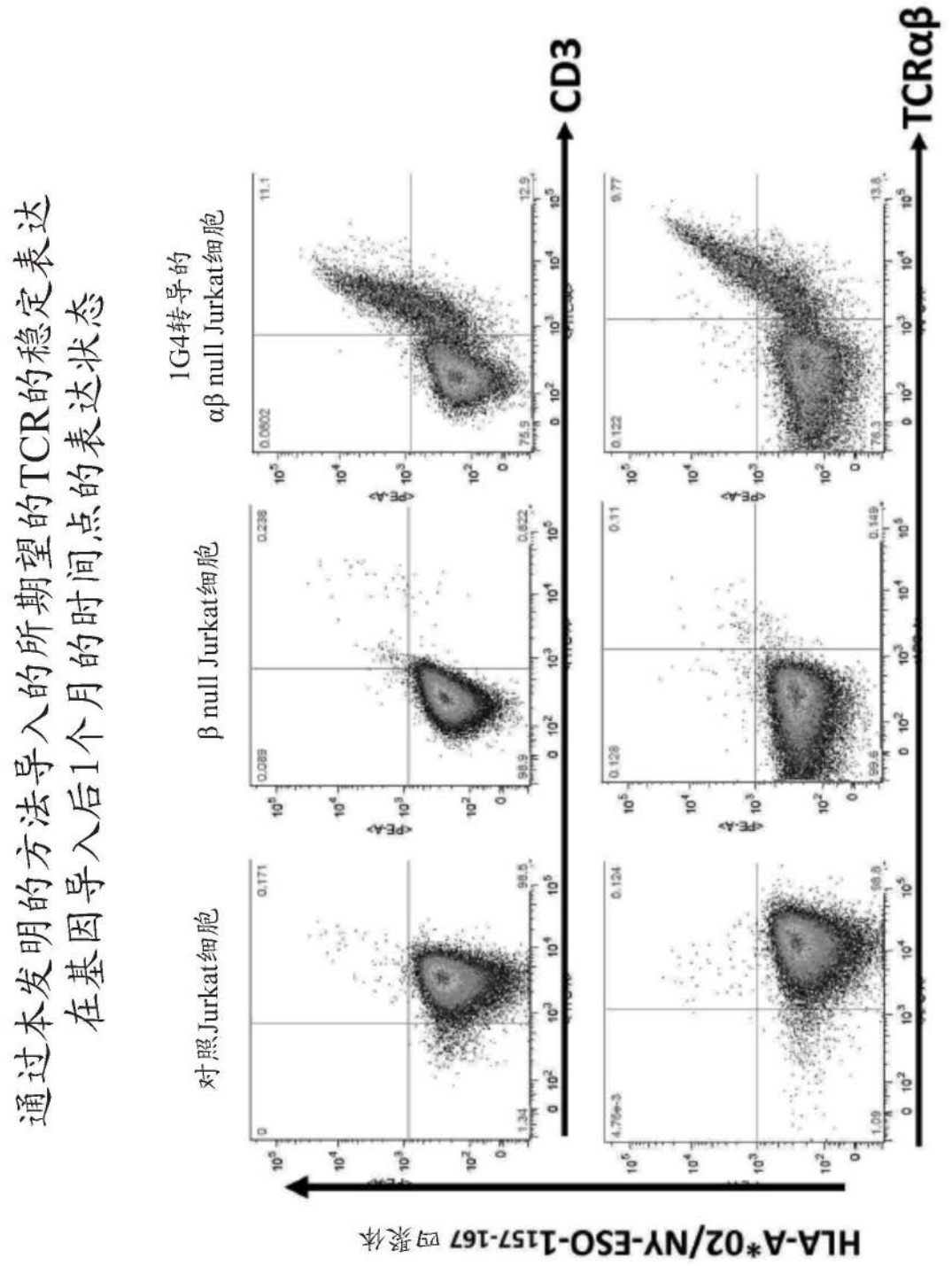

通过本发明的方法导入的所期望的TCR的稳定表达
在基因导入后1个月的时间点的表达状态
对照Jurkat细胞
β null Jurkat细胞
1G4转导的
αβ null Jurkat细胞
CD3
TCRαβ
HLA-A*02/NY-ESO-1157-167 四聚体

