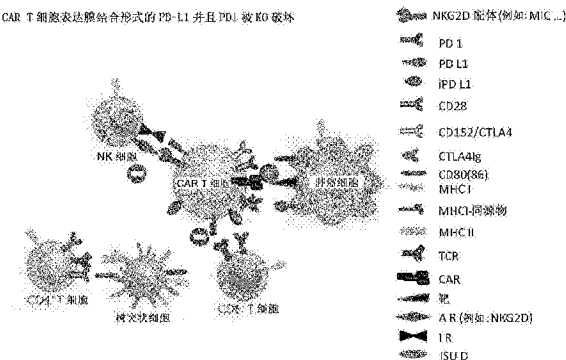




(43)申请公布日 2018.02.09

序列表79页 附图27页

CAR T 细胞表达膜结合形式的 PD-L1 并且 PD-L1 被 KO 破坏



1. 在宿主免疫细胞的存在下增加同种异体免疫细胞的持久性和/或移植成活率的方法,包括:

a) 提供同种异体细胞;

b) 通过使编码参与针对自体和非自体抗原识别的响应的多肽的至少一种内源基因失活来修饰所述细胞;

以及

c) 使所述宿主免疫细胞与至少一种非内源性免疫抑制多肽接触,所述非内源性免疫抑制多肽具有防止它们与同种异体免疫细胞相互作用的作用。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤b)中的所述多肽选自TCR、MHC类I类组分、b-2微球蛋白(B2M)、TAP1和大多功能蛋白酶2。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中步骤c)中的所述免疫抑制多肽以膜结合形式和/或以分泌形式存在。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中通过在所述免疫细胞中表达至少一种编码与所述免疫细胞的膜表面结合的一种非内源性免疫抑制多肽的非内源性多核苷酸来进行步骤c)。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中与所述免疫细胞的膜表面结合的所述一种非内源性免疫抑制多肽是PD-L1配体。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中编码待表达的膜结合形式的PD-L1配体的核酸分子与SEQ ID NO:18共有至少80%、优选90%、并且更优选95%的同一性。

7. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述免疫抑制多肽以分泌形式存在。

8. 根据权利要求1至3或权利要求7中任一项所述的方法,其中通过在所述免疫细胞中表达至少一种编码所述免疫细胞中的分泌形式下的一种非内源性免疫抑制多肽的非内源性多核苷酸来进行步骤c)。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中编码待表达的CTLA-4免疫球蛋白的核酸分子与SEQ ID NO:16-17共有至少80%、优选90%、并且更优选95%的同一性。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中通过使所述宿主免疫细胞与非内源性免疫抑制多肽PD-L1配体和CTLA-4免疫球蛋白两者接触来进行步骤c)。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中通过在所述免疫细胞中表达非内源性免疫抑制多肽PD-L1配体和CTLA-4免疫球蛋白两者来进行步骤c)来进行步骤c)。

12. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述分泌的至少一种非内源性免疫抑制多肽是分泌形式的PD-L1配体。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中编码在所述同种异体免疫细胞中待表达的膜结合形式的PD-L1配体和CTLA-4免疫球蛋白的核酸分子分别与SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:16-17共有至少80%、优选90%、并且更优选95%的同一性。

14. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述免疫细胞是原代细胞。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中步骤c)另外包括PD-1基因的表达的失活。

16. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中步骤c)通过在所述免疫细胞中表达至少一种编码膜结合形式的PD-L1配体的非内源性多核苷酸来进行,并且所述同种异体细

胞的进一步修饰通过PD-1基因的表达的失活来进行。

17. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法, 其中步骤c) 通过在所述免疫细胞中表达至少一种引导CTLA4 Ig的分泌的非内源性多核苷酸来进行, 并且所述同种异体细胞的进一步修饰通过PD-1基因的表达的失活来进行。

18. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法, 其中步骤c) 通过步骤c) 通过在所述免疫细胞中表达非内源性免疫抑制多肽PD-L1配体和CTLA-4免疫球蛋白两者来进行, 并且所述同种异体免疫细胞的进一步修饰通过PD-1基因的表达的失活来进行。

19. 根据权利要求15至18中任一项所述的方法, 其中通过使用编码SEQ ID N°11-12和13-14的TALE-核酸酶的多核苷酸来进行PD-1基因的失活。

20. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法, 其中步骤c) 中的所述多肽选自PD-L1、CTLA-4、病毒MHC同源物、NKG2D配体、病毒包膜免疫抑制结构域 (ISU) 或病毒FP蛋白。

21. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法, 其中步骤b) 通过B2M的失活来进行, 并且步骤c) 通过在所述同种异体免疫细胞中表达PD-L1配体来进行。

22. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法, 其中步骤b) 通过TCR的失活来进行, 并且步骤c) 通过由所述同种异体免疫细胞表达PD-L1配体来进行。

23. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法, 其中步骤b) 通过B2M的失活来进行, 并且步骤c) 通过由所述同种异体免疫细胞表达NKG2G配体来进行。

24. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法, 其中步骤b) 通过B2M的失活来进行, 并且步骤c) 通过由所述同种异体免疫细胞表达病毒MHC同源物UL18蛋白来进行。

25. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法, 其中步骤b) 通过TCR的失活来进行, 并且步骤c) 通过由所述同种异体免疫细胞表达病毒MHC同源物UL18蛋白来进行。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法, 其中步骤c) 通过在至少一种非内源性免疫抑制多肽中孵育所述免疫来进行。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述非内源性免疫抑制多肽是抗-CD80或抗-CD86mAb。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中步骤b) 中的基因失活通过使用TAL-核酸酶、大范围核酸酶、锌指核酸酶 (ZFN) 或RNA引导的核酸内切酶来进行。

29. 根据权利要求28所述的方法, 其中步骤b) 中的基因失活使用TAL-核酸酶来进行。

30. 根据权利要求2、22或25中任一项所述的方法, 其中步骤b) 中的基因失活通过使用抑制编码TCR的基因的表达的核酸分子来进行。

31. 根据权利要求30所述的方法, 其中通过使用SEQ ID N°52-53、55-56、62-63和65-66的TALE-核酸酶来进行TCR基因的失活。

32. 根据权利要求2或21-24中任一项所述的方法, 其中步骤b) 中的失活基因通过使用抑制编码B2M的基因的表达的核酸分子来进行。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中通过使用SEQ ID N°2-3、5-6和8-9的TALE-核酸酶来进行B2M基因的失活。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的方法, 进一步包括以下步骤:

d) 向所述T细胞中引入包含编码针对在恶性或感染细胞表面表达的至少一种抗原的嵌合抗原受体 (CAR) 的核苷酸序列的外源核酸分子。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述嵌合抗原受体包含与SEQ ID NO 67 (CD19抗原)、SEQ ID NO 68 (CD38抗原)、SEQ ID NO 69 (CD123抗原)、SEQ ID NO 70 (CS1抗原)、SEQ ID NO 71 (BCMA抗原)、SEQ ID NO 72 (FLT-3抗原)、SEQ ID NO 73 (CD33抗原)、SEQ ID NO 74 (CD70抗原)、SEQ ID NO 75 (EGFR-3v抗原) 和SEQ ID NO 76 (WT1抗原) 具有超过80%同一性、优选超过90%、并且更优选超过95%的作为抗原靶序列的scFv (VH和VL链)。40. 根据权利要求1至4470中任一项所述的方法, 进一步包括下述步骤:

e) 扩增得到的工程化的T细胞。

36. 一种工程化的、优选分离的T细胞, 通过使用根据权利要求1至35中任一项所述的方法可获得。

37. 根据权利要求36所述的工程化的T细胞, 用作药物。

38. 根据权利要求36或权利要求37所述的工程化的T细胞, 用于治疗癌症或病毒感染。

39. 根据权利要求36至38中任一项所述的工程化的T细胞, 其中所述T细胞源自待治疗的患者。

40. 根据权利要求36至39中任一项所述的工程化的T细胞, 其中所述T细胞源自供体。

41. 一种包含至少一种根据权利要求36至40中任一项所述的工程化的T细胞的组合物。

用于工程化同种异体T细胞以增加其在患者中的持久性和/或移植成活率的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于开发工程化非同种异体反应性T细胞进行免疫治疗的方法,且更具体地涉及用于增加同种异体免疫细胞的持久性和/或植入的方法。该方法至少包括通过使用优选特异性稀有切割核酸内切酶使涉及自体/非自体识别的基因失活的步骤,然后将所述工程化免疫细胞与至少一种非内源免疫抑制剂多肽(如PD-L1配体和/或CTLA-4 Ig)接触的步骤。本发明还涉及工程化免疫细胞及其功能衍生物、嵌合抗原受体(CAR)、多链CAR及其用于增强免疫治疗效率的用途。本发明通过降低移植物抗宿主病GvHD的风险开辟了更安全的策略并允许负担得起的过继性免疫治疗。

背景技术

[0002] 过继性免疫治疗涉及离体产生的自体抗原特异性T细胞的转移,是治疗病毒感染和癌症的有前景的策略。用于过继性免疫治疗的T细胞可通过扩增抗原特异性T细胞或通过基因工程重定向T细胞而产生(Park, Rosenberg et al. 2011)。病毒抗原特异性T细胞的转移是用于治疗移植相关病毒感染和罕见病毒相关恶性肿瘤的完善程序。类似地,已证实肿瘤特异性T细胞的分离和转移在治疗黑素瘤方面是成功的。

[0003] 已通过转基因T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)的遗传转移成功地产生了T细胞中的新特异性(Jena, Dotti et al. 2010)。CAR是由与单个融合分子中的一个或多个信号结构域关联的靶向部分组成的合成受体。通常,CAR的结合部分由单链抗体(scFv)的抗原结合结构域组成,其包含通过柔性接头(linker)连接的单克隆抗体的轻且可变片段。基于受体或配体结构域的结合部分也已成功应用。第一代CAR的信号结构域衍生自CD3 ζ 或Fc受体 γ 链的细胞质区域。已证实第一代CAR成功地重定向T细胞的细胞毒性,然而它们未能在体内提供延长的扩增和抗肿瘤活性。已单独(第二代)或组合(第三代)添加来自共刺激分子(包括CD28、OX-40 (CD134) 和4-1BB (CD137))的信号结构域来增强CAR修饰的T细胞的存活并增加其增殖。CAR已成功允许T细胞针对来自各种恶性肿瘤包括淋巴瘤和实体瘤在肿瘤细胞表面的表达的抗原进行重定向(Jena, Dotti et al. 2010)。

[0004] 目前使用过继性免疫治疗的患者治疗方案是基于自体细胞转移。在该方法中,从基因修饰或离体选择的患者中回收T淋巴细胞,在体外培养以根据需要增加细胞数,最后输注到患者内。除了淋巴细胞输注之外,宿主可以支持T细胞植入或它们参与免疫应答的其它方式进行操作,例如淋巴细胞生长因子(如IL-2)的预处理(用辐射或化疗)和施用。各个患者使用患者自体的淋巴细胞(即,自体治疗)接受个体制造的治疗。自体疗法在实际应用中面临重大的技术和后勤障碍,其产生需要昂贵的专用设备和专家人员,它们必须在患者诊断后的短时间内产生,并且在许多情况下,患者的预处理导致免疫功能降低,使得患者的淋巴细胞的功能可能不好并且数量非常少。由于这些障碍,每个患者的自体细胞制备实际上是一种新产品,其导致功效和安全性的显著变化。理想地,人们希望使用一种标准疗法,其中同种异体治疗细胞可被预先制备,详细表征,并且可用于立即给予患者。同种异体是指

细胞从属于同一物种的个体获得,但在遗传上不相似。然而,同种异体细胞的使用目前存在许多缺点。在免疫活性宿主中,同种异体细胞被快速排斥,一种称为宿主与移植排斥反应(HvG)的过程,并且这基本上限制了转移的细胞的功效。在免疫不足宿主中,同种异体细胞能够移植,但其内源性TCR特异性将宿主组织识别为异体的,导致移植物抗宿主病(GvHD),这可导致严重的组织损伤和死亡。为了有效地使用同种异体细胞,必须克服这两个问题。

[0005] 在免疫活性宿主中,同种异体细胞被宿主免疫系统迅速排斥。已证明,存在于未经辐照血液制品中的同种异体白细胞将持续不超过5至6天。(Boni, Muranski et al. 2008)。因此,为了防止同种异体细胞的排斥,宿主的免疫系统必须被有效地抑制。糖皮质激素广泛用于免疫抑制治疗(Coutinho and Chapman 2011)。这类类固醇激素与存在于T细胞的胞质液中的糖皮质激素受体(GR)结合,导致转运进入细胞核中,并结合调节参与免疫过程的许多基因表达的特定DNA基序。用糖皮质激素类固醇治疗T细胞导致细胞因子产生的水平降低,其导致T细胞无反应性并干扰T细胞激活。阿仑单抗也称为CAMPATH1-H,是靶向CD52(12个氨基酸的糖基磷脂酰肌醇(GPI)连接的糖蛋白)的人源化单克隆抗体(Waldmann and Hale 2005)。CD52在T和B淋巴细胞上以高水平表达,在单核细胞上以较低水平表达,而在粒细胞和骨髓前体上不存在。用针对CD52的人源化单克隆抗体的阿仑单抗进行治疗已被证实诱导循环淋巴细胞和单核细胞的快速消耗。它常用于治疗T细胞淋巴瘤,并且在某些情况下,作为用于移植的预处理方案的一部分。然而,在过继性免疫治疗的情况下,使用免疫抑制药物也将对引入的治疗性T细胞产生有害作用。因此,为了在这些条件下有效地使用过继性免疫治疗方法,引入的细胞将需要对免疫抑制治疗具有抗性。

[0006] 另一方面,T细胞受体(TCR)是响应于抗原呈递而参与T细胞激活的细胞表面受体。TCR通常由两条链 α 和 β 组成,其组合以形成异二聚体并与CD3转导亚单位关联以形成细胞表面上存在的T细胞受体复合物。TCR的每个 α 和 β 链由免疫球蛋白样N-末端可变(V)和恒定(C)区、疏水跨膜结构域和短胞质区组成。对于免疫球蛋白分子,通过V(D)J重组产生 α 和 β 链的可变区,从而在T细胞群内产生大量多样性的抗原特异性。然而,与识别完整抗原的免疫球蛋白相反,T细胞通过与MHC分子关联的加工肽片段而激活,向被称为MHC限制的T细胞的抗原识别引入额外维度。通过T细胞受体识别供体和受体之间的MHC差异导致T细胞增殖和GVHD的潜在发展。已证实TCR的正常表面表达取决于复合物的所有七个组分的协调合成和组装(Ashwell and Klusner 1990)。TCR α 或TCR β 的失活可导致从T细胞表面消除TCR,从而阻止同种异体抗原和GVHD的识别。然而,TCR破坏导致CD3信号转导成分的消除,并改变进一步的T细胞扩增的手段。

[0007] 适应性免疫应答是一种复杂的生物系统,其中许多细胞成分相互作用。专职性抗原提呈细胞(APC)能够在MHC II类分子的背景下处理异物并将它们暴露于辅助性T细胞。激活的辅助性T细胞进而刺激B细胞反应和细胞毒性T(CTL)细胞反应。CTL识别由MHC I类分子呈递的外源肽,但在同种异体反应性的情况下,识别并杀死携带外源MHC I类的细胞。MHC I类分子由2个实体组成:高度多态性、跨膜重链和小的不变多肽,由B2M基因编码的 β 2-微球蛋白(β 2-m)。MHC I类重链在细胞表面的表达需要它与 β 2-m缔合。因此,CAR T细胞中 β 2-m表达的废止会损害MHC I类表达,并使它们为宿主CTL不可见的。然而,MHC I类缺陷性CAR T细胞易受宿主NK细胞裂解影响,其靶向缺乏MHC I类分子的细胞[Ljunggren HG et al. (1990), Immunol Today. 11:237-244]。

[0008] NK细胞基于通过不同单态或多态受体接受的激活和抑制信号之间的平衡,向与其相互作用的细胞发挥细胞毒性作用。人NK细胞上的一个中枢激活受体是NKG2D,其配体包括蛋白质如MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3[Raulet DH, (2003), *Nature Reviews Immunology* 3(10):781-79]。另一方面,通过NK受体如LIR-1/ILT2和MHC I类分子之间的相互作用介导抑制信号[Ljunggren HG et al. (1990), *Immunol Today*.11:237-244]。一些病毒如巨细胞病毒具有获得性机制以避免NK细胞介导免疫监视。HCMV基因组编码能够预防MHC I类表面表达(即,US2、US3、US6和US11)的蛋白,同时表达作为诱饵以阻断NK介导的细胞裂解的MHC I类同源蛋白(UL18)[Kim,Y et al. (2008), *PLoS Pathogens*.4:e1000123,和Wilkinson G.et al. (2010). *J Clin Virol*.41(3):206-212]。此外,HCMV通过分泌能够结合NKG2D配体并防止它们的表面表达的蛋白质干扰NKG2D途径[Welte SA et al. (2003), *Eur J Immunol* 33(1):194-203]。在肿瘤细胞中,一些机制已演变为通过分泌NKG2D配体如ULBP2、MICB或MICA来逃避NKG2D反应(Waldhauer I,Steinle A (2003)。从肿瘤细胞中蛋白水解释放可溶性UL16结合蛋白2(Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells.) *Cancer Res* 2006;66(5):2520-2526;Salih HR et al. (2006), *Hum Immunol*.2006Mar;67(3):188-95;Salih HR et al. (2003) *Blood*.2003Aug 15;102(4):1389-96;Salih HR et al. (2002) *J Immunol*.;169(8):4098-102]。

[0009] 病毒使用许多策略来逃避宿主免疫系统,表达逆转录病毒包膜的肿瘤细胞在体内逃避免疫排斥反应[Mangeney M et al. (1998). *Proc.Natl.Acad.Sci*.95:14920;Quintana F.et al. (2005). *J.Clin.Invest*.115:2149;Bloch I.et al. (2007), *FASEB J*.21:393]。已证实逆转录病毒如莫洛尼鼠白血病病毒以及慢病毒(HIV 1和HIV 2)通过它们的包膜蛋白gp41发挥免疫抑制活性[Morozov V.et al. (2012), *Retrovirology*.9:67;Denner J.et al. (2013), *PLoS ONE*.8:e55199;Schlecht-Louf G et al. (2014). *J.Virology*.88:992)。虽然该病毒蛋白的主要功能是促进病毒和细胞膜之间的融合,但gp41的不同结构域可抑制T细胞的激活和增殖。称为ISU(用于免疫抑制单元)的第一个位于gp41的N-螺旋重复的C-末端部分(Mangeney M et al. (1998). *Proc.Natl.Acad.Sci*.95:14920;Morozov V.et al. (2012), *Retrovirology*.9:67;Denner J.et al. (2013), *PLoS ONE*.8:e55199;Schlecht-Louf G et al. (2014). *J.Virology*.88:992)。它的作用方式尚未确定,但似乎干扰钙内流和PKC(蛋白激酶C)功能。称为FP(融合肽)的第二个位于蛋白质的N末端部分,并与TCR α 链直接相互作用,阻止TCR复合体组装[CohenT et al. (2010), *PLoS Pathogens*.6:e1001085;Faingold O et al. (2012), *J.Biol.Chem*.287:33503]。已证实,ISU和FP二者作为全蛋白跨膜蛋白、截短型跨膜蛋白或合成肽是免疫抑制的。

[0010] T细胞介导的免疫包括通过微调免疫反应的共刺激和抑制信号之间的平衡调节的多个序列步骤。称为免疫检查点的抑制信号对于维持自体耐受性以及限制免疫介导的旁系组织损伤至关重要。免疫检查点蛋白的表达可被肿瘤解除调节。肿瘤指派这些抑制途径的能力代表免疫抗性的重要机制,并且限制免疫治疗的成功。激活治疗性T细胞免疫应答的有前景的方法之一是阻断这些免疫检查点(Pardoll 2012)。免疫检查点代表癌症中功能性细胞免疫的激活的重要障碍,并且对T细胞(包括CTLA4和程序性死亡-1(PD-1))上的抑制性配体特异的拮抗性抗体是临床评价的靶向药物的实例。