图2

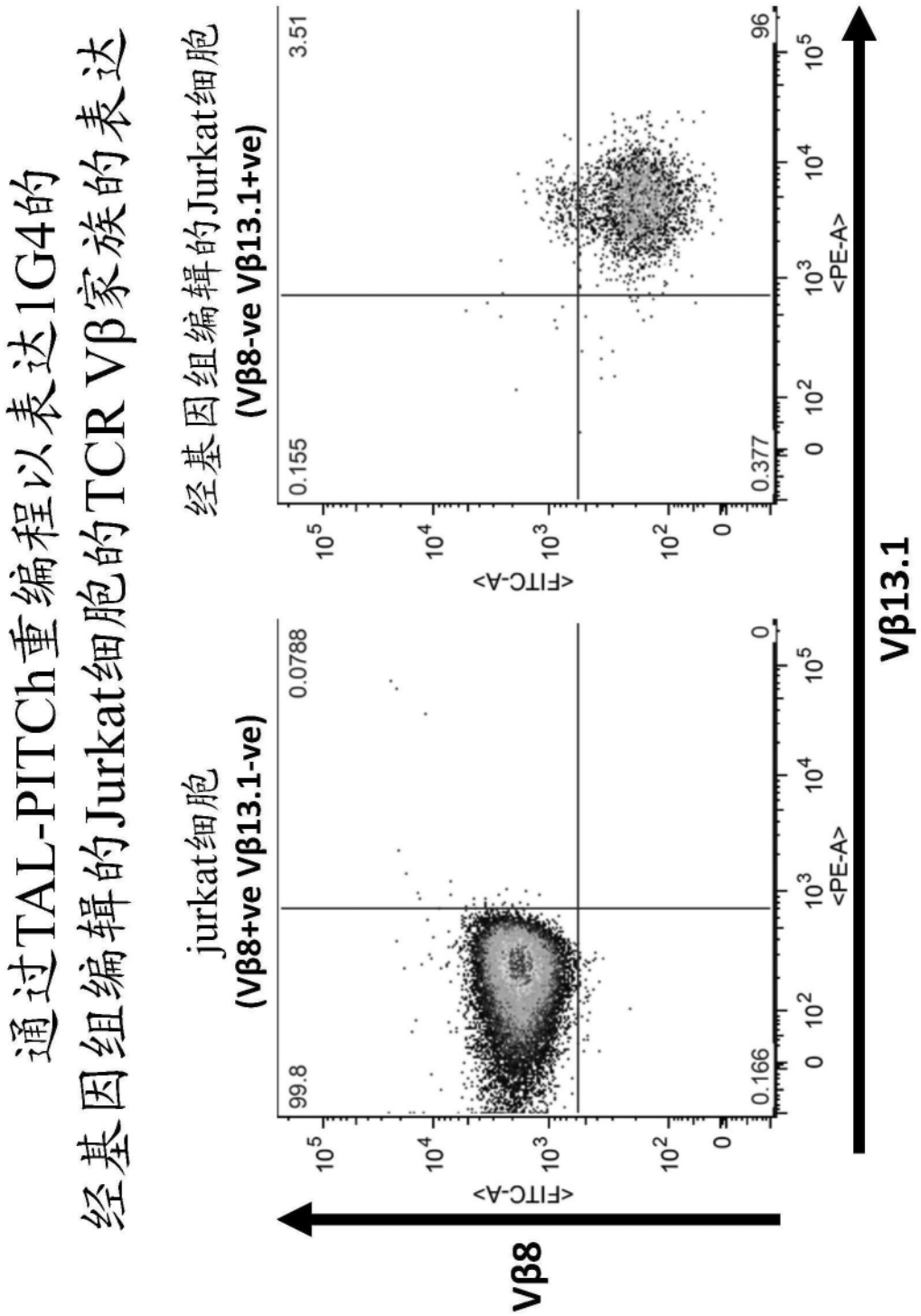

通过TAL-PITCh重编程以表达1G4的
经基因组编辑的Jurkat细胞的TCR Vβ家族的表达
Jurkat细胞
(Vβ8+ve Vβ13.1-ve)
经基因组编辑的Jurkat细胞
(Vβ8-ve Vβ13.1+ve)
99.8
0.0788
0.166
0
0.155
3.51
0.377
96
<FITC-A>
<PE-A>
Vβ8
Vβ13.1