[0011] 细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4;也称为CD152)下调T细胞激活的幅度,并

且用拮抗剂CTLA4抗体(伊匹单抗)治疗已显示黑素瘤患者的存活益处(Robert and Mateus 2011)。程序性细胞死亡蛋白1(PD1或PDCD1也称为CD279)代表免疫治疗的另一个非常有前景的靶标(Pardoll and Drake 2012;Pardoll 2012)。与CTLA-4相比,PD1在感染的炎症反应时限制外周组织中的T细胞效应器功能,并限制自体免疫。PD1抗体的第一次临床试验显示一些肿瘤消退的病例(Brahmer, Drake et al. 2010)。基于最近的研究,多个额外的免疫检查点蛋白代表用于治疗性阻滞的有前景的靶标。

[0012] W02013/173223A申请描述了用于免疫治疗的方法,其中通过施用针对PD-1和/或PD-L1的抗体破坏PD-1-PD-L1途径。该抑制性免疫调节剂用作生物标志物以实现患者选择和指导治疗期管理。

[0013] Pegram等人,(2012)已证实,经修饰以分泌干扰素IL-12的肿瘤靶向T细胞可消除鼠模型中的全身性肿瘤,而不需要诸如辐照、淋巴细胞删除性化疗和/或额外的细胞因子支持的预先调节。

[0014] Rong等人,(2014)已证实,在人类胚胎干细胞(hESC)中需要CTLA-4 Ig和PD-L1二者的表达以赋予免疫保护,因为两者自身都不足够。该方法已被用于支持将人胚胎干细胞同种异体移植到小鼠中。

[0015] 在所有上述3种现有技术(W02013/173223A,Pegram等人和Rong Z等人)中,自我识别系统(如TCR)保持功能,这限制了移植细胞持续存在于宿主中。然而,为了能够使用同种异体CAR T细胞作为癌症免疫治疗或其它适应症的治疗,必须减轻移植物抗宿主病(GvHD)的风险以及患者排斥治疗性细胞的风险。同种异体细胞可在接受淋巴细胞删除方案的患者中存活,但它们的治疗活性受淋巴细胞删除的持续时间限制。

[0016] 为了延长它们的存活和增强它们的治疗活性,本发明人在此描述了一种防止治疗性同种异体T细胞排斥的方法,同时患者的免疫系统可仍有活性。该方法包括通过工程化治疗细胞在细胞膜上或通过细胞膜异位表达和/或分泌免疫抑制多肽来产生局部免疫保护。他们发现,各组这样的多肽,特别是免疫检查点的拮抗剂,或衍生自病毒包膜或NKG2D配体的多肽可增强持久性和/或将同种异体免疫细胞植入宿主。为了更好的疗效,这种局部免疫抑制作用通过使自体/非自体识别中涉及的基因失活来完成,从而使这些用于植入的工程化免疫细胞可作为“现成(off the shelf)”产品获得。

发明内容

[0017] 本发明公开了通过增加它们的持久性和/或使它们容易植入宿主生物体中,从而降低移植物抗宿主病(GvHD)的风险来设计诸如T细胞的免疫细胞以使它们适于免疫治疗目的的方法。更具体地,本发明涉及一种方法,其中编码参与自体和非自体抗原识别的多肽的至少一种内源基因在一个免疫细胞中失活,随后将所述工程化免疫细胞与至少一种非内源性免疫抑制多肽接触。

[0018] 在一个方面中,失活在TCR和/或 $\beta 2M$ 基因上进行,优选地通过使用特异性稀有切割核酸内切酶,如TALE-核酸酶进行。

[0019] 在另一方面中,为了防止通过宿主抗移植物(HvG)-,即攻击那些同种异体转移的免疫细胞的宿主免疫细胞而继承性转移的同种异体免疫细胞的消耗,通过由免疫细胞自身表达无活性PD1和/或CTLA-4配体实现接触步骤。根据本发明的其它替代方案提供病毒MHC

同源物、NKG2D配体和/或病毒包膜免疫抑制结构域(viral env immune suppressive domain) (ISU)或病毒FP蛋白的表达。

[0020] 此外,仍在本发明的范围内,可使用工程化免疫细胞与至少一种非内源性免疫抑制性多肽的孵育(incubation)代替免疫抑制多肽的表达。作为在所述孵育中使用的免疫抑制多肽,CD80/CD86抗体是优选的。

[0021] 与免疫治疗相关的经修饰的免疫细胞还可包含编码嵌合抗原受体(CAR)的外源重组多核苷酸用于特异性细胞识别。所得的包含本说明书中描述的任何蛋白质、多肽或载体的经分离的细胞或细胞系专门用作治疗产品,理想地作为具有降低的移植物抗宿主病(GvHD)风险和延长的寿命的“现成”产品。

[0022] 还描述了通过施用这种工程化免疫细胞来治疗或预防患者的癌症或感染的方法。

[0023] 附图和表的简要描述

[0024] 除了上述之外,本发明还包括将出现在以下描述以及附图中的特征。通过参考结合以下详细描述及以下附图,同样更容易获得对本发明的更完整的理解以及其许多伴随优点的更好理解。

附图说明

[0025] 图1:同种异体CAR T细胞与不同宿主免疫细胞(CD8+和CD4+T细胞,APC如树突状细胞和NK细胞)之间的潜在相互作用的示意图,CAR T细胞没有另外的基因修饰。符号(+)表示激活且符号(-)表示抑制。CAR T细胞通过遇到显示由CAR的scFv识别的抗原细胞表面的靶向肿瘤细胞而被激活。同种异体CAR T细胞与宿主NK细胞之间的相互作用被由NK细胞的抑制剂识别的MHC I所抑制。宿主细胞毒性T细胞(CD8+T细胞)的激活通过CAR T细胞的MHC I成分的TCR结合而发生。此外,宿主NK细胞对同种异体T CAR细胞的作用通过MHCI识别被抑制。

[0026] 图2:同种异体CAR T细胞与不同宿主免疫细胞(CD8+和CD4+T细胞,APC如树突状细胞和NK细胞)之间的潜在相互作用的示意图;CAR T细胞表达分泌的CTLA-4 Ig。符号(+)表示激活且符号(-)表示抑制。CAR T细胞通过遇到显示由CAR的scFv识别的抗原细胞表面的靶向肿瘤细胞而被激活。NK细胞和CAR T细胞之间的相互作用保持不变。分泌的CLTA-4 Ig结合APC细胞和肿瘤细胞表面上的CD80/CD86抗原,因此使APC细胞(此处这样的树突状细胞)与CAR T细胞之间的相互作用失活。因此,CLTA-4 Ig的分泌产生局部免疫保护。

[0027] 图3:同种异体CAR T细胞与不同宿主免疫细胞(CD8+和CD4+T细胞,APC如树突状细胞和NK细胞)之间的潜在相互作用的示意图;CAR T细胞表达膜结合的PD-L1,并且其PD-1基因被KO失活。符号(+)表示激活且符号(-)表示抑制。CAR T细胞与肿瘤细胞和NK细胞之间的潜在相互作用保持不变。由于结合PD-L1与后者的PD-1受体,因此同种异体CAR T细胞的PD-L1的表达使它对宿主CD8+ T细胞不敏感。因此,PD-L1触发患者的T细胞中的T细胞抑制途径,当同种异体的PD-1基因失活时,这种作用更加明显。

[0028] 图4:同种异体CAR T细胞与不同宿主免疫细胞(CD8+和CD4+T细胞,APC如树突状细胞和NK细胞)之间的潜在相互作用的示意图;CAR T细胞表达分泌的PD-L1,并且其PD-1基因被KO失活。符号(+)表示激活且符号(-)表示抑制。CAR T细胞与肿瘤细胞以及与NK细胞之间的潜在相互作用保持不变。由同种异体CAR T细胞分泌的PD-L1可通过它们的PD-1受体与宿

主CD8+和CD4+ T细胞结合,从而抑制PD-L1/PD-1途径。因此,PD-L1触发患者的T细胞中的T细胞抑制途径,当同种异体的PD-1基因失活时,这种作用更加明显。

[0029] 图5:同种异体CAR T细胞与不同宿主免疫细胞(CD8+和CD4+T细胞,APC如树突状细胞和NK细胞)之间的潜在相互作用的示意图;CAR T细胞表达病毒包膜免疫抑制结构域(ISU)。符号(+)表示激活且符号(-)表示抑制。CAR T细胞与肿瘤细胞以及与NK细胞之间的潜在相互作用保持不变。病毒ISU的表达似乎通过宿主T细胞抑制同种异体CAR T细胞的识别,且APC细胞可能通过减少IL-10白细胞介素的产生,从而产生免疫抑制作用。

[0030] 图6:同种异体CAR T细胞与不同宿主免疫细胞(CD8+和CD4+T细胞,APC如树突状细胞和NK细胞)之间的潜在相互作用的示意图,CAR T细胞具有被KO失活的B2M基因。符号(+)表示激活且符号(-)表示抑制。CAR T细胞与肿瘤细胞之间的潜在相互作用保持不变。作为MCHI的一个成分的B2M基因的失活使得后者在与宿主细胞毒性T细胞(CD8+)和NK细胞的相互作用方面不起作用。然后,NK细胞可通过激活物途径如NKG2D/NKG2D配体在同种异体CAR T细胞上发挥它的激活。

[0031] 图7:同种异体CAR T细胞与不同宿主免疫细胞(CD8+和CD4+T细胞,APC如树突状细胞和NK细胞)之间的潜在相互作用的示意图,CAR T细胞具有被KO失活的B2M基因并且表达病毒MHCI同源物。符号(+)表示激活且符号(-)表示抑制。CAR T细胞与肿瘤细胞之间的潜在相互作用保持不变。对于前图(仅B2M KO),CAR T细胞与宿主CD8+ T细胞之间的相互作用得到减轻。在这种情况下,病毒MHCI同源物的表达使得与NK细胞的相互作用通过MHCI/抑制剂受体而无效。通过B2M的KO双基因修饰同种异体CAR T细胞结合病毒MHCI同源物的表达加强了它们的免疫抑制保护。

[0032] 图8:同种异体CAR T细胞与不同宿主免疫细胞(CD8+和CD4+T细胞,APC如树突状细胞和NK细胞)之间的潜在相互作用的示意图,CAR T细胞具有被KO失活的B2M基因并且表达可溶性NKG2D配体。符号(+)表示激活且符号(-)表示抑制。CAR T细胞与肿瘤细胞之间的潜在相互作用保持不变。对于前图(仅B2M KO),CAR T细胞与宿主CD8+ T细胞之间的相互作用得到减轻。可溶性NKG2D配体的表达是失活与NK细胞相互作用的另一种方法。在这种情况下,可溶性NKG2D配体可结合NK细胞上的NKG2D受体,但与其一起发挥抑制竞争的CAR T细胞的NKG2D配体相反,不起作用。通过B2M的KO双基因修饰同种异体CAR T细胞结合可溶性NKG2D配体的表达加强了它们的免疫抑制保护。

[0033] 图9:同种异体CAR T细胞过继性免疫治疗的一般方案,例示了潜在的宿主抗移植物反应(HvG)。此处,以抗-CD19嵌合抗原受体(CAR)为例来代表,其目的是治疗患有急性淋巴细胞性白血病(ALL)的患者。在从健康供体纯化同种异体T细胞的步骤后,它们的激活和扩增,CAR转导和最终它们输注到ALL患者中,对这些同种异体CAR T细胞存在高度的宿主免疫攻击(HvG)风险。

[0034] 图10:描述PD-L1再表达的方案,以防止在同种异体CAR T细胞过继性转移后在宿主患者中发生HvG反应。A.通过在原发性T细胞的细胞表面上再表达PD-L1来预防HvG反应的方案。B.不存在PD-L1表达的HvG反应的方案。

[0035] 图11:描述包含宿主抗原呈递细胞(APC)和宿主T细胞的HvG反应连同在同种异体T细胞存在下参与其激活的受体的名称的方案。A.HvG反应的方案。B.通过同种异体T细胞防止CTLA4-Ig的HvG的方案。

[0036] 图12:A、B和C通过流式细胞术表征T细胞或CAR工具T细胞表面的PD-L1的表达。

[0037] 图13:将表达PD-L1的工程化CAR T细胞的特异性细胞裂解活性转移到相关和非相关肿瘤细胞(分别为Daudi和K562细胞)。A和B表示不同的献血者。

[0038] 图14:在培养基中由CAR T细胞分泌的CTLA4a Ig和CTLA4b Ig的ELISA检测。A.用于定量培养基中的CTLA4 Ig的量的标准曲线。B.在用编码CTLA4a Ig或CTLA4b Ig的10或20 μ g的mRNA转染的工程化CAR T细胞的培养基上清液中检测CTLA4a和b Ig。

[0039] 图15:将表达CTLA4a Ig的工程化CAR T细胞的特异性细胞裂解活性转移到相关和非相关肿瘤细胞(分别为Daudi和K562细胞)。

[0040] 图16:T细胞中的 β 2-m表达的FACS分析。通过FACS分析未转染的(上图)和转染的T细胞(中间图和下图)的活力(左图)和 β 2-m表达(右图)。

[0041] 图17:以MOI为5用对照LV(PD-L1)、单独的CTLA4Ig Lv转导的或用PD-L1和CTLA4Ig Lv共转导的工程化CAR T细胞的培养基上清液中的CTLA4Ig的检测。通过ELISA以1/1000e稀释(阴影条)或1/5000e稀释(黑色条)通过ELISA测试来自14天龄培养物的上清液。灰色条表示来自两种稀释的平均滴度。

[0042] 图18:用于定量来自供体1(灰色条)的CFSE阴性T细胞的混合淋巴细胞反应,响应于指示的刺激定量CD3⁺ T细胞(黑色条)和T细胞活力(阴影条)。D1和D2分别对应于供体1和供体2。从左到右:(a)单独培养没有任何治疗的来自供体1的PBMC;(b)单独培养已经以浓度增加的PHA(植物血球凝集素-10 μ g/ml,T细胞有丝分裂原)进行治疗的来自供体1的PBMC;(c)共培养来自供体1的PBMC与来自供体2的未转导的T细胞;(d)共培养来自供体1的PBMC与来自供体2的PD-L1转导的T细胞;(e)共培养来自供体1的PBMC与来自供体2的CTLA4Ig转导的T细胞;(f)共培养来自供体1的PBMC与来自供体2的PD-L1和CTLA4Ig共转导的T细胞。

[0043] 图19:细胞毒性测定,其中使用特异性靶细胞(MOLM-13;表达CD123抗原)和对照阴性细胞(Daudi)以10:1的E:T比孵育指示的不同工程化CAR T细胞(如图下方所示)4小时。通过流式细胞术测量靶细胞死亡,并将非特异性杀伤归一化(Daudi)。

[0044] 图20:细胞毒性测定,其中使用特异性靶细胞(MOLM-13)和对照阴性细胞(Daudi)以10:1(阴影条)、5:1(黑色条)和1:1(灰色条)的E:T比孵育指示的不同工程化CAR T细胞(如图下方所示)4小时。通过流式细胞术测量靶细胞死亡,并将非特异性杀伤归一化(Daudi)。

[0045] 图21:体内实验的总体方案。在工程化CAR T细胞注射之前,首先使用MOLM-13(luc/GFP)肿瘤细胞系注射NOG小鼠7天。通过生物发光(Biolum.)分析和总体生存来监测肿瘤进展。

[0046] 图22:通过流式细胞术监测工程化T细胞的CAR CD123和PD-L1细胞表面表达。

[0047] 图23:显示NOG小鼠中的肿瘤的从D-1到D14的生物发光图像。照片中的黑点代表肿瘤。注射到小鼠中的不同组的T细胞呈现如下。在图23A中:未转染的T细胞(无CAR T细胞)或由抗-CD123 CAR(CART CD123)转染的T细胞。在图23B中:用抗-CD123 CAR转染并用CTLA4Ig(CAR T CD123/CTLA4Ig)转导的T细胞;用抗-CD123 CAR转染并用PD-L1(CAR T CD123/PDL1)转导的T细胞;用抗-CD123 CAR转染并用CTLA4Ig和PD-L1(CAR T CD123/PDL1/CTLA4Ig)转导的T细胞。

[0048] 图24:具有以下成分的不同单链嵌合抗原受体CAR体系结构(V1至V6)示意图:对抗

原、铰链、跨膜结构域(TM)、共刺激结构域(4-1BB)和信号转导结构域(CD3 ζ)特异性的VH和VL链,任选地具有一个或多个接头。

[0049] 表1: β 2m TALE-核酸酶序列的描述

[0050] 表2:提出了2对TALEN的多核苷酸序列并用于2种不同的PDC1基因靶标

[0051] 表3:表达CLTA-4a、CTLA-4b和PD-L1的质粒构建体的多核苷酸序列。

[0052] 表4:来自不同病毒的ISU结构域变体的多肽序列。

[0053] 表5:病毒MHC同源物(UL18)和一组NKG2D配体的多肽序列。

[0054] 表6:来自天然和人工起源的FP多肽的氨基酸序列。

[0055] 表7:TRAC和TRBC TALE-核酸酶和人类相应基因中的TALE-核酸酶靶位点的序列的描述。

具体实施方式

[0056] 除非本文具体地定义,使用的所有技术和科学术语具有与基因治疗、生物化学、遗传学和分子生物学领域的技术人员通常理解的相同含义。

[0057] 与本文所述的相似或等同的所有方法和材料可用于使用本文所述的合适方法和材料实施或测试本发明。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献都通过引用它们的全部内容并入本文。在发生冲突的情况下,以本说明书包括定义为准。此外,除非另有说明,材料、方法和实施例仅是说明性的而不旨在是限制性的。

[0058] 除非另有说明,本发明的实施采用在本领域技术范围内的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术。这些技术在文献中得到充分解释。参见例如,Current Protocols in Molecular Biology(Frederick M.AUSUBEL,2000,Wiley and son Inc,Library of Congress,USA);Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Third Edition,(Sambrook等人,2001,Cold Spring Harbor,New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press);Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑,1984);Mullis等人,美国专利号4,683,195;Nucleic Acid Hybridization(B.D.Harries&S.J.Higgins编辑.1984);Transcription And Translation(B.D.Hames&S.J.Higgins编辑.1984);Culture Of Animal Cells(R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987);Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press,1986);B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning(1984);the series,Methods In ENZYMOLOGY(J.Abelson and M.Simon编辑.-in-chief,Academic Press,Inc.,New York),具体地,第154和155卷(Wu等人编辑)和第185卷,“Gene Expression Technology”(D.Goeddel编辑);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J.H.Miller和M.P.Calos编辑,1987,Cold Spring Harbor Laboratory);Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer和Walker编辑,Academic Press,London,1987);Handbook Of Experimental Immunology,第I-IV卷(D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑,1986)和Manipulating the Mouse Embryo,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1986)。

[0059] 在一般方面中,本发明涉及用于治疗癌症和感染中的新的过继性免疫治疗策略的方法。

[0060] 本发明涉及以下主要实施方式：

[0061] 1) 增加同种异体免疫细胞持久性和/或移植成活率 (engraftment) 的方法, 包括:

[0062] a) 提供同种异体细胞;

[0063] b) 通过失活至少一种编码涉及自体和非自体抗原识别的多肽的内源基因来修饰所述细胞;