图3

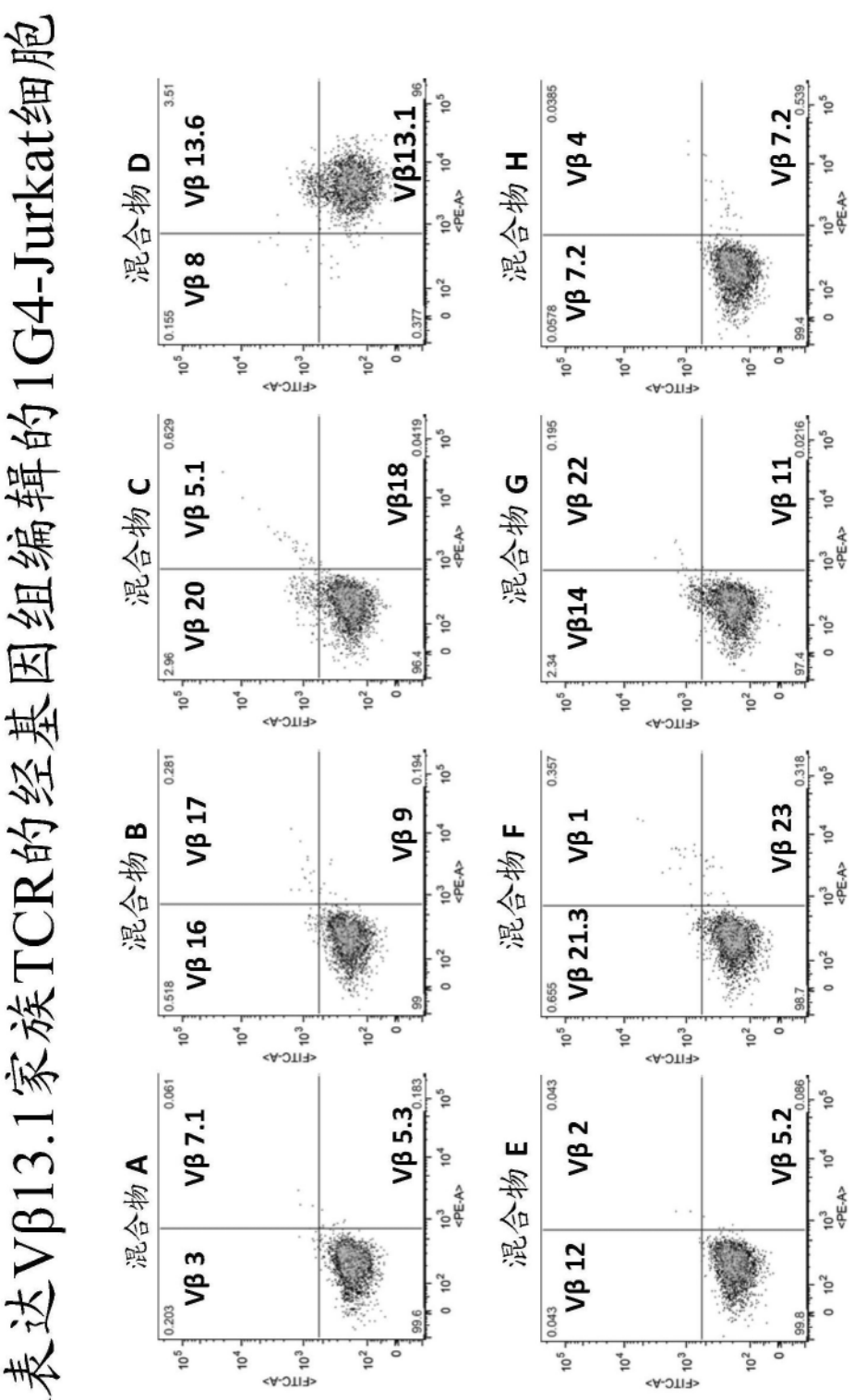

仅表达Vβ13.1家族TCR的经基因组编辑的1G4-Jurkat细胞
混合物 A
Vβ 3
Vβ 7.1
Vβ 5.3
混合物 B
Vβ 16
Vβ 17
Vβ 9
混合物 C
Vβ 20
Vβ 5.1
Vβ18
混合物 D
Vβ 8
Vβ 13.6
Vβ13.1
混合物 E
Vβ 12
Vβ 2
Vβ 5.2
混合物 F
Vβ 21.3
Vβ 1
Vβ 23
混合物 G
Vβ14
Vβ 22
Vβ 11
混合物 H
Vβ 7.2
Vβ 4
Vβ 7.2
<FITC-A>
<PE-A>