[0064] 和

[0065] c) 使所述免疫细胞与至少一种非内源性免疫抑制多肽接触。

[0066] 2) 根据实施方式1的方法, 其中所述免疫细胞是造血细胞。

[0067] 3) 根据实施方式1或实施方式2的方法, 其中所述免疫细胞是原代细胞。

[0068] 4) 根据实施方式1至3中任一项的方法, 其中步骤c) 中的所述表达或接触不特异性抑制T调节细胞。

[0069] 5) 根据实施方式1至4中任一项的方法, 其中步骤c) 中的所述表达或接触特异性抑制CD8⁺ T细胞。

[0070] 6) 根据实施方式1至实施方式5中任一项的方法, 其中步骤c) 通过在所述免疫细胞中表达至少一种指导至少一种非内源性免疫抑制性多肽的分泌的非内源性多核苷酸进行。

[0071] 7) 根据实施方式1至实施方式6中任一项的方法, 其中步骤c) 另外包含编码PD-1的基因的表达的失活。

[0072] 8) 根据实施方式7的方法, 其中通过使用编码SEQ ID N° 11-12和13-14的TALE-核酸酶的多核苷酸来进行PD-1基因的失活。

[0073] 9) 根据实施方式1至8中任一项的方法, 其中步骤b) 中的所述多肽选自TCR、MHC类I类组分、b-2微球蛋白 (B2M)、TAP1和大多功能蛋白酶2。

[0074] 10) 根据实施方式1至9中任一项的方法, 其中步骤c) 中的所述多肽选自PDL-1、CTLA-4、病毒MHC同源物、NKG2D配体、病毒包膜免疫抑制结构域 (ISU) 或病毒FP蛋白。

[0075] 11) 根据实施方式1至10中任一项的方法, 其中步骤b) 通过B2M的失活进行, 且步骤c) 通过在所述同种异体免疫细胞中表达无活性PDL-1配体进行。

[0076] 12) 根据实施方式1至11中任一项的方法, 其中步骤c) 中的另外的修饰通过在所述同种异体免疫细胞中表达CTLA-4免疫球蛋白进行。

[0077] 13) 根据实施方式12的方法, 其中编码待表达的CTLA-4免疫球蛋白的核酸分子与SEQ ID NO: 16-17共有至少80%、优选90%、并且更优选为95%的同一性。

[0078] 14) 根据实施方式1至13中任一项的方法, 其中步骤b) 通过TCR的失活进行, 且步骤c) 通过由所述同种异体免疫细胞表达无活性PDL-1配体进行。

[0079] 15) 根据实施方式1至10中任一项所述的方法, 其中步骤c) 通过表达选自FeLV、MLV、HERV或病毒FP蛋白的病毒包膜免疫抑制结构域 (ISU) 进行。

[0080] 16) 根据实施方式1至10中任一项的方法, 其中步骤b) 通过B2M的失活进行, 且步骤c) 通过由所述同种异体免疫细胞表达病毒包膜免疫抑制结构域 (ISU) 进行。

[0081] 17) 根据实施方式1至10中任一项的方法, 其中步骤b) 通过TCR的失活进行, 且步骤c) 通过由所述同种异体免疫细胞的病毒包膜免疫抑制结构域 (ISU) 的表达进行。

[0082] 18) 根据实施方式16或17的方法, 其中编码待表达的病毒包膜免疫抑制结构域 (ISU) 的核酸分子与SEQ ID NO: 19-38共有至少80%、优选90%、更优选95%的同一性。

[0083] 19) 根据实施方式1至10中任一项的方法,其中步骤b)通过B2M的失活进行,且步骤c)通过由所述同种异体免疫细胞表达病毒FP蛋白进行。

[0084] 20) 根据实施方式1至10中任一项的方法,其中步骤b)通过TCR的失活进行,且步骤c)通过由所述同种异体免疫细胞表达病毒FP蛋白进行。

[0085] 21) 根据实施方式19或20的方法,其中编码待表达的病毒FP蛋白的核酸分子与SEQ ID NO:48-50共有至少80%、优选90%、更优选95%的同一性。

[0086] 22) 根据实施方式1至10中任一项的方法,其中步骤b)通过B2M的失活进行,且步骤c)通过由所述同种异体免疫细胞表达NKG2G配体进行。

[0087] 23) 根据实施方式1至10中任一项的方法,其中步骤b)通过TCR的失活进行,且步骤c)通过由所述同种异体免疫细胞表达NKG2G配体进行。

[0088] 24) 根据实施方式22或23的方法,其中编码待表达的NKG2G配体的核酸分子与SEQ ID NO:40-47共有至少80%、优选90%、更优选95%的同一性。

[0089] 25) 根据实施方式1至10中任一项的方法,其中步骤b) ii) 中的病毒MHC同源物是UL18。

[0090] 26) 根据实施方式1至10中任一项的方法,其中步骤b)通过B2M的失活进行,且步骤c)通过由所述同种异体免疫细胞表达病毒MHC同源物UL18进行。

[0091] 27) 根据实施方式1至10中任一项的方法,其中步骤b)通过TCR的失活进行,且步骤c)通过由所述同种异体免疫细胞表达病毒MHC同源物UL18进行。

[0092] 28) 根据实施方式26或27的方法,其中编码待表达的病毒MHC同源物UL18的核酸分子与SEQ ID NO:39共有至少80%、优选90%、更优选95%的同一性。

[0093] 29) 根据实施方式1至5或实施方式8-9中任一项的方法,其中步骤c)通过在至少一种非内源性免疫抑制多肽中孵育所述免疫来进行。

[0094] 30) 根据实施方式29的方法,其中所述非内源性免疫抑制多肽是抗-CD80或抗-CD86mAb。

[0095] 31) 根据实施方式1或30中任一项的方法,其中步骤b)中的基因失活通过使用TAL-核酸酶、大范围核酸酶(meganuclease)、锌指核酸酶(zinc-finger nuclease) (ZFN) 或RNA引导的核酸内切酶进行。

[0096] 32) 根据实施方式1或31中任一项的方法,其中步骤b)中的基因失活使用TAL-核酸酶进行。

[0097] 33) 根据实施方式1至31中任一项的方法,其中步骤b)中的基因失活通过使用RNA引导的核酸内切酶进行。

[0098] 34) 根据实施方式33的方法,其中RNA引导的核酸内切酶是Cas9。

[0099] 35) 根据实施方式1-10、11-15、17-18、20-21、23-25或27-34中任一项的方法,其中步骤b)中的基因失活通过使用抑制编码TCR的基因的表达的核酸分子进行。

[0100] 36) 根据实施方式32的方法,其中通过使用SEQ ID N°52-53、55-56、62-63和65-66的TALE-核酸酶进行TCR基因的失活。

[0101] 37) 根据实施方式1-12、13-16、18-19、21-22、24-26或28-34中任一项的方法,其中步骤b)中的失活基因通过使用抑制编码B2M的基因的表达的核酸分子进行。

[0102] 38) 根据实施方式32的方法,其中通过使用SEQ ID N°2-3、5-6和8-9的TALE-核酸

酶进行B2M基因的失活。

[0103] 39) 根据实施方式1至38中任一项的方法,进一步包括以下步骤:

[0104] d) 向所述T细胞中引入包含编码针对在恶性或感染细胞表面表达的至少一种抗原的嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的外源核酸分子。

[0105] 40) 根据实施方式39的方法,其中所述嵌合抗原受体包含与SEQ ID NO 67(CD19抗原)、SEQ ID NO 68(CD38抗原)、SEQ ID NO 69(CD123抗原)、SEQ ID NO 70(CS1抗原)、SEQ ID NO 71(BCMA抗原)、SEQ ID NO 72(FLT-3抗原)、SEQ ID NO 73(CD33抗原)、SEQ ID NO 74(CD70抗原)、SEQ ID NO 75(EGFR-3v抗原)和SEQ ID NO 76(WT1抗原)具有超过80%同一性、优选超过90%、且更优选超过95%的作为抗原靶序列的scFv(VH和VL链)。

[0106] 41) 根据实施方式1至40中任一项的方法,进一步包括以下步骤:

[0107] d) 扩增得到的工程化T细胞。

[0108] 42) 一种工程化的、优选分离的T细胞,通过使用根据实施方式1至41中任一项的方法可获得。

[0109] 43) 根据实施方式42的工程化的T细胞,用作药物。

[0110] 44) 根据实施方式42或实施方式43的工程化的T细胞,用于治疗癌症或病毒感染。

[0111] 45) 根据实施方式42至44中任一项的工程化的T细胞,用于治疗淋巴瘤。

[0112] 46) 根据实施方式42至45中任一项的工程化的T细胞,其中所述T细胞源自待治疗的患者。

[0113] 47) 根据实施方式42至45中任一项的工程化的T细胞,其中所述T细胞源自供体。

[0114] 48) 一种包含至少一种根据实施方式42至47中任一项的工程化的T细胞的组合物。

[0115] 本发明更具体地涉及以下实施方式:

[0116] 1) 在宿主免疫细胞的存在下增加同种异体免疫细胞的持久性和/或移植成活率的方法,包括:

[0117] a) 提供同种异体细胞;

[0118] b) 通过失活至少一种编码参与针对自体和非自体抗原识别的响应的多肽的内源基因来修饰所述细胞;

[0119] 和

[0120] c) 使所述宿主免疫细胞与至少一种非内源性免疫抑制多肽接触,所述非内源性免疫抑制多肽具有预防它们与同种异体免疫细胞相互作用的作用。

[0121] 2) 根据实施方式1的方法,其中步骤b)中的所述多肽选自TCR、MHC类I类组分、b-2微球蛋白(B2M)、TAP1和大多功能蛋白酶2。

[0122] 3) 根据实施方式1或2的方法,其中步骤c)中的所述免疫抑制多肽以膜结合形式和/或以分泌形式存在。

[0123] 4) 根据实施方式1至3中任一项的方法,其中步骤c)通过在所述免疫细胞中表达至少一种编码与所述免疫细胞的膜表面结合的非内源性免疫抑制多肽的非内源性多核苷酸进行。

[0124] 5) 根据实施方式1至4中任一项的方法,其中与所述免疫细胞的膜表面结合的所述一种非内源性免疫抑制多肽是PD-L1配体。

[0125] 6) 根据实施方式5的方法,其中编码待表达的膜结合形式的PD-L1配体的核酸分子

与SEQ ID NO:18共有至少80%、优选90%、更优选95%的同一性。

[0126] 7) 根据实施方式1至3中任一项的方法,其中所述免疫抑制多肽以分泌形式存在。

[0127] 8) 根据实施方式1-3或实施方式7中任一项的方法,其中步骤c)通过在所述免疫细胞中表达至少一种编码一种在所述免疫细胞中以分泌形式存在的非内源性免疫抑制多肽的非内源性多核苷酸进行。

[0128] 9) 根据实施方式8的方法,其中编码待表达的CTLA-4免疫球蛋白的核酸分子与SEQ ID NO:16-17共有至少80%、优选90%、更优选95%的同一性。

[0129] 10) 根据实施方式1-8中任一项的方法,其中步骤c)通过使所述宿主免疫细胞与非内源性免疫抑制多肽PD-L1配体和CTLA-4免疫球蛋白接触来进行。

[0130] 11) 根据实施方式10的方法,其中步骤c)由非内源性免疫抑制多肽PD-L1配体和CTLA-4免疫球蛋白二者的免疫细胞中的表达进行。

[0131] 12) 根据实施方式11的方法,其中所述分泌至少一种非内源性免疫抑制多肽是分泌形式的PD-L1配体。

[0132] 13) 根据实施方式9至12中任一项的方法,其中编码在所述同种异体免疫细胞中待表达的膜结合形式的PD-L1配体和CTLA-4免疫球蛋白的核酸分子分别与SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:16-17共有至少80%、优选90%、更优选95%的同一性。

[0133] 14) 根据实施方式1至13中任一项的方法,其中所述免疫细胞是原代细胞。

[0134] 15) 根据实施方式1至3中任一项的方法,其中步骤c)中的所述表达或接触不特异性抑制T调节细胞。

[0135] 16) 根据实施方式1至15中任一项的方法,其中步骤c)中的所述表达或接触特异性抑制宿主CD8⁺ T细胞。

[0136] 17) 根据实施方式1至16中任一项的方法,其中步骤c)另外包含PD-1基因的表达的失活。

[0137] 18) 根据实施方式1至3中任一项的方法,其中步骤c)通过在所述免疫细胞中表达至少一种编码膜结合形式的PD-L1配体的非内源性多核苷酸进行,并且所述同种异体细胞的进一步修饰通过PD-1基因的表达的失活进行。

[0138] 19) 根据实施方式1至18中任一项的方法,其中步骤c)通过在所述免疫细胞中表达至少一种引导CTLA4 Ig的分泌的非内源性多核苷酸进行,并且所述同种异体细胞的进一步修饰通过PD-1基因的表达的失活进行。

[0139] 20) 根据实施方式1至19中任一项的方法,其中步骤c)通过步骤c)通过非内源性免疫抑制多肽PD-L1配体和CTLA-4免疫球蛋白二者在所述免疫细胞中的表达进行,并且所述同种异体免疫细胞的进一步修饰通过PD-1基因的表达的失活进行。

[0140] 21) 根据实施方式20的方法,其中通过使用编码SEQ ID N°11-12和13-14的TALE-核酸酶的多核苷酸来进行PD-1基因的失活。

[0141] 22) 根据实施方式1至16中任一项的方法,其中步骤c)中的所述多肽选自PD-L1、CTLA-4、病毒MHC同源物、NKG2D配体、病毒包膜免疫抑制结构域(ISU)或病毒FP蛋白。

[0142] 23) 根据实施方式1至4中任一项的方法,其中步骤b)通过B2M的失活进行,且步骤c)通过在所述同种异体免疫细胞中表达PD-L1配体进行。

[0143] 24) 根据实施方式1至4中任一项的方法,其中步骤b)通过TCR的失活进行,且步骤

c) 通过由所述同种异体免疫细胞表达PD-L1配体进行。

[0144] 25) 根据实施方式1至4中任一项的方法,其中步骤c)通过表达选自FeLV、MLV、HERV或病毒FP蛋白的病毒包膜免疫抑制结构域(ISU)进行。

[0145] 26) 根据实施方式1至4或实施方式25中任一项的方法,其中步骤b)通过B2M的失活进行,且步骤c)通过由所述同种异体免疫细胞表达病毒包膜免疫抑制结构域(ISU)进行。

[0146] 27) 根据实施方式1至4中任一项的方法,其中步骤b)通过TCR的失活进行,且步骤c)通过由所述同种异体免疫细胞的病毒包膜免疫抑制结构域(ISU)的表达进行。

[0147] 28) 根据实施方式26或27的方法,其中编码待表达的病毒包膜免疫抑制结构域(ISU)的核酸分子与SEQ ID NO:19-38共有至少80%、优选90%、更优选95%的同一性。

[0148] 29) 根据实施方式1至4中任一项的方法,其中步骤b)通过B2M的失活进行,且步骤c)通过由所述同种异体免疫细胞表达病毒FP蛋白进行。

[0149] 30) 根据实施方式1至4或实施方式29中任一项的方法,其中步骤b)通过TCR的失活进行,且步骤c)通过由所述同种异体免疫细胞表达病毒FP蛋白进行。

[0150] 31) 根据实施方式29或30的方法,其中编码待表达的病毒FP蛋白的核酸分子与SEQ ID NO:48-50共有至少80%、优选90%、更优选95%的同一性。

[0151] 32) 根据实施方式1至4中任一项的方法,其中步骤b)通过B2M的失活进行,且步骤c)通过由所述同种异体免疫细胞表达NKG2G配体进行。

[0152] 33) 根据实施方式1至4或实施方式32中任一项的方法,其中步骤b)通过TCR的失活进行,且步骤c)通过由所述同种异体免疫细胞表达NKG2G配体进行。

[0153] 34) 根据实施方式32或33的方法,其中编码待表达的NKG2G配体的核酸分子与SEQ ID NO:40-47共有至少80%、优选90%、更优选95%的同一性。

[0154] 35) 根据实施方式1至4中任一项的方法,其中步骤b) ii) 中的病毒MHC同源物是UL18。

[0155] 36) 根据实施方式1至4或实施方式35中任一项的方法,其中步骤b)通过B2M的失活进行,且步骤c)通过由所述同种异体免疫细胞表达病毒MHC同源物UL18进行。

[0156] 37) 根据实施方式1至4或实施方式36中任一项的方法,其中步骤b)通过TCR的失活进行,且步骤c)通过由所述同种异体免疫细胞表达病毒MHC同源物UL18蛋白进行。

[0157] 38) 根据实施方式36或37的方法,其中编码待表达的病毒MHC同源物UL18的核酸分子与SEQ ID NO:39共有至少80%、优选90%、更优选95%的同一性。

[0158] 39) 根据实施方式1至38中任一项的方法,其中步骤c)通过在至少一种非内源性免疫抑制多肽中孵育所述免疫来进行。

[0159] 40) 根据实施方式39的方法,其中所述非内源性免疫抑制多肽是抗-CD80或抗-CD86mAb。

[0160] 41) 根据实施方式1至40中任一项的方法,其中步骤b)中的基因失活通过使用TAL-核酸酶、大范围核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)或RNA引导的核酸内切酶进行。

[0161] 42) 根据实施方式41的方法,其中步骤b)中的基因失活使用TAL-核酸酶进行。

[0162] 43) 根据实施方式41的方法,其中步骤b)中的基因失活通过使用RNA引导的核酸内切酶进行。

[0163] 44) 根据实施方式43的方法,其中RNA引导的核酸内切酶是Cas9。

[0164] 45) 根据实施方式1-18、20-22、24-25、27-28、30-32或34-41中任一项的方法,其中步骤b)中的基因失活通过使用抑制编码TCR的基因的表达的核酸分子进行。

[0165] 46) 根据实施方式45的方法,其中通过使用SEQ ID N°52-53、55-56、62-63和65-66的TALE-核酸酶进行TCR基因的失活。

[0166] 47) 根据实施方式1-17、20-2、25-26、28-29、31-33或35-41中任一项的方法,其中步骤b)中的失活基因通过使用抑制编码B2M的基因的表达的核酸分子进行。

[0167] 48) 根据实施方式47的方法,其中通过使用SEQ ID N°2-3、5-6和8-9的TALE-核酸酶进行B2M基因的失活。

[0168] 49) 根据实施方式1至48中任一项的方法,进一步包括以下步骤:

[0169] d) 向所述T细胞中引入包含编码针对在恶性或感染细胞表面表达的至少一种抗原的嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的外源核酸分子。

[0170] 50) 根据实施方式49的方法,其中所述嵌合抗原受体包含与SEQ ID NO 67(CD19抗原)、SEQ ID NO 68(CD38抗原)、SEQ ID NO 69(CD123抗原)、SEQ ID NO 70(CS1抗原)、SEQ ID NO 71(BCMA抗原)、SEQ ID NO 72(FLT-3抗原)、SEQ ID NO 73(CD33抗原)、SEQ ID NO 74(CD70抗原)、SEQ ID NO 75(EGFR-3v抗原)和SEQ ID NO 76(WT1抗原)具有超过80%同一性、优选超过90%、且更优选超过95%的作为抗原靶序列的scFv(VH和VL链)。

[0171] 51) 根据实施方式1-50中任一项的方法,其中步骤c)由非内源性免疫抑制多肽PD-L1配体和/或CTLA-4免疫球蛋白在所述同种异体免疫细胞中的表达进行,所述同种异体免疫细胞通过表达抗-CD123嵌合抗原受体被进一步修饰。

[0172] 52) 根据实施方式51的方法,其中通过使PD-1基因的表达的失活进行所述同种异体免疫细胞的进一步修饰。

[0173] 53) 根据实施方式1至52中任一项的方法,进一步包括以下步骤:

[0174] d) 扩增得到的工程化的T细胞。

[0175] 54) 一种工程化的、优选分离的T细胞,通过使用根据实施方式1至53中任一项所述的方法可获得。

[0176] 55) 根据实施方式54的工程化的T细胞,用作药物。

[0177] 56) 根据实施方式54或实施方式55的工程化的T细胞,用于治疗癌症或病毒感染。

[0178] 57) 根据实施方式54至56中任一项的工程化的T细胞,用于治疗淋巴瘤或白血病。

[0179] 58) 根据实施方式54至57中任一项的工程化的T细胞,其中所述T细胞源自待治疗的患者。

[0180] 59) 根据实施方式54至57中任一项的工程化的T细胞,其中所述T细胞源自供体。

[0181] 60) 一种包含至少一种根据实施方式54至59中任一项的工程化的T细胞的组合物。

[0182] 关于本发明的上述方面的更多细节在下面的描述中提供。

[0183] 用于免疫治疗的非同种异体反应性和高度持久性的T细胞

[0184] 根据本发明的第一方面,本发明人已证实,当一些基因在同种异体免疫细胞中表达时,它们可允许其在宿主生物体中的持久性增加以获得更好的功效。

[0185] 本发明涉及一种优选地在宿主免疫细胞的存在下增加同种异体免疫细胞的持久性和/或移植成活率的方法,包括:

[0186] i) 提供同种异体细胞;

[0187] ii) 通过失活至少一种编码参与针对自体和非自体抗原识别的响应的多肽的内源基因来修饰所述细胞;

[0188] 和

[0189] iii) 使所述宿主免疫细胞与至少一种非内源性免疫抑制多肽接触。

[0190] 预期所述非内源性免疫抑制多肽具有预防宿主免疫细胞与同种异体免疫细胞相互作用的作用。

[0191] “持久性”是指细胞抵抗排斥的能力,并且在体内随时间保持和/或增加数量(例如,天、周、月、年)的数量。通常,在输注到所述患者体内之后,本发明的工程化免疫细胞可在患者的血液中发现至少10天,优选为至少20天,更优选为至少25天,甚至更优选为至少30天。

[0192] “植入”是指在体内细胞接触和结合在现有的感兴趣的位点的过程。

[0193] “增加持久性和/或植入”是指在治疗过程期间,与其中给予患者非工程化免疫细胞(即,非持久性)的情况相比,工程化以使它们持续的同种异体免疫细胞的数量保持较高。这种提高的持久性和/或待注射到患者中的同种异体免疫细胞的植入(例如,T细胞)是免疫耐受性的一部分(或“免疫耐受作用(tolerisation)”),其描述了宿主免疫系统相对于所述免疫细胞的无应答性状态,而所述免疫细胞保留引发免疫应答的能力。

[0194] 涉及自体和非自体抗原识别的基因失活

[0195] “自体和非自体抗原识别”旨在由细胞免疫系统进行筛选,借此由主要组织相容性复合物(MHC)分子上的宿主细胞呈递肽,以评估细胞是否被外源生物体感染。该筛选涉及其它跨膜结构,例如像TCR或TAP1/TAP2或蛋白酶2。

[0196] 通过使基因失活,意图是感兴趣的基因不表达功能蛋白形式。在特定实施方式中,该方法的基因修饰依赖于工程师提供的细胞中表达一种稀有切割核酸内切酶,使得所述稀有切割核酸内切酶特异性催化一种靶基因中的切割,从而使所述靶基因失活。由稀有切割核酸内切酶引起的核酸链断裂通常通过同源重组或非同源末端连接(NHEJ)的不同机制进行修复。然而,NHEJ是一个不完美的修复过程,其通常会导致切割部位处的DNA序列的变化。机制包括通过直接再连接(Critchlow and Jackson 1998)或通过所谓的微同源介导的末端连接(Ma, Kim et al. 2003)重新连接两个DNA末端的剩余部分。通过非同源末端连接(NHEJ)修复通常导致小的插入或缺失,并且可用于产生特异性基因敲除。所述修饰可以是至少一个核苷酸的取代、缺失或添加。可通过本领域公知的方法鉴定和/或选择其中发生切割诱导的诱变事件的细胞,即与NHEJ事件相连的诱变事件。

[0197] 已知内切核苷酸断裂刺激同源重组的速率。因此,在另一个实施方式中,该方法的基因修饰步骤还包括向细胞中引入包含至少与靶核酸序列的一部分同源的序列的外源核酸的步骤,使得在靶核酸序列和外源核酸之间发生同源重组。在特定实施方式中,所述外源核酸分别包含与靶核酸序列的区域5'和3'同源的第一和第二部分。在这些实施方式中,所述外源核酸还包含位于第一部分和第二部分之间的第三部分,其不包含与靶核酸序列的区域5'和3'的同源性。在切割靶核酸序列之后,在靶核酸序列和外源核酸之间刺激同源重组事件。优选地,在所述供体基质内使用至少50bp,优选大于100bp且更优选大于200bp的同源序列。因此,外源核酸优选为200bp至6000bp,更优选为1000bp至2000bp。实际上,共有的核酸同源性位于断裂位点的上游和下游侧翼区域,并且待引入的核酸序列应位于两个臂之间。

[0198] 根据优选的实施方式,优选通过使用TAL-核酸酶、大范围核酸酶、锌指核酸酶

(ZFN)或RNA/DNA引导的核酸内切酶,如Cas9、Cpf1或Argonaute进行基因失活。

[0199] 根据更优选的实施方式,所述参与自体和非自体抗原识别的基因的失活通过使用TALE-核酸酶进行。这可在由特异性TALE-核酸酶靶向的精确基因组定位完成,其中所述特异性TALE核酸酶催化切割,并且其中所述外源核酸连续包含至少一个同源性区域和使一个选自前述组的靶向基因失活的序列。可通过分别使用几种TALE-核酸酶来连续或同时地失活几种基因,并且特异性靶向一个定义的基因和几种特异性的基因。TALE核酸酶旨在是由衍生自类转录激活因子效应物(TALE)的DNA结合结构域和一个核酸酶催化结构域组成的融合蛋白,以切割核酸靶序列。(Boch,Scholze et al.2009;Moscou and Bogdanove 2009;Christian,Cermak et al.2010;Cermak,Doyle et al.2011;Geissler,Scholze et al.2011;Huang,Xiao et al.2011;Li,Huang et al.2011;Mahfouz,Li et al.2011;Miller,Tan et al.2011;Morbiter,Romer et al.2011;Mussolino,Morbiter et al.2011;Sander,Cade et al.2011;Tesson,Usal et al.2011;Weber,Gruetzner et al.2011;Zhang,Cong et al.2011;Deng,Yan et al.2012;Li,Piatek et al.2012;Mahfouz,Li et al.2012;Mak,Bradley et al.2012)。

[0200] 根据另一个优选的实施方式,涉及自体和非自体抗原识别的所述基因的失活通过RNA引导的核酸内切酶如Cas9或DNA引导的核酸内切酶进行,例如W02014189628中所述的基于Argonaute的技术。

[0201] 本发明涉及增加同种异体细胞的持久性和/或植入的方法,其包括使参与自体/非自体识别的至少一种基因失活的步骤。“参与自体/非自体识别的基因”是指编码结构上是外部受体或配体的一部分的多肽的基因,其被认为是由免疫系统检测和破坏同种异体细胞所必需的。这些基因优选编码TCR、MHC,特别是I类MHC、 β -2微球蛋白(β 2m)、TAP1或大多功能蛋白酶2的至少一种成分。

[0202] 在优选的实施方式中,待失活的基因是TCR或 β 2m,更优选是TCR。

[0203] 在本发明中,已设计出新的TALE-核酸酶用于精确靶向过继性免疫治疗策略的相关基因。根据本发明的优选的TALE-核酸酶是识别和切割选自用于失活 β 2m的SEQ ID NO:2-3、5-6和8-9和SEQ ID N°52-53、55-56、62-63和65-66 (TCR)的那些。

[0204] TALE-核酸酶裂解人 β 2m

[0205] 编码人 β 2m基因的靶向外显子的TALE-核酸酶的mRNA从Cellestis Bioresearch (8,rue de la Croix Jarry,75013PARIS)中订购。下表1表示由两个独立实体(称为半TALE-核酸酶)中的每一个切割的靶序列,其各自含有重复序列,所述重复序列被工程化以在由15-bp间隔物隔开的两个17-bp长序列(称为半靶标)组成的靶序列之间结合和切割。

[0206]

靶标名称	SEQ ID NO:	半TALE-核酸酶序列
T01 β 2m 靶标	1	TCTCGCTCCGTGGCCCTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCT A
T01 TALEN β 2m	2	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATACGATGTTCCAGA TTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGG AGAAGATCAAACCGAAGGTTCTGTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGT

[0207]

左	CGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGT TAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGACGCGTTGCCAGAGGCGAC ACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAG GCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAG GCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCA TGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCCAGCAGGTGG TGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCT GTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATC GCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCC ACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGT GCCAGGCCCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGG CGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGC AGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCCACGGCTT GACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTG GAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCCACGGCTTGACCCCCG AGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG TGCAAGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGC CGGTGCTGTGCCAGGCCCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAG CAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGT GTGCCAGGCCCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAAT GGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAG GCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCCACGG CTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCCACGGCTTGACCC CGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGA CGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCCACGGCTTGACCCCCAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGG CCATCGCCAGCAATGGCGGCGGAGGCCGCGCTGGAGAGCATTGTTGCCAGTT ATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCTTGG CCTGCCTCGGCGGGCGTCTCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCC TATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTG AGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCC GGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAA GGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCCAGCGCGC CATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCT ACTCCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGT GGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAAGGT GTACCCCTCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCTGTCGGGCCAATTCAAGG GCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCAACCACTGCAACGGCGCC GTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCC TGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGG
---	---

[0208]

		CCGACTGATAA
T01 TALEN β2M 右	3	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGACCGCCGCTGCCA AGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGG CTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCTGTTGACAGTGGCG CAGCACACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTT AAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATC GCAGCGTTGCCAGAGGCGACACAGGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGT CCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCC ACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAATTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGA CCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCGCTCAA CTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGG CCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT GCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC AGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTG CTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACG ATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCA GGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGC AAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACG GCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGC GCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACC CCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGA CGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGC GGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGC CATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTG CCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCA GCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCT GTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATT GGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAG GCCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGG CTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGAGGCCGGCGCTGGAGA GCATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGAC CACCTGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAA GGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAG AAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGC TGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGAT GGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGG AAGCCCGACGGCGCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGT GGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAA

[0209]

		ATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACG AGTGGTGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCTGTCTCC GGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACACATCACCAA CTGCAACGGCGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATC AAGGCCGGCACCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAG ATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA
T02 β2M 靶标	4	TCCAAAGATTCAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAA
T02 TALEN β2M 左	5	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATACGATGTTCCAGA TTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGG AGAAGATCAAACCGAAGGTTCTGTTGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGT CGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGT TAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGAC ACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAG GCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAG GCCAATTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCA TGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCGGAGCAGGTG GTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGG CTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCA TCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCC GGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGC AATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGG TGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGC AGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTT GACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTG GAGACGGTCCAGCGCTGTGTCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGG AGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG TGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGCAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGC CGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAG CCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTG TGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTG GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGG CCCACGGCTTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAA GCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGC TTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGC TGAGACGGTCCAGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCC CCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGCAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGG CCATCGCCAGCAATGGCGGCGGAGGCCGCGCTGGAGAGCATTGTTGCCAGTT

[0210]

		ATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCCTTGG CCTGCCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCC TATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTG AGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCC GGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAA GGTGTACGGCTACAGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGC CATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCT ACTCCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGT GGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAGGT GTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAGATTCTGTTCTGTTCCGGCCACTTCAAGG GCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCC GTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCC TGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGG CCGACTGATAA
T02 TALEN β2M 右	6	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGACCGCCGCTGCCA AGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGG CTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCTGTTGACAGTGCGG CAGCACACGAGGCACTGGTGGCCACGGGTTACACACGCGCACATCGTTGCGTT AAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCTGCTGTCAAGTATCAGGACATGATC GCAGCGTTGCCAGAGGCGACACAGCAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGT CCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCC ACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAATTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGA CCGAGTGGAGGCACTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAA CTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGA CGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCA GGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCA GCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTG TTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGC CAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGT GCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAAT GGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGC CAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCG GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCA CGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAG GCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGAC CCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGA GACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAG CAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTC CAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGG TGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGC TGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCAT CGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCC GGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGC AATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGT GCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGG

[0211]

		CGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGC AGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTT GACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAGGCCGGCGCTG GAGAGCATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCTTGACCAA CGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGCAGTGA AAAAGGGATTGGGGGATCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGA GGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATC GAGCTGATCGAGATCGCCGGAACAGCACCCAGGACCGTATCTGGAGATGAAGG TGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTC CAGGAAGCCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTG ATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCGA CGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCC AACGAGTGGTGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTGTTCTG GTCCGGCCACTTCAAGGGCACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCA CCAACCTGCAACGGCGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGAT GATCAAGGCCGGCACCTGACCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGG CGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA
T03 β2M 靶标	7	TTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTCTGGCCTGGAGGCTATCCA
T03 TALEN β2M 左	8	ATGGGCGATCTAAAAAGAAACGTAAGGTATCGATTACCCATACGATGTTCCAGA TTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGG AGAAGATCAAACCGAAGGTTCTGTTGACAGTGGCGCAGCACCCAGGGCACTGGT CGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGT TAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGAC ACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAG GCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAG GCCAATTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCCGAGTGGAGGCAAGTGCA TGATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCGCTCAACTGACCCCGAGCAGGTG GTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCG CTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCAT CGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCC ACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCACGGCTTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGG TGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGC AGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTT GACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTG GAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGC AGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG TCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCC ATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGC CGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAG

[0212]

		CCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTG TGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATAATG GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGC CCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAG CAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCT TGACCCCCAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATAATGGTGCAAGCAGGCGCT GGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCG GAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACG GTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGT GGTGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGCC ATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAGGCCGCGCTGGAGAGCATTGTTGCCAGTTAT CTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCTTGGCC TGCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGCAGTGAAGAGGGATTGGGGGATCCTA TCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAG GCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGG AACAGCACCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGG TGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCAGCGGCCAT CTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGACACCAAGGCTACT CCGGCGGCTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGA GGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAGGTGAC CCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTGTTCTGTCGGGCCACTTCAAGGGCAA CTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCACCTGCAACGGCGCCGTGC TGTCCGTGGAGGAGTCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCTGAC CCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGA CTGATAA
T03 TALEN β2M 右	9	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGACCGCGCTGCCA AGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGG CTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACGAAGGTTCTGTTGACAGTGGCG CAGCACCACGAGGCACTGGTCCGCCACGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTT AAGCCAAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATC GCAGCGTTGCCAGAGGCGACACAGCAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGT CCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCC ACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGA CCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCGCTCAA CTTGACCCCCAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGAAGCAGGCGG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCC CCCAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAG GTGGTGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAG GCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTG CCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT GCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGCCATCGCC AGCAATATTGGTGGAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTG TGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATAAT GGTGGAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAG GCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGG

[0213]

```

CTTGACCCCGGAGCAGGTG6TGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCG
CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTT6ACCC
CCCAGCAGGTG6TGGCCATCGCCAGCAATG6CGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGA
CGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCA
GGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCA
GCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTG
GCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGT
TGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGC
CAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTG
CTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAA
TGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAG
GCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCA
AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGG
CTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCG
CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC
CTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGAGGCCGGCGCTGGAGA
GCATTGTTGCCAGTTATCTGCTCTGATCCGCGGTTGGCGCGCTTGACCAACGAC
CACCTGTCGCTTGGCTGCCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAA
GGGATTGGGGATCTATCAGCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCAGCTGGAGGAG
AAGAAATCCGAGTTGAGGCAACAAGTGAAGTACGTCCCCACGAGTACATCGAGC
TGATCGAGATCGCCGGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGAT
GGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGCAAGCACCTGGCGGGCTCCAGG
AAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGT
GGACACCAAGGCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCGACGAA
ATGCAGAGGTACGTGGAAGGAGAACAGACAGGAACAAGCACATCAACCCCAACG
AGTGGTGGAAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTGTTCGTGTCC
GGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCATCACCAA
CTGCAACGGCGCGGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCTGATCGGCGGCGAGATGATC
AAGGCCGGCACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAG
ATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA

```

[0214] 表1: B2m TALE-核酸酶序列的描述

[0215] TALE-核酸酶切割人类PD-1基因

[0216] 除了涉及自体和非自体抗原识别的所述基因的失活之外,还可寻求其它基因工程,例如如WO2014/184744所述的编码免疫检查点的一个或几个基因的失活。

[0217] 在优选的实施方式中,对于参与自体/非自体识别的至少一种基因的失活,对编码PD-1的基因进行另外的失活。PD-1对应于人类程序死亡1(也称为PDCD1或CD279,参考序列登录号:人类基因为NM_005018)。这种PD-1抑制,优选通过TALEN介导的破坏具有使同种异体免疫细胞对通过PD-L1(也称为CD274或B7同源物1(B7-H1),并且具有用于人类基因的参考序列号NM_001267706)的自体或交互抑制具有抗性的目的。

[0218] 根据优选的实施方式,所述PD-1基因的失活通过使用如下表2所示的编码TALE-核酸酶的多核苷酸进行。

[0219]

靶标	靶标序列	半TALE- 核酶
PDCD1_T 01	TTCTCCCAGCCCTG CT cgtggtgaccgaagg GGACAACGCCACCTTCA (SEQ ID NO : 10)	PDCD1_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 11)
		PDCD1_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 12)
PDCD1_T 03	TACCTCTGTGGGGC CAT ctcctggcccccac GGCGCAGATCAAAGAGA (SEQ ID NO : 13)	PDCD1_T03-L TALEN (SEQ ID NO: 14)
		PDCD1_T03-R TALEN (SEQ ID NO: 15)

[0220] 表2:提供2对TALEN的多核苷酸序列用于2种不同的PDC1 (或PD-1) 基因靶标。

[0221] 根据本发明的一个实施方式,所述方法的步骤c)通过在所述免疫细胞中表达至少一种编码与膜结合的PD-L1配体的非内源性多核苷酸进行,以及所述同种异体细胞的进一步修饰通过PD-1基因的表达的失活进行。

[0222] 根据本发明的另一个实施方式,所述步骤c)通过在所述免疫细胞中表达至少一种对应于分泌的CTLA4免疫球蛋白的非内源性多核苷酸进行,以及所述同种异体细胞的进一步修饰通过编码PD-1的基因的表达的失活进行。

[0223] 根据本发明的优选实施方式,所述步骤c)通过步骤c)通过非内源性免疫抑制多肽PD-L1配体和CTLA-4免疫球蛋白二者在所述免疫细胞中的表达进行,并且所述同种异体免疫细胞的进一步修饰通过编码PD-1的基因的表达的失活进行。

[0224] 非内源性免疫抑制多肽的表达

[0225] 根据优选的实施方式,本发明方法的所述步骤c)通过在所述免疫细胞中表达至少一种编码与所述免疫细胞的膜结合的非内源性免疫抑制多肽的非内源性多核苷酸进行。

[0226] 根据一个实施方式,所述非内源性免疫抑制多肽以膜结合形式和/或以分泌形式存在。

[0227] “非内源性多肽”是指通常并非由供体免疫细胞表达的多肽,优选为由已经导入免疫细胞基因组的外源多核苷酸表达的多肽。例如,特此IL12不被认为是非内源性多肽,因为它是由来自供体免疫细胞的预先存在的基因表达的。

[0228] “非自然表达”是指编码所述多肽的多核苷酸序列最初不存在于免疫细胞(例如,CTLA4 Ig)的基因组中,或所述多核苷酸序列存在于基因组中,但多肽在天然免疫细胞(即,非工程化的)中以较低水平表达,通常为至少50%,优选为至少75%,更优选为至少100%且甚至更优选为200%,其低于在相同的实验或处理条件下,在工程化免疫细胞中观察到的表达水平。

[0229] “免疫抑制”是指所述非内源多肽的表达具有减轻患者宿主对供体免疫细胞的免疫应答的作用。

[0230] 根据本发明的优选方面,所述非内源性免疫抑制多肽选自PD-L1、CTLA-4-Ig、病毒

MHC同源物、NKG2D配体、病毒包膜免疫抑制结构域(ISU)或病毒FP蛋白。

[0231] 根据一个实施方式,该方法包括在免疫细胞中表达至少一种对应于非内源性分泌的免疫抑制多肽的非内源性多核苷酸的步骤c)。

[0232] 根据更优选的实施方式,与所述免疫细胞的膜结合的所述一种非内源性免疫抑制多肽是膜结合形式的PD-L1配体。

[0233] CTLA-4-Ig的表达

[0234] 根据一个实施方式,在所述同种异体免疫细胞中表达的非内源性免疫抑制多肽是CTLA-4蛋白的配体,优选为CTLA4免疫球蛋白。细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)也称为CD152,基因库登录号AF414120.1)。

[0235] 根据优选的实施方式,对应于在所述同种异体免疫细胞中表达的CTLA-4免疫球蛋白的多肽包含SEQ ID NO:16(CTLA-4a)或SEQ ID NO:17(CTLA4b),或者与SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17共有至少80%、优选90%、更优选95%的同一性。

[0236] 关于图1(无表达)的情况,图2(CTLA4-Ig的表达)示意性地表示了同种异体T细胞和宿主免疫细胞之间的相互作用。

[0237] 根据一个优选的实施方式,编码CTLA-4a Ig和CTLA-4b Ig的核酸分子分别与SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17共有至少80%、优选90%、且更优选95%的同一性,如下表3所示。

[0238]

构建体的名称	表达	SEQ ID NO:	多肽序列
pCL527068	CTLA4a 表达质粒	16	MGGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLASSRGIA5FVCEYAS PGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVN LTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSS DKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVS NKAALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH ALHNHYTQKSLSLSPGKGS
pCL527066	CTLA4b 表达质粒	17	MGGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLASSRGIA5FVCEYAS PGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVN LTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSS DKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVS NKAALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH ALHNHYTQKSLSLSPGKGS
pCL527069	PD-L1 表达质粒	18	MGRIFAVFIFMTYWHLNRAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLA ALIVYWEMEDKNIIQFVHGEECLKVQHSSYBQRARLLKDQLSLGNAALQITDV KLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRIIVDPVTSEHELTCQA EGYPKAEVIWTSDDHQVLSGKTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFR RLDPEENHTAEIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMM DVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEETGS

[0239] 表3:表达CLTA-4a、CTLA-4b和PD-L1的质粒构建体的多核苷酸序列。

[0240] 根据一个实施方式,将工程化的免疫细胞与抗-CD80或抗-CD86mAb的非内源性免疫抑制多肽一起孵育。

[0241] PD-L1的表达

[0242] PD-L1 (其它名称:CD274,程序化细胞死亡1配体;参考用于人多肽序列Q9NZQ7的UniProt) 编码290个氨基酸的I型跨膜蛋白,其由Ig V样结构域、Ig C样结构域、疏水跨膜结构域和30个氨基酸的胞质尾区组成。

[0243] 根据本发明的优选实施方式,在所述同种异体免疫细胞中表达的非内源性免疫抑制多肽是PD-L1的配体,更特别地为膜结合形式。

[0244] PD-L1配体的这种膜结合形式在本发明中是指以天然形式(野生型)或截短形式,例如通过除去细胞内结构域或用一种或多种突变(Wang S等人,2003,J Exp Med.2003;197(9):1083-1091)。根据本发明,PD1不被认为是PD-L1配体的膜结合形式。

[0245] 根据更优选的实施方式,编码待表达的膜结合形式的PD-L1配体的核酸分子是SEQ ID NO:18,或与SEQ ID NO:18共享至少80%、优选90%、且更优选95%的同一性(对应于PDL1-配体的野生型)。

[0246] 根据另一个实施方式,所述至少一种非内源性免疫抑制多肽是分泌形式的PD-L1配体。可通过将PD-L1的细胞外结构域融合到免疫球蛋白的Fc部分而产生这种重组分泌的PD-L1(或可溶性PD-L1)(Haile ST等人,2014,Cancer Immunol Res.2(7):610-615;Song MY等人,2015,Gut.64(2):260-71)。这种重组PD-L1中和PD-1并废除PD-1介导的T细胞抑制。

[0247] 关于图1(无表达)的情况,图3(膜结合的PD-L1的表达)示意性地表示了同种异体T细胞和宿主免疫细胞之间的相互作用。图3还表示当PD-1基因被KO破坏时的情况。

[0248] 根据先前实施方式的替代方案,在所述同种异体免疫细胞中表达的非内源性免疫抑制多肽是分泌形式的PD-L1配体。关于图1(无表达)的情况,图4(分泌的PD-L1配体的表达)示意性地表示了同种异体T细胞和宿主免疫细胞之间的相互作用。图4还表示当PD-1基因被KO破坏时的情况。

[0249] 根据一个优选的实施方式,核酸分子编码待表达的作为SEQ ID NO:18的膜结合的PD-L1,或与SEQ ID NO:18共享至少80%、优选90%、且更优选95%的同一性。

[0250] PD-L1配体与CTLA4 Ig的共表达

[0251] 本发明还涉及一种在宿主免疫细胞的存在下增加同种异体免疫细胞的持久性和/或植入的方法,其中步骤c)通过使所述宿主免疫细胞与非内源性免疫抑制多肽PD-L1配体和CTLA-4免疫球蛋白接触进行。

[0252] 根据优选的实施方式,方法的步骤c)通过非内源性免疫抑制多肽PD-L1配体和CTLA-4免疫球蛋白二者的免疫细胞中的表达进行。

[0253] 根据优选的实施方式,核酸分子编码膜结合形式的PD-L1配体,并且在所述同种异体免疫细胞中,在方法的步骤c)期间,编码待表达的CTLA-4免疫球蛋白,所述PD-L1配体和CTLA-4 Ig分别具有SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:16-17,或与SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:16-17共享至少80%、优选90%、且更优选95%的同一性。

[0254] ISU结构域的表达

[0255] 根据另一个实施方式,在所述同种异体免疫细胞中表达的非内源性免疫抑制多肽是病毒包膜免疫抑制结构域(ISU),其衍生自例如HIV-1、HIV-2、SIV、MoMuLV、HTLV-1、-II、MPMV、SRV-1、Syncitin 1或2、HERV-K或FELV。

[0256] 关于图1(无表达)的情况,图5(病毒ISU结构域的表达)示意性地表示了同种异体T细胞和宿主免疫细胞之间的相互作用。

[0257] 下表4示出可在本发明中表达的来自不同病毒的ISU结构域的变体。

SEQ ID #	位置														病毒
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
SEQ ID N°19-24	L	Q	A	R	I/V	L	A	V	E	R	Y	L	K/R/Q	D	HIV-1
SEQ ID N°25-30	L	Q	A	R	V	T	A	I	E	K	Y	L	K/A/Q	D/H	HIV-2
SEQ ID N° 31	L	Q	A	R	L	L	A	V	E	R	Y	L	K	D	SIV
SEQ ID N° 32	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	MoMuLV
SEQ ID N° 33	A	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	W	E	Q	HTLV-I, -II
SEQ ID N° 34	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	T	A	E	Q	MPMV, SRV-1
SEQ ID N° 35	L	Q	N	R	R	A	L	D	L	L	T	A	E	R	Syncitin 1
SEQ ID N° 36	L	Q	N	R	R	G	L	D	M	L	T	A	A	Q	Syncitin 2
SEQ ID N° 37	L	A	N	Q	I	N	D	L	R	Q	T	V	I	W	HERV-K
SEQ ID N° 38	L	Q	N	R	R	G	L	D	I	L	F	L	Q	E	FELV

[0259] 表4: 来自不同病毒的ISU结构域变体

[0260] 因此,在某些实施方式中,在所述同种异体免疫细胞中表达的非内源性免疫抑制多肽是SEQ ID NO.19-38的ISU结构域。

[0261] 病毒MHC同源物的表达

[0262] 根据另一个实施方式,在所述同种异体免疫细胞中表达的非内源性免疫抑制多肽是病毒MHC同源物,例如UL18。

[0263] 在一个实施方式中,所述非内源性免疫抑制多肽是包含SEQ ID NO.39的嵌合 $\beta 2m$ -UL18或与SEQ ID NO:39共享至少80%、优选90%、且更优选95%的同一性的MHC同源物。

[0264] 关于图6(无表达)的情况,图7(病毒MHC同源物的表达)示意性地表示了同种异体T细胞和宿主免疫细胞之间的相互作用。在两个图中,MHC I类通过破坏(KO) $\beta 2M$ 基因而失活。

[0265] NKG2D配体的表达

[0266] 一些病毒如巨细胞病毒具有获得性机制以避免NK细胞介导免疫监督并通过分泌能结合NKG2D配体并防止它们的表面表达的蛋白质干扰NKG2D途径(Welte, S.A.; Sinzger, C.; Lutz, S.Z.; Singh-Jasuja, H.; Sampaio, K.L.; Eknigk, U.; Rammensee, H.G.; Steinle, A. 2003 “通过人巨细胞病毒UL16糖蛋白选择性细胞内保留病毒诱导的NKG2D配体 (Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein)”。Eur.J.Immunol., 33, 194-203)。在肿瘤细胞中,通过分泌NKG2D配体如ULBP2、MICB或MICA,一些机制已演变为逃避NKG2D反应 (Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, 等人, (2003) 用于激活白血病中的免疫受体NKG2D的配体的功能表达和释放 (Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia)。Blood 102:1389-1396)。

[0267] 根据另一个实施方式,在所述同种异体免疫细胞中表达的非内源性免疫抑制多肽是NKG2D配体。关于图6(无表达)的情况,图8(可溶性NKG2D配体的表达)示意性地表示了同种异体T细胞和宿主免疫细胞之间的相互作用。在两个图中,MHC I类通过破坏(KO) $\beta 2M$ 基因而失活。

[0268] 下表5表示根据本发明表达的病毒MHC同源物 (UL18) 和一组NKG2D配体及其多肽序

列。

[0269]

	SEQ ID NO.	多肽序列
融合 B2M-UL18	39	MALPYTALLPLALLHAARPSRSVALAVLALLSL5GLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLN CYVSGFHP5DIEVDLKNGERIEKVENSDLSFSKDW5FYLLYYTEFTPEKDEYACRVNHVTL5 QPKIVKWDRODMGGGGSGGGSGGGSGGGSGMTMWCITLFLVWMLRVVGMHVLR GYTGIFDDTSHMTLTVVGIFDGGQHFFTYHVNSSDKASSRANGTISWMANVSAAYPTYLDGE RAKGDULFNQTEQNLELEJALGYRSQSVLTWTHECNTTENGSPVAGYEGFGWDGETLMELK DNLTLTWTPNYEISWLKQNKTYIDGKIKNISEGDTTIQRNLYKGNCTQW5SVYSGFQTPVTH PVVKGQVRNQNDNRAEAFCTSYGFFPGEINITFIHYGNKAPDDSEPQCNPPLPTFDGTFHQG CYVAIFCNQNYTCRVTHGNWTVETPISVTSPPDSSSGEVPDHTANKRYNTMTISSVLLALL CALLFAFLHYFTTLKQYLRNLAFARWRKVRSS
SP-MICAed	40	MGGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMEPHSLRYNLTVLSWDG5VQSGFLTEVHLDGQPFLRC DRQKCRAPQGGWAEDVLGNKTDWRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDKQEGHLSLQEI CEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETKEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFKEDAMKTKTH YHAMHADCLQELRRYLKSGVLRRTVPPMVNVRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWR QDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNQTYQTWVATRICQGEQRTCYMEHSGNHSTHPVPSG KVLVLQSHW
SP-MICBed	41	MGGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAEPHSLRYNLMVLSQDES5VQSGFLAEGHLDGQPFL RYDRQKRRAPQGGWAEDVLGAKTWDTEDELTENGQDLRRTLTHIKDQKGGHLSLQEI VCEIHEDSSTRGSRHFYYDGELFLSQNLETQESTVPQSSRAQTLAMNVTNFWKEDAMKTKT HYRAMQADCLQKLQRYLKSQVAIRRTVPPMVNVTCEVSEGNITVTCRASGFYPWNITLSWR QDGVSLSHNTQQWGDVLPDGNQTYQTWVATRIQGEQRTCYMEHSGNHGTHPVPSG KVLVLQSQRTD
SP-ULBP1ed	42	MGGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMGWVDTHCLCYDITPKSRPEPQWCEVQGLVDERP FLHYDCVNHKAKAFASLGKKVNVTKTWEEQTETLRD5VDFLKGQLLDIQENLIPIELTLQA RMSCEHEAHGHGRGSWQFLFNGQKFLFD5NNRKWTALHPGAKMKTEKWEKNRDVTMF FQKISLGDCKMWLEEFMLMYEQMLDPT
SP-ULBP2ed	43	MGGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMGRADPHSLCYDITVIPKFRPGPRWC5AVQGGVDEKT FLHYDCGNKTVTPV5PLGKKLNVTAWKAQNPVLREVVDILTEQLRDIQLENYTPKEPLTLQA RMSCEQKAEGHSSGSWQFSFDGQIFLLFDSEKRMWTTVHPGARKMKKEKWENDKVVAMS FHYFSMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAG
SP-ULBP3ed	44	MGGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMDAHSWYNFTIHLPRHGQWCEVQ5SQVDQKNFL SYDCGSDKVL5MGHLEEQLYATDAWGKQLEMLREV5GQRLRLELADTELEDFTP5GPLTLQV RMSCECEADGYIRGSWQFSFDGQIFLLFD5NNRKWTVHAGARRMKKEKWENDK5GLTTF5FK MVS5MRDCKSWLRDFLMHRKKRLEPT
SP-N2DL4ed	45	MGGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMHSCLCFNFTIKLSRPGQPWCEAQVFLNKNLFLQYNS DNNMVKPLGLLGGKKVYATSTWGELTQTLGEVGRDLRMLL5CDIKPQIKTSDPSTLQVEMFCQ REAERCTGASWQFATNGEKSLFDAMNMTWTVINHEASKIKETWKKDRGLEKYFRKLSKG DCDH5WLRFLGHWEAMPEPTVSPVNASDIHWSS5SLPD
SP-RET1Ged	46	MGGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMGLADPHSLCYDITVIPKFRPGPRWC5AVQGGVDEKTF LHYDCGSKTVTPV5PLGKKLNVTAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENYTPKEPLTLQAR MSCEQKAEGHSGGSWQFSFDGQIFLLFD5NNRMWTTVHPGARKMKKEKWENDKDMTMS FHYISM5GDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAGAPPTM5SGTAQPR
SP-RAETIled	47	MGGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMRRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWC5AVQGGVDEKT FLHYDCGNKTVTPV5PLGKKLNVTMAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENYTPKEPLTLQ ARMSCEQKAEGHSSGSWQFSIDGQIFLLFDSEKRMWTTVHPGARKMKKEKWENDKDVAM SFHYISM5GDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAG

[0270] 表5:病毒MHC同源物(UL18)和一组NKG2D配体的多肽序列。

[0271] 因此,在某些实施方式中,在工程化免疫细胞中表达的所述非内源性免疫抑制多肽包含或组成于SEQ ID NO.40-47的NKG2D配体或分别与SEQ ID NO.40-47共有至少80%、优选90%、更优选95%的同一性。

[0272] FP多肽的表达

[0273] 根据另一个实施方式,在所述同种异体免疫细胞中表达的非内源性免疫抑制多肽是FP多肽如gp41。下表6表示来自天然和人工起源的几种FP多肽。

	位置									来源
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
[0274] SEQ ID N°48	G	A	L	F	L	G	F	L	G	HIV-1 gp41
SEQ ID N°49	A	G	F	G	L	L	L	G	F	合成的
SEQ ID N°50	A	G	L	F	L	G	F	L	G	合成的

[0275] 表6:来自天然和人工起源的FP多肽的氨基酸序列。

[0276] 因此,在某些实施方式中,在工程化免疫细胞中表达的所述非内源性免疫抑制多肽包含或组成于SEQ ID NO.48-50的FP多肽或分别与SEQ ID NO.48-50共有至少80%、优选90%、更优选95%的同一性。

[0277] 非同种异体反应性和免疫抑制性抗性T细胞

[0278] 基因失活与基因表达的组合

[0279] 本发明人在此提出了一种增加持久性和/或植入以应用于同种异体免疫细胞的方法,其中可进行一系列基因修饰。在这些之中,包括参与自体/非自体识别的至少一种失活基因和非内源性免疫抑制多肽的至少一种表达的不同组合。

[0280] 根据优选的实施方式,基因修饰通过与PD-L1配体和/或CTLA-4免疫球蛋白和/或病毒包膜免疫抑制结构域(ISU)和/或病毒FP蛋白和/或NKG2G配体病毒MHC同源物如UL18的所述同种异体免疫细胞中的表达结合的B2M和/或TCR基因的失活来进行。

[0281] 在本发明的范围内还包括多核苷酸、编码根据本发明的上述稀有切割核酸内切酶的载体。

[0282] 在本发明的范围内还包括易于通过所述用于工程化细胞的方法获得的分离的细胞或细胞系,特别是同种异体免疫细胞如T细胞,其中至少一个编码参与自体和非自体抗原识别失活的多肽的内源基因失活,并且使至少一种非内源性免疫抑制多肽与所述所有同种异体免疫细胞接触。

[0283] 在一个特定的方面中,本发明涉及一种工程化免疫细胞如T细胞,特别是免疫治疗的方法。

[0284] 在特定的实施方式中,该方法包括:

[0285] i) 提供同种异体细胞;

[0286] ii) 通过失活至少一种编码涉及自体和非自体抗原识别的多肽的内源基因来修饰所述细胞;

[0287] 和

[0288] iii) 使所述免疫细胞与至少一种非内源性免疫抑制多肽接触。

[0289] 在另一个特定的方面中,本发明涉及一种工程化免疫细胞如T细胞,特别是免疫治疗的方法。

[0290] 在特定的实施方式中,该方法包括:

[0291] i) 提供同种异体细胞;

[0292] ii) 通过失活至少一种编码涉及自体和非自体抗原识别的多肽的内源基因来修饰所述细胞;

[0293] 和

[0294] iii) 在所述免疫细胞中表达至少一种非内源性免疫抑制多肽。

[0295] T细胞介导的免疫包括多个顺序步骤,其包括抗原特异性细胞的克隆选择,它们在次级淋巴组织中的激活和增殖,它们向抗原和炎症部位的转运,直接效应物功能的执行和提供帮助(通过细胞因子和膜配体)用于大量效应物免疫细胞。这些步骤中的每一个都通过平衡刺激和抑制信号来调节,其微调反应。

[0296] 例如,CTLA-4是在某些CD4和CD8T细胞上表达的细胞表面蛋白;当在抗原呈递细胞上通过它的配体(B7-1和B7-2)接合时,T细胞激活和效应物功能被抑制。因此,本发明涉及一种工程化T细胞的方法,特别地用于免疫治疗,其包括通过使参与免疫检查点,特别是PD1和/或CTLA-4中的至少一种蛋白质失活来基因修饰T细胞。

[0297] 在另一个实施方式中,该方法的基因修饰步骤依赖多于两种基因的失活。基因修饰优选是离体操作的。

[0298] TALE-核酸酶切割人TCR基因(TRAC和TRBC)

[0299] 人类基因组包含两个功能性T细胞受体 β 链(TRBC1和TRBC2)。在发育 α/β T淋巴细胞期间,在每个细胞中选择这两条恒定链之一,以将其剪接到TCR- β 的可变区,并形成功能性全长 β 链。在TRBC1和TRBC2之间保守的序列中选择2个TRBC靶标,使得相应的TALE-核酸酶同时切割TRBC1和TRBC2二者。