图4

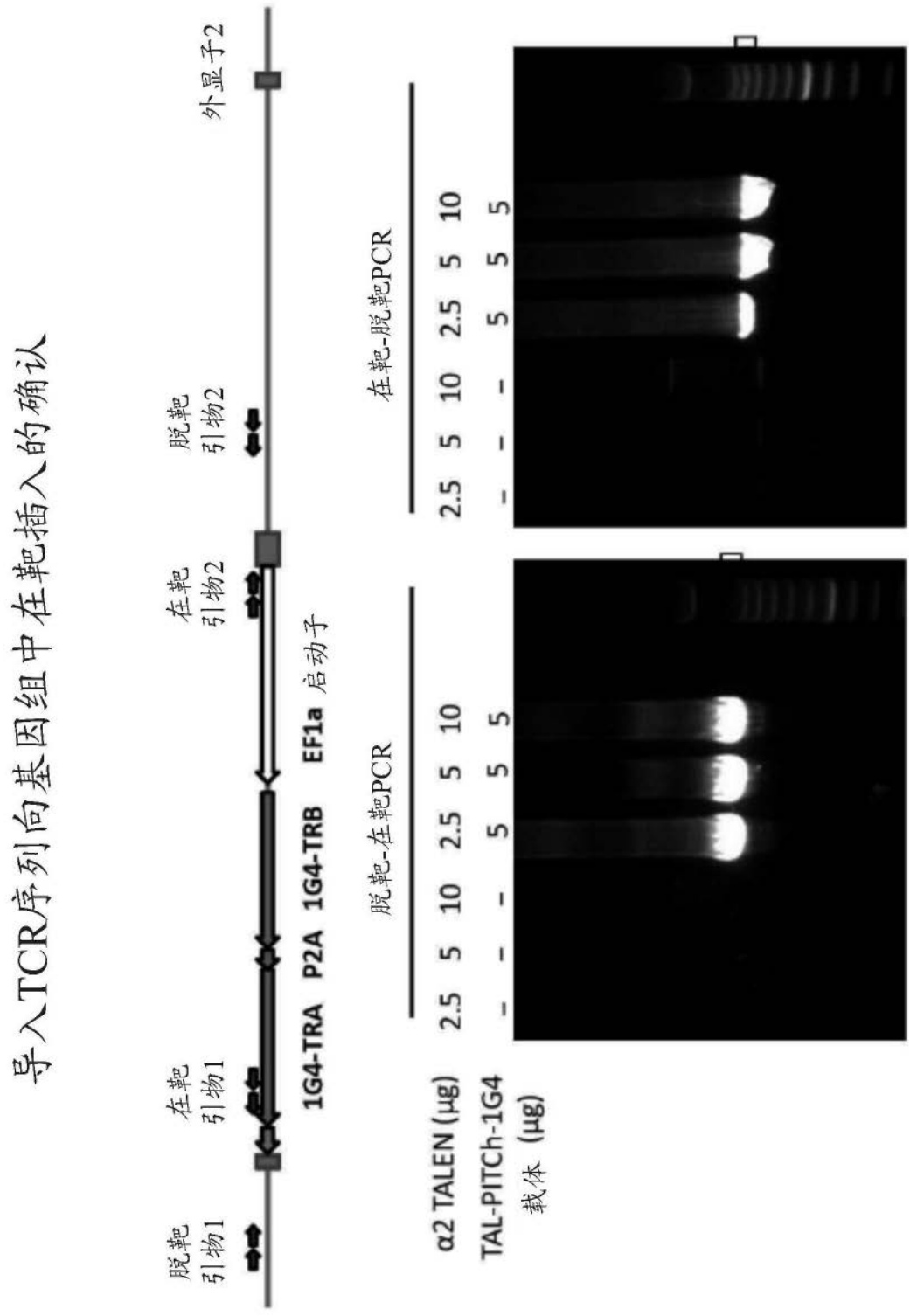

导入TCR序列向基因组中在靶插入的确认
脱靶 引物1
在靶 引物1
1G4-TRA
P2A
1G4-TRB
EF1a 启动子
在靶 引物2
脱靶 引物2
外显子2
脱靶-在靶PCR
在靶-脱靶PCR
α2 TALEN (μg)
TAL-PITCh-1G4 载体 (μg)
2.5 5 – – 10 2.5 5 5 10
– – 5 5 5 2.5 5 5 10