[0300] 如WO W02013176915所教导的,虽然人类TCR基因可能在同种异体免疫细胞中被破坏,但本发明包括其中这样的失活与任何上述自体/非自体识别基因的失活以及前述至少一种非内源性免疫抑制多肽的异位表达相结合的这种失活的情况。

[0301] 下表7显示用于5个TRAC和2个TRBC靶标的核苷酸序列,以及一些它们相应的左和右TALEN。另外的序列可在申请W02014/184741和W02014/184744中获悉。

[0302]

靶标	靶标序列	半TALE-核酸酶
TRAC_T00	TGATCCTCTTGTCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg CCGTGTACCAGCTGAGAGA (SEQ ID NO 51)	TRAC_T00-L TALEN (SEQ ID NO: 52)
		TRAC_T00-R TALEN (SEQ ID NO: 53)
TRAC_T01	TTGTCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg CCGTGTACCAGCTGAGA (SEQ ID NO: 54)	TRAC_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 55)
		TRAC_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 56)
TRAC_T02	TTTAGAAAGTTCCTGTG atgtcaagctggtcg AGAAAAGCTTTGAAACA (SEQ ID NO: 57)	
TRAC_T03	TCCAGTGACAAGTCTGT ctgcctattcaccga TTTTGATTCTCAAACAA (SEQ ID NO: 58)	
TRAC_T04	TATATCACAGACAAAAC tgtgctagacatgag GTCTATGGACTTCAAGA (SEQ ID NO: 59)	
TRAC_T05	TGAGGTCTATGGACTTC aagagcaacagtgc GTGGCCTGGAGCAACAA (SEQ ID NO: 60)	
TRBC_T01	TGTGTTGAGCCATCAG aagcagagatctccc ACACCCAAAAGGCCACA (SEQ ID NO: 61)	TRBC_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 62)
		TRBC_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 63)
TRBC_T02	TTCCACCCGAGGTCGC tgtgtttgagccatca GAAGCAGAGATCTCCCA (SEQ ID NO: 64)	TRBC_T02-L TALEN (SEQ ID NO: 65)
		TRBC_T02-R TALEN (SEQ ID NO: 66)

[0303] 表7: TRAC和TRBC TALE-核酸酶和人类相应基因中的TALE-核酸酶靶位点的序列的描述。

[0304] 单链CAR

[0305] 根据本发明的一个方面,该方法包括向所述T细胞中引入包含编码针对在恶性或感染细胞表面表达的至少一种抗原的嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的外源核酸分子的步骤。它们可根据单链或多链体系结构进行设计。

[0306] 在一个实施方式中,嵌合抗原受体(CAR)是单链CAR。

[0307] 在优选的实施方式中,所述细胞外配体结合结构域是scFv。其它与scFv结合的结构域也可用于淋巴细胞的预定义靶向,例如骆驼单结构域抗体片段或受体配体如血管内皮生长因子多肽、整合素结合肽、调节蛋白或IL-13突变蛋白、抗体结合结构域、抗体高变环或CDR作为非限制性实例。

[0308] 根据本发明的scFv的优选实例,VH和VL链作为抗原靶序列与SEQ ID NO 67 (CD19 抗原)、SEQ ID NO 68 (CD38抗原)、SEQ ID NO 69 (CD123抗原)、SEQ ID NO 70 (CS1抗原)、SEQ ID NO 71 (BCMA抗原)、SEQ ID NO 72 (FLT-3抗原)、SEQ ID NO 73 (CD33抗原)、SEQ ID NO 74 (CD70抗原)、SEQ ID NO 75 (EGFR-3v抗原)和SEQ ID NO 76 (WT1抗原)具有超过80%的同一性、优选超过90%、且更优选超过95%。要靶向的肿瘤细胞的表面抗原的其它实例是CLL1、Hsp70、CD22、MUC16、PRAME、TSPAN10、ROR1、GD3、CT83和间皮素。

[0309] 根据一个实施方式,本发明涉及如上所述的方法,其中步骤c) 步骤c) 通过非内源性免疫抑制多肽PD-L1配体和/或CTLA-4免疫球蛋白在所述同种异体免疫细胞中的表达进行,所述同种异体免疫细胞通过表达抗-CD123嵌合抗原受体被进一步修饰。

[0310] 根据优选的实施方式,所述抗-CD123 CAR/PD-L1配体/CTLA-4 Ig表达的同种异体免疫细胞在方法的步骤c) 期间被进一步修饰以进行PD-1基因表达的失活。

[0311] a) 的所述多肽还可包含所述细胞外配体结合结构域和所述跨膜结构域之间的茎区。本文所用的术语“茎区”通常是指起作用以连接跨膜结构域与细胞外配体结合结构域的任何寡肽或多肽。特别地,茎区用于为细胞外配体结合结构域提供更多的柔性和可接近性。茎区可包含多达300个氨基酸,优选为10至100个氨基酸,且最优选为25至50个氨基酸。茎区可衍生自全部或部分天然存在的分子,例如来自CD8、CD4或CD28的全部或部分胞外区,或来自全部或部分抗体恒定区。或者,茎区可以是对应于天然存在的茎序列的合成序列,或者可以是完全合成的茎序列。

[0312] 所述多肽还可包含至少一个信号转导结构域。在最优选的实施方式中,所述信号转导结构域选自CD28、OX40、ICOS、CD137和CD8。

[0313] FcεRIα、β和/或γ链片段的所述C末端胞质尾区还包含TNFR相关因子2 (TRAF2) 结合基序。在最优选的实施方式中,FcεRIα、β和/或γ链的所述C-末端胞质尾区由共刺激TNFR成员家族的胞浆内尾区代替。共刺激TNFR家族成员的胞质尾区含有由主要保守基序(P/S/A) X (Q/E) E 或次要基序(PXQXXD) 组成的TRAF2结合基序,其中X为任何氨基酸。响应于受体三聚,TRAF蛋白被募集到许多TNFR的细胞内尾区。

[0314] FcεRIα、β和/或γ链的所述胞质内结构域被TCRζ链(也称为CD3ζ)的胞质内结构域代替。在另一个优选的实施方式中,FcεRIα、β和/或γ链的所述胞质内结构域包含至少一种另外的免疫受体酪氨酸基激活基序(ITAM)。ITAM是用作syk/zap70类酪氨酸激酶的结合位点的各种受体的胞质内尾区中发现的完整信号基序。本发明中使用的ITAM的实例包括衍生自TCRζ、FCRγ、FCRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。

[0315] 例如,单链CAR的实例由SEQ ID NO:77描述。

[0316] 在优选的实施方式中,如上所述的CAR是选自由抗-CD123单链CAR、抗-CS1单链CAR、抗-CD38单链CAR、抗-CLL1单链CAR、抗-Hsp70单链CAR、抗-EGFRvIII单链CAR、抗-BCMA单链CAR、抗-CD33单链CAR、抗-FLT3单链CAR、抗-CD70单链CAR、抗-WT1单链CAR、抗-MUC16单链CAR、抗-PRAME单链CAR、抗-TSPAN10单链CAR、抗-ROR1单链CAR、抗-GD3单链CAR、抗-CT83单链CAR和间皮素单链CAR组成的组的单链CAR;

[0317] -在免疫细胞中表达的所述CAR具有选自V1、V3或V5的多肽结构之一,如图24所示。

[0318] -所述结构包括:

[0319] o包含来自分别选自抗-CD123mAb、抗-CS1mAb、抗-CD38mAb、抗-CLL1mAb、抗-

Hsp70mAb、抗-EGFRvIII mAb、抗-BCMA mAb、抗-CD33mAb、抗-FLT3mAb、抗-CD70mAb、抗-WT1mAb、抗-MUC16mAb、抗-PRAME mAb、抗-TSPAN10mAb、抗-ROR1mAb、抗-GD3mAb、抗-CT83mAb和抗-间皮素mAb的单克隆抗体的VH和VL的细胞外配体结合结构域；

[0320] o 选自由CD8 α 、FcERIII γ 和IgG1组成的组的铰链；

[0321] o CD8 α 跨膜结构域；

[0322] o 包括CD3 ζ 信号结构域的胞质结构域；和

[0323] o 4-1BB共刺激结构域。

[0324] 在CAR体系结构中选择的所有其它成分包括跨膜结构域(即,CD8 α TM)、共刺激结构域(即,4-1BB)、铰链(CD8 α 、FcERIII γ 、IgG1)、胞质信号结构域(ITAM CD3 ζ)可以是已在上述W02015140268和W02015121454申请中描述的那些。

[0325] 作为实例,VH和VL可以是针对抗-CD123在申请W02015140268、针对抗-CS1和抗-CD38在W02015121454中描述的那些。

[0326] 多链嵌合抗原受体(CAR)

[0327] 在另一个实施方式中,本发明涉及一种特别适于生产和扩增本发明的诸如T细胞的工程化免疫细胞的多链嵌合抗原受体(CAR)。所述多链CAR包括以下成分中的至少两个：

[0328] a) 一种多肽,其包含Fc多肽,Fc ϵ RI α 链的跨膜结构域和细胞外配体结合结构域,

[0329] b) 一种多肽,其包含一部分的N-和C-末端胞质尾区和Fc胞质尾Fc ϵ RI β 链的跨膜结构域和/或

[0330] c) 两种多肽,其包含胞质内尾区的一部分和Fc多肽,Fc ϵ RI γ 链的跨膜结构域的每一个,由此不同的多肽自发地多聚在一起以形成二聚体、三聚体或四聚体CAR。

[0331] 本发明的CAR也可以是如前所述的“多链CAR”,这意味着细胞外结合结构域和信号结构域优选位于不同的多肽链上,而共刺激结构域可位于相同或第三多肽上。通过用细胞外配体结合域如scFv替代Fc ϵ RI α 链的高亲和力IgE结合结构域,可从Fc ϵ RI (Ravetch等人,1989)得到这样的多链CAR,而Fc ϵ RI β 和/或 γ 链的N和/或C末端尾区被分别融合到信号转导结构域和共刺激结构域。细胞外配体结合结构域具有将T细胞特异性重定向到细胞靶标的作用,而信号转导结构域激活或降低免疫细胞应答。不同的多肽衍生自Fc ϵ RI α 、 β 和 γ 多肽的事实是位于近膜位置的跨膜多肽,为CAR提供更柔性的体系结构,提高针对靶向分子的特异性并降低免疫细胞的背景激活。更具体地,多链体系结构在W02014039523中公开。

[0332] 在另一个实施方式中,如前所述在免疫细胞中表达的所述CAR选自由抗-CD123多链CAR、抗-CS1多链CAR、抗-CD38多链CAR、抗-CLL1多链CAR或抗-Hsp70多链CAR组成的组。

[0333] 在另一个优选的实施方式中,上述CAR是选自由抗-CD123多链CAR、抗-CS1多链CAR、抗-CD38多链CAR、抗-CLL1多链CAR、抗-Hsp70多链CAR、抗-EGFRvIII多链CAR、抗-BCMA多链CAR、抗-CD33多链CAR、抗-FLT3多链CAR、抗-CD70多链CAR、抗-WT1多链CAR、抗-MUC16多链CAR、抗-PRAME多链CAR、抗-TSPAN10多链CAR、抗-ROR1多链CAR、抗-GD3多链CAR、抗-CT83多链CAR和间皮素多链CAR组成的组的多链CAR。

[0334] 这种多链CAR体系结构在W02014/039523中公开,特别是在图2至4以及第14至21页中,其通过引用并入本文。

[0335] 本文使用的术语“一部分”是指分子的任何子集,即较短的肽。或者,可通过编码多肽的DNA中的突变来制备多肽的氨基酸序列功能变体。这种功能变体包括例如,氨基酸序列

内的残基的缺失或插入或取代。也可进行缺失、插入和取代的任何组合以得到最终构建体，条件是最终构建体具有期望的活性，特别是显示特异性抗-靶细胞免疫活性。

[0336] 在本发明的范围内还包括多核苷酸、编码根据本发明的上述多链CAR的载体。

[0337] 在特定的实施方式中，本发明涉及制备用于免疫治疗的免疫细胞如T细胞的方法，其包括将构成所述多链CAR并扩增所述细胞的不同多肽导入所述T细胞中。

[0338] 本发明还涉及易于通过所述工程化细胞的方法获得的分离的细胞或细胞系。特别地，所述分离的细胞包含编码构成所述多链CAR的多肽的外源多核苷酸序列。

[0339] 双特异性抗体

[0340] 根据另一个实施方式，可用双特异性抗体进一步暴露通过如前所述的不同方法获得的工程化免疫细胞如T细胞。可将所述T细胞在给予患者之前离体暴露于双特异性抗体，或者在给予患者之后在体内暴露于双特异性抗体。所述双特异性抗体包含具有不同抗原性质的两个可变区，其允许使工程化细胞接近靶抗原。作为非限制性实例，所述双特异性抗体针对肿瘤标志物和淋巴细胞抗原如CD3，并且具有重定向并激活任何对抗肿瘤的循环T细胞的潜力。

[0341] 递送方法

[0342] 上述不同的方法包括将任选具有DNA末端加工酶或外源核酸的pTa或其功能变体、稀有切割核酸内切酶、TALE-核酸酶、CAR或多链CAR引入到细胞中。

[0343] 作为非限制性实例，可引入任选具有DNA末端加工酶或外源核酸的稀有切割核酸内切酶、TALE-核酸酶、编码非内源性免疫抑制多肽的基因、CAR或多链CAR作为由一种编码的转基因或作为不同的质粒载体。不同的转基因可被包括在一个载体中，其包含编码核糖体跳跃序列的核酸序列，例如编码2A肽的序列。在小核糖核酸病毒的口蹄疫病毒亚群中鉴定的2A肽导致从一个密码子核糖体“跳跃”到下一个密码子，而不在由密码子编码的两个氨基酸之间形成肽键(参见Donnelly等人，J.of General Virology 82:1013-1025(2001)；Donnelly等人，J.of Gen.Virology 78:13-21(1997)；Doronina等人，Mol.And.Cell.Biology 28(13):4227-4239(2008)；Atkins等人，RNA 13:803-810(2007))。“密码子”是指由核糖体转译成一个氨基酸残基的mRNA(或DNA分子的有义链)上的三个核苷酸。因此，当多肽被框架中的2A寡肽序列分离时，两个多肽可由mRNA内的单个邻接开放读码框架合成。这种核糖体跳跃机制是本领域公知的，并且已知被几种载体使用用于表达由单个信使RNA编码的几种蛋白质。作为非限制性实例，在本发明中，已使用2A肽在细胞中表达稀有切割核酸内切酶和DNA末端加工酶或多链CAR的不同多肽。

[0344] 所述质粒载体可含有选择标志物，其提供接收所述载体的细胞的鉴定和/或选择。

[0345] 由于将编码所述多肽的多核苷酸引入到细胞中，可在细胞中原位合成多肽。或者，所述多肽可在细胞外产生，然后被引入其中。将多核苷酸构建体引入到动物细胞中的方法是本领域已知的，并且包括作为非限制性实例的其中将多核苷酸构建体整合到细胞的基因组中的稳定转化方法，其中未将多核苷酸构建体整合到细胞的基因组中的瞬态转化方法和病毒介导的方法。可通过例如重组病毒载体(例如，逆转录病毒、腺病毒)、脂质体等将所述多核苷酸引入到细胞中。例如，瞬态转化方法包括例如显微注射、电穿孔或粒子轰击。鉴于在细胞中表达，所述多核苷酸可包括在载体中，更特别地包括在质粒或病毒中。

[0346] -电穿孔

[0347] 编码根据本发明的多肽的多核苷酸可以是直接引入到细胞中的mRNA,例如通过电穿孔。本发明人确定了用于T细胞中的mRNA电穿孔的最佳条件。

[0348] 发明人使用细胞波(cytoPulse)技术,其允许通过使用脉冲电场来瞬时渗透活细胞以将材料输送到细胞中。该技术基于PulseAgile(Collectis属性)电穿孔波形的使用,允许精确控制脉冲持续时间、强度以及脉冲之间的间隔(美国专利6,010,613和国际PCT申请W02004083379)。所有这些参数都可进行修改,以达到用于高转染效率的最佳条件,并且死亡率最低。基本上,第一高电场脉冲允许孔形成,而随后的较低电场脉冲允许移动多核苷酸进入细胞中。在本发明的一个方面,发明人描述了导致T细胞中的mRNA达到>95%的转染效率的步骤,以及使用电穿孔方案在T细胞中瞬态表达不同种类的蛋白质。特别地,本发明涉及一种转化T细胞的方法,其包括使所述T细胞与RNA接触并向T细胞应用敏捷脉冲序列,其由下述组成:

[0349] (a) 电压范围为2250至3000V/cm、脉冲宽度为0.1ms、且在步骤(a)和(b)的电脉冲之间的脉冲间隔为0.2至10ms的一个电脉冲;

[0350] (b) 电压范围为2250至3000V、脉冲宽度为100ms、且在步骤(b)的电脉冲和步骤(c)的第一电脉冲之间的脉冲间隔为100ms的一个电脉冲;和

[0351] (c) 电压为325V、脉冲宽度为0.2ms、且4个电脉冲中的每一个之间的脉冲间隔为2ms的4个电脉冲。

[0352] 转化T细胞的方法可包括使所述T细胞与RNA接触并向T细胞应用敏捷脉冲序列,其由下述组成:

[0353] (a) 电压为2250、2300、2350、2400、2450、2500、2550、2400、2450、2500、2600、2700、2800、2900或3000V/cm、脉冲宽度为0.1ms且在步骤(a)和(b)的电脉冲之间的脉冲间隔为0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10ms的一个电脉冲;

[0354] (b) 电压范围为2250、2250、2300、2350、2400、2450、2500、2550、2400、2450、2500、2600、2700、2800、2900或3000V、脉冲宽度为100ms、且在步骤(b)的电脉冲和步骤(c)的第一电脉冲之间的脉冲间隔为100ms的一个电脉冲;和

[0355] (c) 电压为325V、脉冲宽度为0.2ms、且4个电脉冲中的每一个之间的脉冲间隔为2ms的4个电脉冲。

[0356] 在本申请中公开了包括在上述值范围内的任何值。电穿孔培养基可以是本领域已知的任何合适的培养基。优选地,电穿孔培养基具有在0.01至1.0毫西门子范围内的电导率。

[0357] 作为非限制性实例,所述RNA编码稀有切割内切核糖核酸酶、稀有切割核酸内切酶的一种单体如半-TALE-核酸酶、嵌合抗原受体、多链嵌合抗原受体的至少一种成分、外源核酸、一种另外的催化结构域。

[0358] 免疫细胞的激活和扩增

[0359] 无论在诸如T细胞的免疫细胞的基因修饰之前或之后,通常可使用例如在美国专利6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;和美国专利申请公开号20060121005中描述的方法激活和扩增免疫细胞。可在体外或体内扩增T细胞。

[0360] 通常,通过与在其上附着刺激CD3TCR复合物相关信号的试剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体的表面接触而扩增本发明的T细胞。

[0361] 特别地,可在体外刺激诸如T细胞群的免疫细胞,例如通过与抗-CD3抗体或其抗原结合片段或固定在表面上的抗-CD2抗体接触或通过结合钙离子载体的蛋白激酶C激活剂(例如,苔藓抑素)接触。为了共同刺激T细胞表面上的辅助分子,使用结合辅助分子的配体。例如,在适于刺激免疫细胞增殖的条件下,可将免疫细胞群与抗-CD3抗体和抗-CD28抗体接触。刺激CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞、抗-CD3抗体和抗-CD28抗体的增殖。例如,提供各个信号的试剂可在溶液中或耦合到表面。如本领域普通技术人员可容易地理解的,颗粒与细胞的比例可取决于相对于靶细胞的粒度。在本发明的另外的实施方式中,将诸如T细胞的细胞与试剂包被的珠粒组合,随后分离珠粒和细胞,然后培养细胞。在替代实施方式中,在培养之前,试剂包被的珠粒和细胞不被分离但在一起培养。可通过使抗-CD3和抗-CD28附接的顺磁珠(3×28珠粒)与T细胞接触来连接细胞表面蛋白。在一个实施方式中,将细胞(例如,4至10个T细胞)和珠粒(例如,1:1的比例的DYNABEADS[®]M-450 CD3/CD28 T顺磁珠粒)在缓冲液,优选为PBS(不含二价阳离子如钙和镁)中组合。同样地,本领域普通技术人员可容易地理解,可使用任何细胞浓度。可将混合物培养几小时(约3小时)至约14天,或在其之间的任何小时整数值。在另一个实施方式中,可将混合物培养21天。适用于T细胞培养的条件包括可能含有增殖和生存力所必需的因子的合适培养基(例如,最低必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 5, (Lonza)),包括血清(例如,胎牛或人类血清)、白细胞介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、-10、-2、IL-15、TGF β 和TNF-或本领域技术人员已知的用于细胞生长的任何其它添加剂。用于细胞生长的其它添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉和还原剂如N-乙酰基-半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可包括RPMI 1640、A1M-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 1和X-Vivo 20,优化剂,添加氨基酸、丙酮酸钠和维生素,无血清或补充有适量的血清(或血浆)或一组定义的激素,和/或一定量的足以使T细胞生长和扩增的细胞因子。抗生素例如青霉素和链霉素仅包括在实验培养物中,而不是在要输注到受试者的细胞的培养物中。靶细胞保持在支持生长所必需的条件,例如适当的温度(例如,37,长)和气氛(例如,空气加5%的CO₂)。已暴露于不同刺激时间的免疫细胞如T细胞可能表现出不同的特征。

[0362] 在另一个特定的实施方式中,可通过与组织或细胞共培养来扩增所述细胞。还可在体内扩增所述细胞,例如在将所述细胞施用于受试者之后在受试者的血液中扩增。

[0363] 工程化免疫细胞及其与宿主免疫细胞的相互作用

[0364] 在本发明的范围内还包括根据前述方法中的任一种获得的分离的免疫细胞。根据本发明的所述免疫细胞可衍生自造血干细胞。干细胞可是成体干细胞、胚胎干细胞,更特别为非人类干细胞、脐带血干细胞、祖细胞、骨髓干细胞、诱导性多能干细胞、全能干细胞或造血干细胞。

[0365] 根据一个实施方式,所述免疫细胞是造血细胞,且更优选为原代细胞。

[0366] 根据优选的实施方式,工程化同种异体免疫细胞在接触至少一种非内源性免疫抑制多肽之后,不特异性诱导T调节细胞的抑制。

[0367] 根据更优选的实施方式,工程化同种异体免疫细胞在接触至少一种非内源性免疫抑制多肽之后,特异性诱导CD8⁺ T细胞的抑制。

[0368] 在本发明的细胞的扩增和基因修饰之前,可通过各种非限制性方法从受试者获得细胞来源。免疫细胞如T细胞可从许多非限制性来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。可使用本领域技术人员可获得和已知的任何数量的免疫细胞系。在另一个实施方式中,所述细胞可衍生自健康供体、诊断患有癌症的患者或诊断患有感染的患者。所述细胞是呈现不同表型特征的混合细胞群的一部分。在本发明的范围内还包括根据前述方法从转化的免疫细胞如T细胞获得的细胞系。对免疫抑制治疗有抗性且易于通过前述方法获得的修饰细胞包括在本发明的范围内。

[0369] 在另一个实施方式中,根据本发明的所述分离的细胞包含编码参与自体和非自体抗原识别的多肽的一种失活的内源基因,例如TCR、MHC类I类组分、b-2微球蛋白(B2M)、TAP1和巨大多功能蛋白酶2。此外,所述工程化同种异体免疫细胞通过表达至少一种分泌的非内源性免疫抑制多肽或通过用至少一种非内源性免疫抑制多肽孵育所述免疫细胞而与至少一种非内源性免疫抑制多肽接触。

[0370] 治疗应用

[0371] 在另一个实施方式中,如前所述通过不同方法或衍生自所述分离的细胞的细胞系获得的分离的细胞可用作药物。在另一个实施方式中,所述药物可用于治疗有需要的患者中的癌症或感染。在另一个实施方式中,根据本发明的所述分离的细胞或衍生自所述分离的细胞的细胞系可用于制备用于治疗有需要的患者中的癌症或病毒感染的药物。

[0372] 在另一方面中,本发明依赖治疗有需要的方法,所述方法包括以下步骤中的至少一个:

[0373] (a) 提供免疫细胞,例如可通过前述方法中的任一种获得的T细胞;

[0374] (b) 将所述转化的免疫细胞如T细胞给予所述患者。

[0375] 在一个实施方式中,本发明的所述免疫细胞如T细胞可经受强壮的体内免疫细胞如T细胞扩增,并且可持续延长的时间。

[0376] 所述治疗可以是改善、治愈或预防。它可能是自体免疫治疗的一部分或同种异体免疫治疗的一部分。自体意思是用于治疗患者的细胞、细胞系或细胞群源自所述患者或人类白细胞抗原(HLA)相容的供体。同种异体意思是用于治疗患者的细胞或细胞群不是源自所述患者,而是源自供体。

[0377] 本发明特别适用于同种异体免疫治疗,只要它能够将通常从供体获得的免疫细胞如T细胞转化为非同种异体反应性细胞。这可在标准方案下完成,并可根据需要可多次再现。可将所得的修饰的免疫细胞合并并施用于一个或几个患者,可作为“现成”治疗产品获得。

[0378] 可与所公开的方法一起使用的细胞在前面的部分中描述。所述治疗可用于治疗诊断患有癌症、病毒感染、自体免疫疾病或移植物抗宿主病(GvHD)的患者。可治疗的癌症包括没有血管化或尚未基本上血管化的肿瘤以及血管化的肿瘤。癌症可包括非实体瘤(例如,血液肿瘤,例如白血病和淋巴瘤),或者可包括实体瘤。用本发明的CAR治疗的癌症的类型包括但不限于癌、胚细胞瘤和肉瘤,以及某些白血病或淋巴恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤以及恶性肿瘤如肉瘤、癌和黑素瘤。还包括成人肿瘤/癌症和儿科肿瘤/癌症。

[0379] 它可以是联合一种或多种抗癌疗法的治疗,所述抗癌疗法选自抗体治疗、化疗、细胞因子治疗、树突细胞治疗、基因治疗、激素治疗、激光治疗和放射治疗组中的组。

[0380] 根据本发明的优选实施方式,可将所述治疗施用于进行免疫抑制治疗的患者。实际上,本发明优选地依赖细胞或细胞群,其由于编码这种免疫抑制剂的受体的基因的失活而使其对至少一种免疫抑制剂具有抗性。在这方面,免疫抑制治疗应有助于在患者体内选择和扩增根据本发明的T细胞。

[0381] 根据本发明的细胞或细胞群的施用可以任何方便的方式进行,包括通过雾化吸入、注射、摄取、输血、植入或移植。本文所述的组合物可通过静脉内或淋巴管内注射或腹膜内皮下、皮内、瘤内、结内、髓内、肌内给予患者。在一个实施方式中,优选通过静脉注射给予本发明的细胞组合物。

[0382] 细胞或细胞群的施用可包括施用 10^4 – 10^9 个细胞/千克体重,优选为 10^5 至 10^6 个细胞/千克体重,包括在该范围内的所有细胞数的整数值。可以一种或多种剂量施用细胞或细胞群。在另一个实施方式中,以单一剂量形式给予所述有效量的细胞。在另一个实施方式中,在一段时间内以多于一种剂量施用所述有效量的细胞。施用时间在管理医师的判断之内,并且取决于患者的临床状况。可从任何来源获得细胞或细胞群,例如血库或供者。虽然个体需要变化,但确定用于特定疾病或病况的给定细胞类型的有效量的最佳范围在本领域的技术范围内。有效量是指提供治疗或预防益处的量。施用的剂量取决于受体的年龄、健康和体重,同期治疗(如有的话)的种类、治疗频率和所需效果的性质。

[0383] 在另一个实施方式中,肠胃外施用所述有效量的细胞或包含这些细胞的组合物。所述施用可以是静脉施用。所述施用可通过在肿瘤内注射直接进行。

[0384] 在本发明的某些实施方式中,可结合任何数量的相关治疗方式(例如,之前、同时或之后)将细胞施用于患者,其包括但不限于用诸如抗病毒治疗、西多福韦和白介素-2、阿糖胞苷(也称为ARA-C)的治疗或针对MS患者的那他利珠单抗(natalizumab)治疗或针对银屑病患者的依那利珠单抗(efalizumab)治疗或针对PML患者的其它治疗。在另外的实施方式中,可联合化学疗法、辐射、免疫抑制剂如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506抗体或其它免疫烧蚀剂如CAMPATH、抗-CD3抗体或其它抗体疗法,细胞毒素、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228、细胞因子和辐照使用本发明的T细胞。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙调磷酸酶(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导(雷帕霉素)重要的p70S6激酶(Liu等人,Cell 66:807–815,11;Henderson等人,Immun.73:316–321,1991;Bierer等人,Citr. Opin. mm n.5:763–773,93)。在另一个实施方式中,联合骨髓移植(例如,之前、同时或之后)、使用化疗剂如氟达拉滨、体外放射线治疗(XRT)、环磷酰胺或抗体如OKT3或阿仑单抗(CAMPATH)的T细胞消除治疗将本发明的细胞组合物施用于患者。在另一个实施方式中,在B细胞消除治疗后施用本发明的细胞组合物,例如与CD20反应的药剂如利妥昔单抗。例如,在一个实施方式中,受试者可通过高剂量化疗,随后进行外周血干细胞移植进行标准治疗。在某些实施方式中,在移植后,受试者接受本发明的扩增的免疫细胞的输注。在另外的实施方式中,在手术之前或之后施用扩增的细胞。通过本文所述的任何一种方法获得的所述修饰的细胞可用于本发明的特定方面,用于治疗有需要的患者的宿主抗移植物(HvG)排斥和移植物抗宿主病(GvHD);因此在本发明的范围内的是一种治疗有需要的患者的宿主抗移植物(HvG)排斥和移植物抗宿主病(GvHD)的方法,其包括通过向所述患者施用有效量的修饰的细胞来治疗所述患者,所述修饰的细胞包含失活的TCR α 和/或TCR β 基因。

[0385] 其它定义

[0386] -多肽序列中的氨基酸残基在本文根据单字母密码指定,其中例如,Q是指Gln或谷氨酰胺残基,R是指Arg或精氨酸残基,且D是指Asp或天冬氨酸残基。

[0387] -氨基酸取代是指用另一个取代一个氨基酸残基,例如用肽序列中的谷氨酰胺残基代替精氨酸残基是氨基酸取代。

[0388] -核苷酸指定如下:单字母密码用于指定核苷的碱基:a是腺嘌呤、t是胸腺嘧啶、c是胞嘧啶,且g是鸟嘌呤。对于变性的核苷酸,r表示g或a(嘌呤核苷酸),k表示g或t,s表示g或c,w表示a或t,m表示a或c,y表示t或c(嘧啶核苷酸),d表示g、a或t,v表示g、a或c,b表示g、t或c,h表示a、t或c,且n表示g、a、t或c。

[0389] -“如本文所用,“核酸”或“多核苷酸”是指核苷酸和/或多核苷酸,例如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、寡核苷酸、通过聚合酶链反应(PCR)产生的片段,以及由连接、裂解、核酸内切酶作用和外切核酸酶作用中的任一种产生的片段。核酸分子可由天然存在的核苷酸的单体(例如,DNA和RNA)或天然存在的核苷酸的类似物(例如,天然存在的核苷酸的对映体形式)或两者的组合组成。修饰的核苷酸可在糖部分和/或嘧啶或嘌呤碱基部分中具有改变。糖改性包括例如,用卤素、烷基、胺和叠氮基取代一个或多个羟基,或糖可被官能化为醚或酯。此外,整个糖部分可用空间和电子相似的结构代替,例如氮杂-糖和碳环糖类似物。碱基部分中的修饰的实例包括烷基化嘌呤和嘧啶、酰化嘌呤或嘧啶或其它众所周知的杂环取代基。核酸单体可通过磷酸二酯键或这种键的类似物连接。核酸可以是单链或双链的。

[0390] -“DNA靶标”、“DNA靶序列”、“靶标DNA序列”、“核酸靶序列”、“靶序列”或“加工位点”是指可通过根据本发明的稀有切割核酸内切酶靶向和加工的多核苷酸序列。这些术语是指特定的DNA位置,优选为细胞中的基因组位置,而且还是指可独立存在于遗传物质的主体如质粒、游动基因、病毒、转座子或细胞器如线粒体中的一部分遗传物质作为非限制性实例。作为TALE-核酸酶靶标的非限制性实例,靶向基因组序列通常由15-bp间隔物分开的两个17-bp长的序列(称为半靶标)组成。通过在作为非限制性实例的表2、7和11中列出的在EF1- α 启动子或T7启动子的控制下,通过质粒编码的TALE-核酸酶的重叠序列识别各个半靶标。核酸靶序列由所述靶标的一条链的5'至3'序列定义,如表2和7所示。

[0391] -嵌合抗原受体(CAR)是指结合对抗存在于靶细胞上的组分的结合结构域的分子,例如对具有T细胞受体激活细胞内结构域的所需抗原(例如,肿瘤抗原)的基于抗体的特异性以产生展现特异性抗-靶细胞免疫活性的嵌合蛋白。通常,CAR由与T细胞抗原受体复合物 ζ 链(scFvFc: ζ)的细胞内信号转导结构域融合的细胞外单链抗体(scFvFc)组成,并且当在T细胞中表达时具有基于单克隆抗体的特异性重定向抗原识别的能力。本发明中使用的CAR的一个实例是针对CD19抗原的CAR,并且可包括氨基酸序列作为非限制性实例:SEQ ID NO: 6

[0392] -“递送载体”或“多种递送载体”是指可用于本发明中以使细胞接触(即“接触”)或递送到细胞内或亚细胞区室(即“引入”)药剂/化学物质的任何递送载体以及本发明所需的分子(蛋白质或核酸)。它包括但不限于脂质体递送载体、病毒递送载体、药物递送载体、化学载体、聚合物载体、脂质复合物、多聚复合物、树状聚合物、微泡(超声造影剂)、纳米颗粒、乳剂或其它合适的转移载体。这些递送载体允许递送分子、化学物质、大分子(基因、蛋白

质)或其它载体如质粒、由Diatos开发的肽。在这些情况下,递送载体是分子载体。“递送载体”或“多种递送载体”也意指用于进行转染的递送方法。

[0393] -术语“载体”或“多个载体”是指能够转运与其连接的另一个核酸的核酸分子。本发明中的“载体”包括但不限于可由染色体、非染色体、半合成或合成的核酸组成的病毒载体、质粒、RNA载体或线性或环状DNA或RNA分子。优选的载体是能够自主复制(附加型载体)和/或表达与它们连接的核酸的(表达载体)。大量合适的载体是本领域技术人员已知的并且可商购。

[0394] 病毒载体包括逆转录病毒、腺病毒、细小病毒(例如,腺相关病毒)、冠状病毒、负链RNA病毒如正粘病毒(例如,流感病毒)、弹状病毒(例如,狂犬病和水泡性口炎病毒)、副粘病毒(例如,麻疹和仙台病毒)、正链RNA病毒如小核糖核酸病毒和甲病毒,以及双链DNA病毒,包括腺病毒、疱疹病毒(例如,1型和2型单纯疱疹病毒、艾普斯登-巴尔病毒、巨细胞病毒)和痘病毒(例如,牛痘、禽痘和金丝雀痘)。其它病毒包括例如,诺沃克病毒、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、乳多空病毒、嗜肝DNA病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的实例包括:禽白血病肉瘤、哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒、HTLV-BLV组、慢病毒、泡沫病毒(Coffin,J.M.,逆转录病毒:病毒及其复制(Retroviridae:The viruses and their replication),In Fundamental Virology,第三版,B.N.Fields,等人编辑,Lippincott-Raven Publishers,Philadelphia,1996)。

[0395] -“慢病毒载体”是指基于HIV的慢病毒载体,因为它们具有相对较大的包装能力,降低的免疫原性及其以高效率稳定地转导大范围不同细胞类型的能力,因此其对于基因递送是非常有前景的。通常在将三种(包装、包膜和转移)或更多质粒瞬态转染入生产细胞后产生慢病毒载体。与HIV一样,慢病毒载体通过病毒表面糖蛋白与细胞表面上的受体的相互作用进入靶细胞。进入时,病毒RNA经历逆转录,其由病毒逆转录酶复合物介导。逆转录产物是双链线性病毒DNA,其是用于感染细胞的DNA中的病毒整合的底物。“综合慢病毒载体(或LV)”是指能够整合靶细胞基因组的作为非限制性实例的载体。相反,“非综合慢病毒载体(或NILV)”是指不能通过病毒整合酶的作用整合靶细胞的基因组的有效的基因递送载体。

[0396] -递送载体和载体可与任何细胞透化技术(例如,声致穿孔或电穿孔或这些技术的衍生物)相关联或组合。

[0397] -细胞或多个细胞是指衍生自这些生物体的任何真核活细胞、原代细胞和细胞系用于体外培养。

[0398] -“原代细胞”或“多个原代细胞”是指从活组织(即,活组织检查材料)直接取出并建立用于体外生长的细胞,其经历非常少的群体倍增值,因此与连续致瘤或人工永生化细胞系相比,从其衍生自的组织的主要功能成分和特征更具代表性。

[0399] 作为非限制性实例,细胞系可选自由以下各项组成的组中:CHO-K1细胞;HEK293细胞;Caco2细胞;U2-OS细胞;NIH 3T3细胞;NS0细胞;SP2细胞;CHO-S细胞;DG44细胞;K-562细胞;U-937细胞;MRC5细胞;IMR90细胞;Jurkat细胞;HepG2细胞;HeLa细胞;HT-1080细胞;HCT-116细胞;Hu-h7细胞;Huvec细胞;Molt 4细胞。

[0400] 所有这些细胞系可通过本发明的方法进行修饰以提供细胞系模型从而产生、表达、定量、检测、研究感兴趣的基因或蛋白质;作为非限制性实例,这些模型也可用于筛选研究和生产以及诸如化学、生物燃料、治疗和农学的各个领域中的感兴趣的生物活性分子。

[0401] -“突变”是指替代、删除、插入多达一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、二十个、二十五个、三十个、四十个、五十个或更多个多核苷酸(cDNA、基因)或多肽序列中的核苷酸/氨基酸。突变可影响基因或其调控序列的编码序列。它也可能影响基因组序列的结构或编码的mRNA的结构/稳定性。

[0402] -“一个或多个变体”是指重复变体、变体、DNA结合变体、TALE-核酸酶变体、通过在母体分子的氨基酸序列中突变或替换至少一个残基获得的多肽变体。

[0403] -“功能性变体”是指蛋白质或蛋白质结构域的催化活性突变体;与其亲本蛋白质或蛋白质结构域或另外的性质相比,这种突变体可具有相同的活性,或更高或更低的活性。

[0404] -“基因”是指遗传的基本单位,由编码特定蛋白质或蛋白质片段的沿染色体以线性方式排列的DNA片段组成。基因通常包括启动子、5'非翻译区、一个或多个编码序列(外显子)、任选的内含子、3'非翻译区。基因还可包含终止子、增强子和/或沉默子。