图5

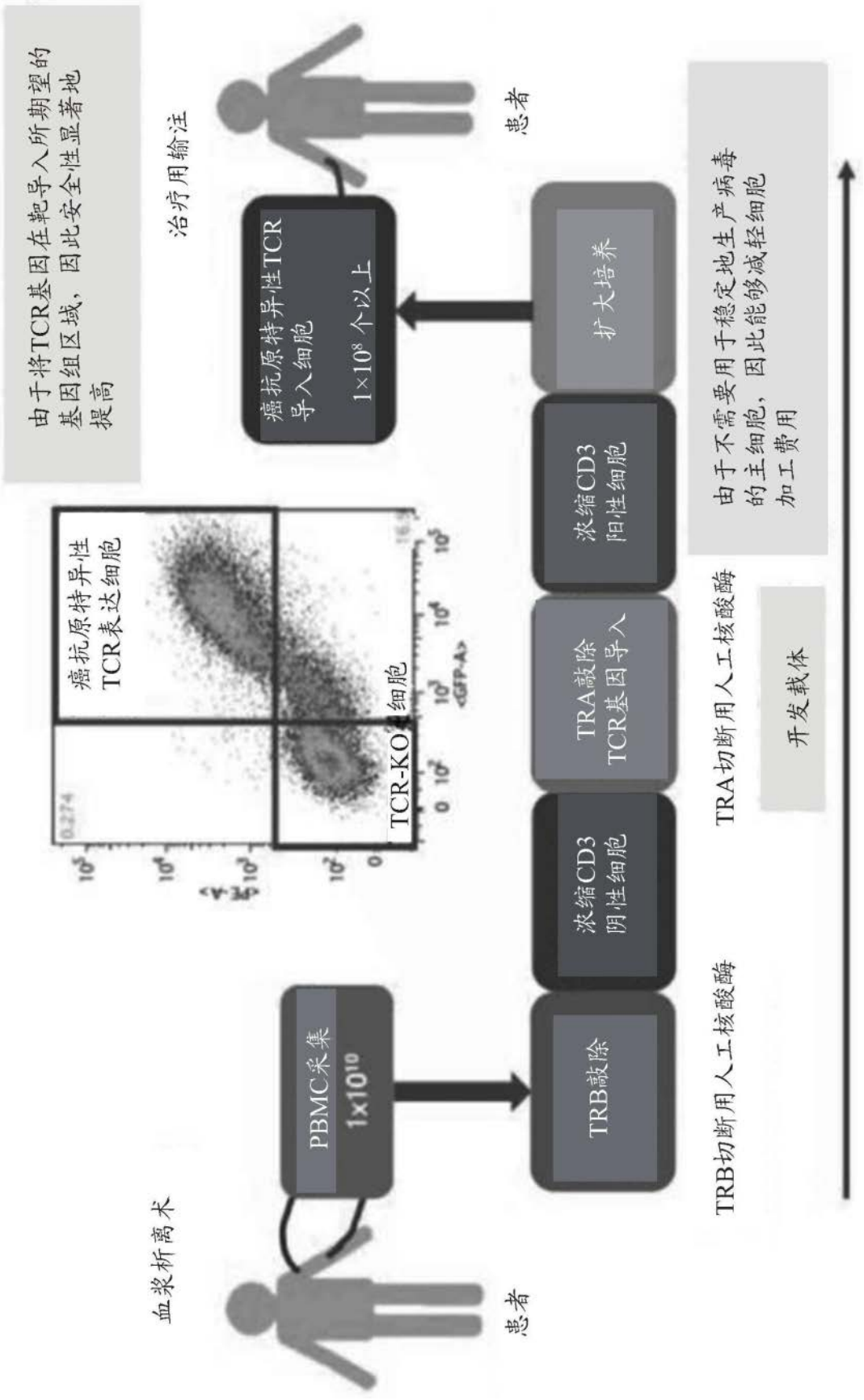

由于将TCR基因在靶导入所期望的基因组区域，因此安全性显著地提高
治疗用输注
癌抗原特异性TCR导入细胞
1×10⁸ 个以上
患者
癌抗原特异性TCR表达细胞
TCR-KO细胞
浓缩CD3阳性细胞
扩大培养
TRA敲除TCR基因导入
浓缩CD3阴性细胞
TRB敲除
PBMC采集
1x10¹⁰
血浆析离术
患者
TRB切断用人工核酸酶
TRA切断用人工核酸酶
开发载体
由于不需要用于稳定地生产病毒的主细胞，因此能够减轻细胞加工费用

图6

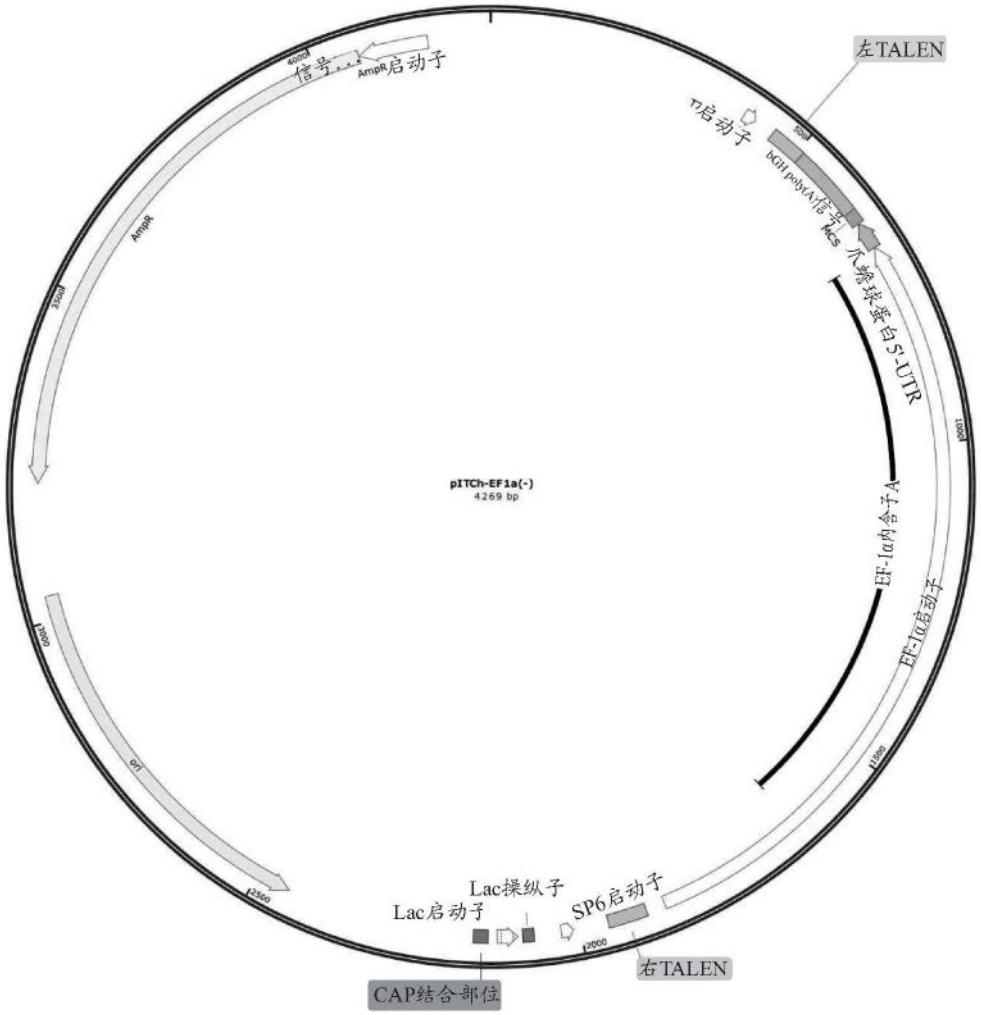


图7

将插入DNA合并为一条来设计的情况

5'载体重叠序列	Kozak序列	TCRβ基因(去除终止密码子)	GSG P2A序列	TCRα基因	3'载体重叠序列

将插入DNA分成两条来设计的情况

TCRβ插入序列：

5'载体重叠序列	Kozak序列	TCRβ基因(去除终止密码子)	3' GSG P2A序列(重叠)

TCRα插入序列：

5' GSG P2A序列(重叠)	TCRα基因	3'载体重叠序列

图8

嵌合抗原受体（CAR）基因的插入DNA设计例



图9

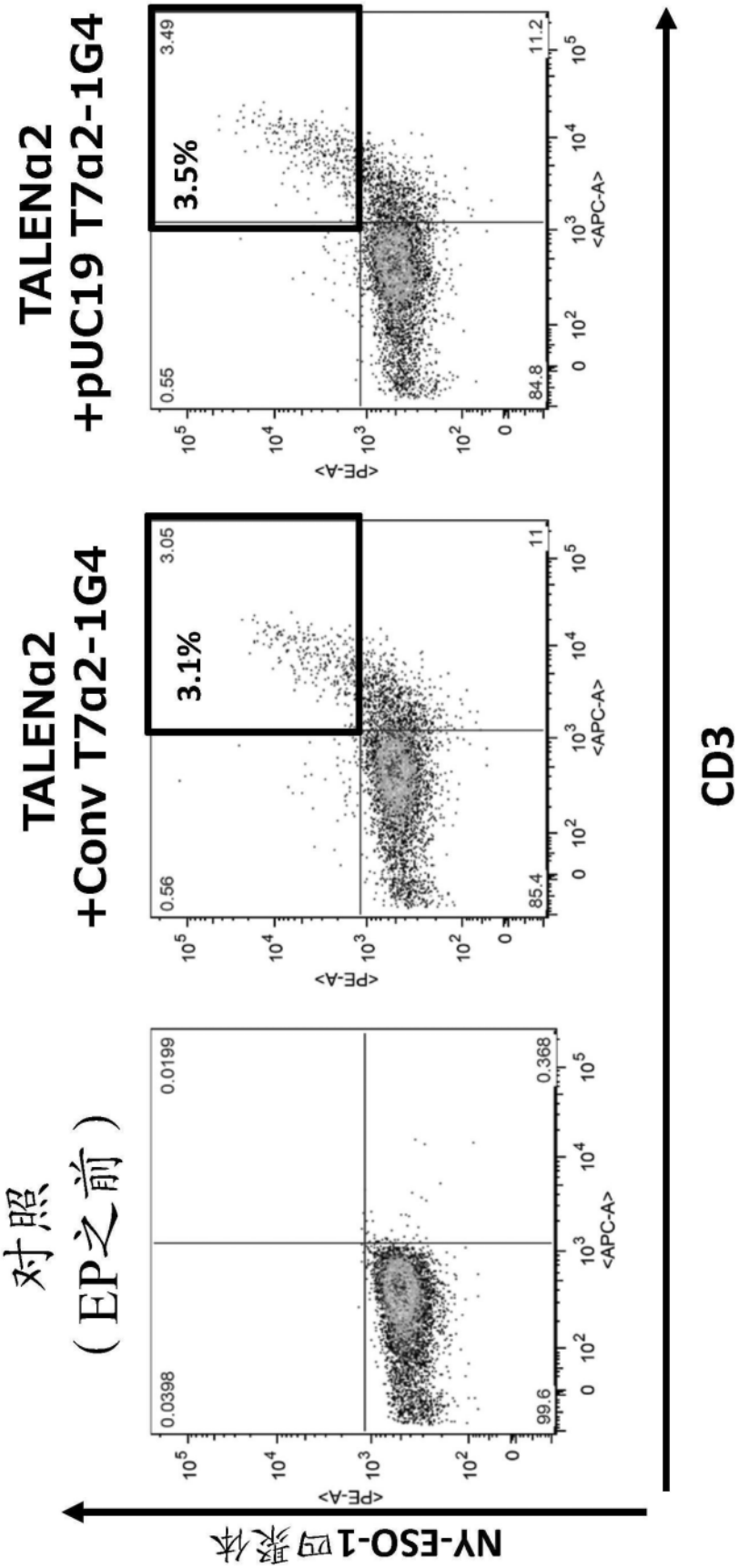

对照
（EP之前）
TALENa2
+Conv T7a2-1G4
TALENa2
+pUC19 T7a2-1G4
3.1%
3.5%
0.0398
0.0199
99.6
0.368
0.56
3.05
85.4
11
0.55
3.49
84.8
11.2
<APC-A>
<PE-A>
NY-ESO-1四聚体
CD3

图10

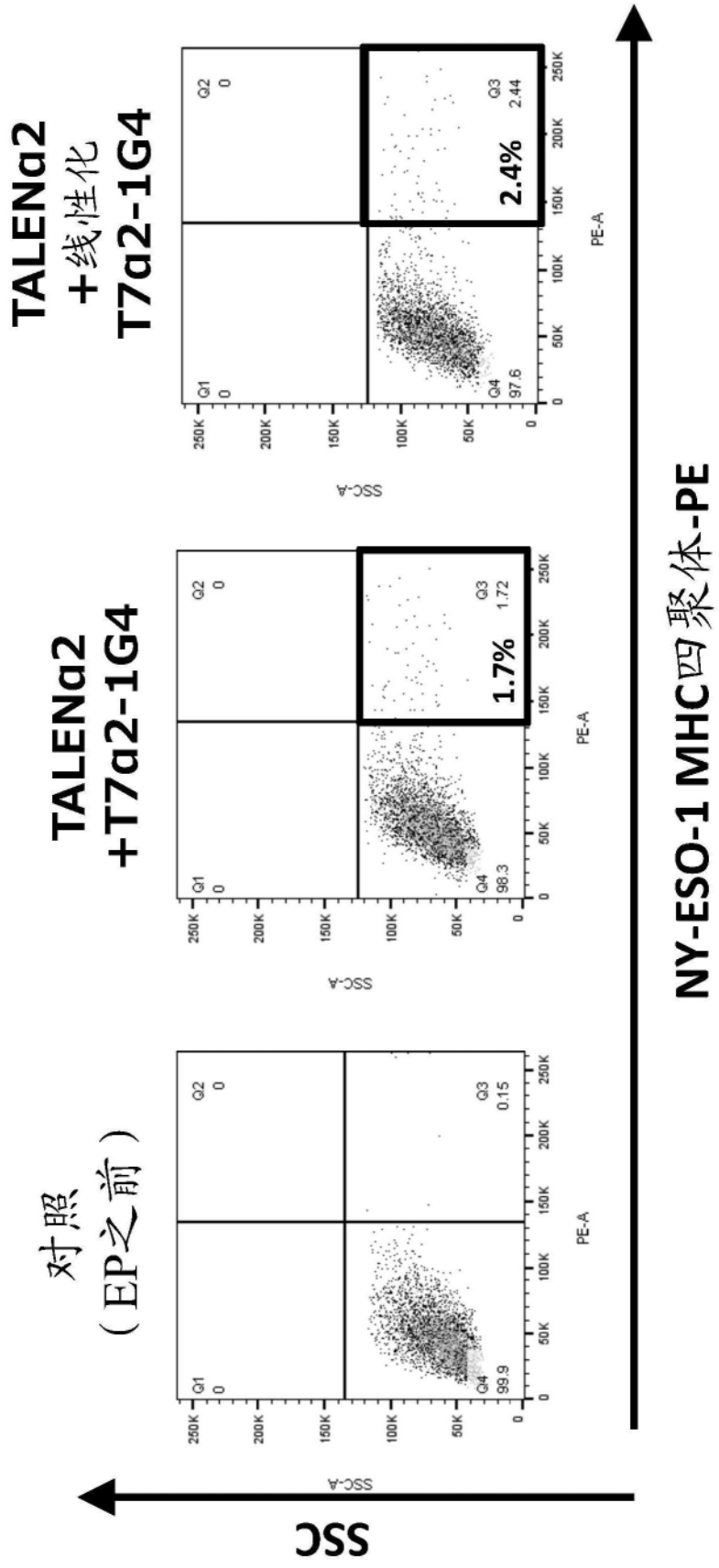

TALENa2
+线性化
T7a2-1G4
TALENa2
+T7a2-1G4
对照
（EP之前）
2.4%
1.7%
99.9
98.3
97.6
SSC-A
PE-A
NY-ESO-1 MHC四聚体-PE

图11

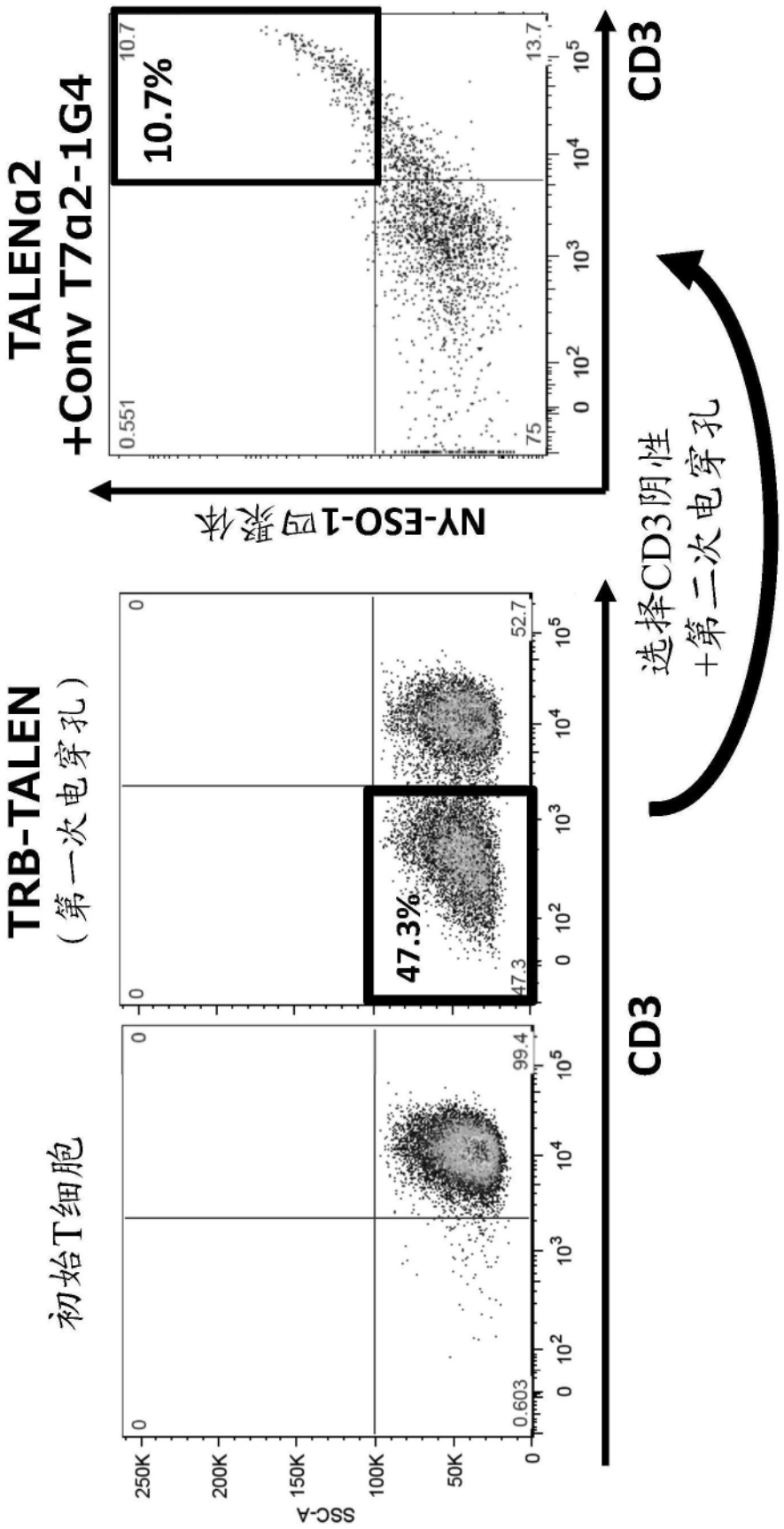

初始T细胞
TRB-TALEN
（第一次电穿孔）
47.3%
选择CD3阴性
+第二次电穿孔
TALENa2
+Conv T7a2-1G4
10.7%
NY-ESO-1四聚体
CD3
CD3
SSC-A
250K
200K
150K
100K
50K
0

图12