[0405] -如本文所用,术语“基因座”是染色体上的DNA序列(例如,基因)的具体物理位置。术语“基因座”可以是指染色体上的稀有切割核酸内切酶靶序列的具体物理位置。这种基因座可包含被根据本发明的稀有切割核酸内切酶识别和/或切割的靶序列。应当理解,本发明的感兴趣的基因座不仅可限定存在于细胞的遗传物质(即,染色体)的主体中的核酸序列,而且可限定可独立于所述遗传物质的主体存在的遗传物质的一部分如质粒、游离基因、病毒、转座子或细胞器如线粒体的主体作为非限制性实例。

[0406] -术语“核酸内切酶”是指能够催化DNA或RNA分子,优选为DNA分子中的核酸之间的键的水解(切割)的任何野生型或变体酶。不考虑它的序列,核酸内切酶不切割DNA或RNA分子,但在特定的多核苷酸序列,进一步称为“靶序列”或“靶位点”处识别和切割DNA或RNA分子。当通常具有大于12个碱基对(bp)长度,更优选为14-55bp的多核苷酸识别位点时,核酸内切酶可被分类为稀有切割核酸内切酶。稀有切割核酸内切酶通过在定义的基因座处诱导DNA双链断裂(DSB)而显著增加HR(Rouet, Smih et al.1994;Chouluka, Perrin et al.1995;Pingoud and Silva 2007)。稀有切割核酸内切酶可例如是归巢核酸内切酶(Paques and Duchateau 2007),由工程化锌指结构域与限制酶的催化结构域融合产生的嵌合锌指核酸酶(ZFN),例如FokI(Porteus and Carroll 2005)或化学核酸内切酶(Eisenschmidt, Lanio et al.2005;Arimondo, Thomas et al.2006)。在化学核酸内切酶中,化学或肽切割器与核酸的聚合物或识别特定靶序列的另一DNA缀合,从而将切割活性靶向特定序列。化学核酸内切酶还包括合成核酸酶,例如邻二氮菲的缀合物、DNA切割分子和已知结合特异性DNA序列的三链体形成寡核苷酸(TFO)(Kalish and Glazer 2005)。这种化学核酸内切酶包括在根据本发明的术语“核酸内切酶”中。

[0407] 稀有切割核酸内切酶也可以是例如,TALE-核酸酶,使用FokI催化结构域的新一类嵌合核酸酶和衍生自类转录激活因子效应物(TALE)的DNA结合结构域,这是用于通过黄单胞菌属(*Xanthomonas* genus)的植物病原体的感染过程的蛋白质家族(Boch, Scholze et al.2009;Moscou and Bogdanove 2009;Christian, Cermak et al.2010;Li, Huang et al.)。基于FokI的TALE-核酸酶(TALE-核酸酶)的功能布局基本上是ZFN的功能布局,其中锌指DNA结合结构域被TALE结构域代替。因此,通过TALE-核酸酶的DNA切割需要在非特异性中心区域侧翼的两个DNA识别区。包含在本发明中的稀有切割核酸内切酶也可衍生自TALE-核酸酶。

[0408] 稀有切割核酸内切酶可以是归巢核酸内切酶,也称为大范围核酸酶。这种归巢核酸内切酶是本领域公知的(Stoddard 2005)。归巢核酸内切酶识别DNA靶序列并产生单链或双链断裂。归巢核酸内切酶是高度特异性的,识别长度为12至45个碱基对(bp)的DNA靶位点,通常长度为14至40bp。根据本发明的归巢核酸内切酶可例如对应于LAGLIDADG核酸内切酶,对应于HNH核酸内切酶,或对应于GIY-YIG核酸内切酶。根据本发明的优选归巢核酸内切酶可以是I-CreI变体。

[0409] -“TALE-核酸酶”旨在是由通常衍生自类转录激活因子效应物(TALE)的核酸结合结构域和一个核酸酶催化结构域组成的融合蛋白,以切割核酸靶序列。催化结构域优选为核酸酶结构域,且更优选为具有核酸内切酶活性的结构域,例如I-TevI、CoIE7、NucA和Fok-I。在特定的实施方式中,可将TALE结构域与例如I-CreI和I-OnuI或其功能变体的大范围核酸酶融合。在更优选的实施方式中,所述核酸酶是单体TALE-核酸酶。单体TALE-核酸酶是为了特异性识别和切割不需要二聚化的TALE-核酸酶,例如W02012138927中描述的具有I-TevI催化结构域的工程化TAL重复序列的融合。类转录激活因子效应物(TALE)是来自细菌种黄单胞菌属(*Xanthomonas*)的蛋白质,其包括多个重复序列,每个重复序列包含对核酸靶序列的每个核苷酸碱基特异的位置12和13(RVD)的二残基。具有相似的模块化碱基-每-碱基核酸结合性质(MBBBD)的结合结构域也可衍生自由申请人在不同细菌种中最近发现的新模块化蛋白质。新的模块化蛋白质具有比TAL重复序列显示更多序列变异性的优点。优选地,与不同核苷酸的识别相关的RVD是用于识别C的NG、用于识别T的NG、用于识别A的NI、用于识别G或A的NN、用于识别A、C、G或T的NS、用于识别T的HG、用于识别T的IG、用于识别G的NK、用于识别C的HA、用于识别C的ND、用于识别C的HI、用于识别G的HN、用于识别G的NA、用于识别G或A的SN和用于识别T的YG、用于识别A的TL、用于识别A或G的VT和用于识别A的SW。在另一个实施方式中,关键氨基酸12和13可以突变为其它氨基酸残基,以调节它们对核苷酸A、T、C和G的特异性,且特别是增强这种特异性。TALE-核酸酶已进行描述并且用于刺激基因靶向和基因修饰(Boch, Scholze et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al.)。工程化的TAL-核酸酶可以商品名TALENTM(Cellestis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 Paris, France)商购。

[0410] -术语“切割”是指多核苷酸的共价骨架的断裂。切割可通过多种方法引发,包括但不限于磷酸二酯键的酶促或化学水解。单链切割和双链切割都是可能的,并且由于两个不同的单链切割事件可能发生双链切割。双链DNA、RNA或DNA/RNA混合切割可导致平端或交错端的产生。

[0411] -“融合蛋白”是指本领域公知的方法的结果,该方法包括两个或多个最初编码单独的蛋白质或它们的一部分的基因的连接,所述“融合基因”的转译导致衍生自每种原始蛋白质的功能性质的单一多肽。

[0412] -“同一性”是指两个核酸分子或多肽之间的序列同一性。同一性可通过比较每个序列中的位置来确定,为了比较的目的可将其比对。当比较序列中的位置被相同的碱基占据时,那么该位置处的分子是相同的。核酸或氨基酸序列之间的相似性或同一性程度是核酸序列共有的位置上的相同或匹配核苷酸数量的函数。可使用各种比对算法和/或程序来计算两个序列之间的同一性,包括可作为GCG序列分析包的一部分使用的FASTA或BLAST(威斯康星州大学(University of Wisconsin), Madison, Wis.),并且可与例如,默认设置一起

使用。例如,考虑了与本文所述的特异性多肽具有至少70%、85%、90%、95%、98%或99%的同一性并且优选显示基本上相同功能的多肽,以及编码这种多肽的多核苷酸。

[0413] -“相似性”描述了两种或多种多肽的氨基酸序列之间的关系。还可使用相似性基质如BLOSUM45、BLOSUM62或BLOSUM80将BLASTP用于鉴定与参考氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%的序列相似性的氨基酸序列。除非另有说明,相似性得分将基于BLOSUM62的使用。当使用BLASTP时,百分比相似性基于BLASTP正得分,且百分比序列同一性基于BLASTP同一性得分。BLASTP“同一性”显示总残基在相同的高得分序列对中的数量和分数;并且BLASTP“正”显示残基的数量和分数,对于其对比得分具有正值并且其彼此相似。本公开预期和包括具有这些同一性或相似性程度的氨基酸序列或本文公开的氨基酸序列的相似性的任何中等同一性程度。使用遗传密码推导出类似多肽的多核苷酸序列,并且可通过常规方法获得。

[0414] -“信号转导结构域”或“共刺激配体”是指特异性结合T细胞上的同源共刺激分子的抗原呈递细胞上的分子,从而提供一种信号,除了由例如TCR/CD3复合物与载有肽的MHC分子的结合提供的原始信号之外,其介导T细胞应答,包括但不限于增殖激活、分化等。共刺激配体可包括但不限于CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、可诱导的共刺激配体 (ICOS-L)、细胞间粘附分子 (ICAM、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M1CB、HVEM、淋巴毒素β受体、3/TR6、ILT3、ILT4、结合To11配体受体的激动剂或抗体以及与B7-H3特异性结合的配体。共刺激配体还特别地包括与T细胞上存在的共刺激分子特异性结合的抗体,例如但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LTGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性结合的配体。

[0415] “共刺激分子”是指与共刺激配体特异性结合的T细胞上的同源结合配偶体,从而介导通过细胞的共刺激反应,例如但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、BTLA和To11配体受体。

[0416] 本文所用,“共刺激信号”是指与原始信号如TCR/CD3连接相结合的信号,其导致关键分子的T细胞增殖和/或上调或下调。

[0417] -如本文所用,术语“细胞外配体结合结构域”被定义为能够结合配体的寡肽或多肽。优选地,该结构域能够与细胞表面分子相互作用。例如,可选择细胞外配体结合结构域以识别用作与特定疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标志物的配体。因此,可用作配体的细胞表面标志物的实例包括与病毒、细菌和寄生虫感染、自体免疫疾病和癌细胞相关的那些。

[0418] 如本文所用,术语“受试者”或“患者”包括动物界的所有成员,包括非人类灵长类和人类。

[0419] 本发明的上述书面描述提供了制造和使用它的方式和方法,使得本领域的技术人员能够制造和使用它们,特别是为了所附权利要求书的主题而提供该可实施性,其构成原始描述的一部分。

[0420] 在本文列出数字限制或范围的情况下,包括端点。此外,数值限制或范围内的所有值和子范围都被具体地包括,如同明确地写出一样。

[0421] 提供上述描述以使本领域技术人员能够制造和使用本发明,并且在特定应用及其要求的背景下提供。优选实施方式的各种修改对于本领域技术人员而言将是显而易见的,

并且在不脱离本发明的精神和范围的情况下,本文定义的一般原理可应用于其它实施方式和应用。因此,本发明不旨在限于所示的实施方式,而是被给予与本文公开的原理和特征一致的最宽范围。

[0422] 一般地已描述了本发明,可通过参考某些具体实施例获得进一步的理解,在本文提供这些具体实施例仅为了说明的目的,除非另有说明,否则不旨在限制。

[0423] 实施例

[0424] 本发明人提出探索三种不同的策略,以通过HvG预防同种异体CAR T细胞耗竭(图9)。如实施例1所述,第一种包括在CAR T细胞的表面处表达PD-L1。这种抗原的存在可能通过PD1/PD-L1抑制途径抑制宿主T细胞,因此降低了它们对CAR T细胞的细胞溶解活性(图10A)。没有这种诱饵系统并且在一定时间长度之后,预期宿主T细胞会攻击和排除同种异体CAR T细胞(图10B)。第二个策略包括工程化的CAR T细胞,使它们排出CTLA4 Ig,由融合IgG恒定区的CTLA4蛋白质构成的嵌合体构建体。CTLA4 Ig在细胞外介质中的释放可能与抗原呈递细胞(APC)表面处暴露的CD86/CD80结合,并阻止它们通过CD28/CD80或CD28/CD86相互作用激活宿主T细胞。涉及宿主APC和宿主T细胞相互作用/激活的HvG反应显示在图11A中,并且通过排泄CTLA4 Ig的CAR T细胞排斥的预防显示在图11B中。包括组合上述两种策略的第三种策略也可用于预防HvG反应,并允许CAR T细胞在同种异体细胞过继转移的设置中增殖。

[0425] 在以下实施例3至7中,为了延长它们的存活并提高它们的治疗活性,本发明人描述了通过使用特异性TALEN使B2M基因失活来工程化同种异体T细胞来预防NK细胞介导的治疗性同种异体T细胞排斥的方法,与:i)由UL18和 β 2-m(B2M-UL18)组成的嵌合单链分子的表达或ii)NKG2D配体的分泌结合。特殊性在于将在肿瘤细胞或病毒感染的细胞中正常发生的机制应用于原代T细胞。因此,作用机制是潜在不同的:在肿瘤细胞中,排除的NKG2D配体导致它们在表面上的存在减少,而在工程化细胞中,分泌的NKG2D配体将用作潜在地仍存在于T细胞表面的几种其它NKG2D配体的诱饵。

[0426] 在以下实施例8至11中,提供了一种方法,其中同种异体CAR T细胞被工程化以从病毒蛋白(ISU或FP作为膜结合或分泌肽)表达免疫抑制多肽,其允许抑制患者T细胞,因此允许输注到患者中的同种异体CAR T细胞的有效持久性。

[0427] 一般方法

[0428] 原代T细胞培养

[0429] 使用Ficoll梯度密度培养基从EFS(Etablissement Français du Sang, Paris, France)提供的血沉棕黄层样品中纯化T细胞。回收PBMC层,并使用市售的T细胞富集试剂盒纯化T细胞。在补充有20ng/mL的人IL-2、5%的人和Dynabeads人T激活物CD3/CD28的X-Vivo™-15培养基(Lonza)中以珠粒:细胞比1:1激活纯化的T细胞(Life Technologies)。

[0430] scCAR mRNA转染

[0431] 在T细胞纯化和激活后,在第4天或第11天进行转染。用15 μ g的编码不同scCAR构建体的mRNA转染5百万个细胞。使用细胞波技术进行的T7mRNA聚合酶转染产生scCAR mRNA,通过在最终体积为200 μ l的“细胞穿孔缓冲液T”(BTX Harvard Apparatus)中,以3000V/cm施加两个0.1mS脉冲,随后在0.4cm缺口比色皿中以325V/cm施加四个0.2mS脉冲。在X-Vivo™-15培养基中立即稀释细胞,并在37℃下用5%CO₂孵育。电穿孔后2h,以20ng/mL加入IL-2。

[0432] 细胞毒性测定

[0433] 在96孔板(100,000个细胞/孔)中,将T细胞连同在同一孔中的10,000个靶细胞(表达CD123)和10,000个对照(CD123neg)细胞一起孵育。在用CD123 CAR⁺ T细胞共培养它们之前,用荧光细胞内染料(CFSE或细胞痕量紫)标记靶细胞和对照细胞。在37靶细下用5%CO₂将共培养物孵育4小时。在该孵育期后,用可固定的生存力染料标记细胞,并通过流式细胞术进行分析。确定每个细胞群(靶细胞或CD123对照细胞)的生存力,并计算特异性细胞裂解的百分比。在mRNA转染后48小时进行细胞毒性测定。

[0434] T-细胞转导

[0435] 用T细胞纯化/激活后3天,进行用重组慢病毒载体转导T细胞表达scCAR。使用重组蛋白进行T细胞表面处的scCAR检测,该重组蛋白由人CD123蛋白的细胞外结构域的融合连同鼠IgG1Fc片段组成。用靶向蛋白质的小鼠Fc部分的荧光染料缀合的二抗检测该蛋白与scCAR分子的结合,并通过流式细胞术分析。

[0436] 实施例1.在原代T细胞和CAR T细胞表面处转基因表达PD-L1

[0437] 在这些实验中,证实了用编码载体的PD-L1(mRNA或慢病毒)转染或转导的人激活T细胞表达细胞表面处的可检测水平的PD-L1。

[0438] PD-L1的表达

[0439] 本实施例描述了在T细胞或CAR T细胞表面处的PD-L1的表达以及这种表达对它们对肿瘤细胞的细胞溶解活性的影响。为了在原代T细胞表面处表达PD-L1,首先从含有抗-CD19 CAR工具(pCLS23856,SEQ ID NO 77)的慢病毒颗粒激活转导的血沉棕黄层样品中纯化原代T细胞,并根据Galletto R等人(2014)Molecular Therapy-Methods&Clinical Development 1,货号:14021doi:10.1038/mtm.2014.2描述的步骤转染。简单地说,关于转导,通过Dynabeads人T激活剂CD3/CD28激活2天后,使用含有抗-CD19 CAR工具的慢病毒颗粒以5MOI孵育T细胞。

[0440] mRNA的转染

[0441] 关于转染,在它们的激活5天后,用20用,的编码PD-L1(pCLS27069,SEQ ID NO 18)的mRNA转染500万的CAR T细胞或T细胞。使用Agilpulse技术进行转染,通过在最终体积为200转染的细胞穿孔缓冲液T(BTX Harvard Apparatus,Holliston,Massachusetts)中,以3,000V/cm施加两个0.1mS脉冲,随后在0.4cm缺口比色皿中以325V/cm施加四个0.2mS脉冲。然后在补充有20ng/ml的IL-2(终浓度)和5%人血清AB的X-Vivo-15培养基中立即稀释细胞。最终以 1×10^6 /ml稀释转染的T细胞,并在5%CO₂和20ng/ml IL-2(终浓度)以及5%人AB血清的存在下保持在37℃下的培养基中,用于进一步表征。转染一天后,回收CAR T细胞以表征在它们的细胞表面处的PD-L1的表达,并确定这种表达对通过它们的抗CD19工具CAR靶向的相关肿瘤细胞的特异性细胞溶解活性的影响。

[0442] 我们的研究表明,在用编码PD-L1(>90%的细胞表达PD-L1,图12)的mRNA转染的CAR T细胞中表达PD-L1,而在模拟转染的T细胞或CAR T细胞中没有检测到表达。用未转导的T细胞获得相似的结果,表明PD-L1在CAR T细胞和T细胞上成功表达(图12)。

[0443] 用慢病毒载体(LV)转染

[0444] 制备含有PD-L1cDNA的LV载体。首先从血沉棕黄层样品中纯化原代T细胞,激活,用含有PD-L1的慢病毒颗粒(SEQ ID NO.18的pCLS27062)以MOI为5转导任何一个。转导3天后,

回收转导的T细胞,以表征它们的细胞表面处的PD-L1的表达。

[0445] 结果表明,在用单独的编码PD-L1 (>70%的细胞表达PD-L1,结果未示出)的LV载体转导的T细胞中表达PD-L1,而在未转导的T细胞中未检测到表达。

[0446] 特异性细胞裂解

[0447] 关于CAR T细胞对相关肿瘤细胞(Daudi)的特异性细胞裂解活性,使用Zhao,Y.等人,(2010)Cancer Res 70,9053-9061中描述的基于流式的测定法测定,我们的结果表明,PD-L1在CAR T细胞表面处的再表达并不显著影响它们的活性(图13)。该结果可用来自不同献血者的工程化CAR T细胞再现(图13,参见用模拟CAR T细胞B和PD-L1 CAR T细胞B获得的结果)。

[0448] 实施例2.由原代T细胞和CAR T细胞转基因表达和排泄阿巴西普和贝拉西普(CTLA4 Ig)

[0449] mRNA和用慢病毒载体(LV)的转染

[0450] 阿巴西普和贝拉西普(分别以Orencia和Nulojix市售)是由融合到CTLA-4的细胞外结构域的免疫球蛋白IgG1的Fc区组成的融合蛋白。

[0451] 该实施例描述了在培养基中通过原代T细胞以MOI为5的CTLA4a Ig和CTLA4b Ig(分别为阿巴西普,或贝拉西普pCLS27068 SEQ ID NO 3和pCLS27066,SEQ ID NO 4)和通过含有CTLA4Ig(SEQ ID NO.16的pCLS27064)的LV的表达和排泄。阿巴西普描述于Moreland L等人;(2006)Nature Reviews Drug Discovery 5,185-186。贝拉西普由Larsen CP等人,(2005)“LEA29Y(贝拉西普)的合理开发,CTLA4-Ig的高亲和力变体具有强大的免疫抑制特性(Rational development of LEA29Y(belatacept),a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties)”Am J Transplant.5(3):443-53描述。

[0452] CTLA4 a/b Ig表达

[0453] 为了通过原代T细胞表达CTLA4 Ig,首先从血沉棕黄层样品中纯化原代T细胞,由含有抗-CD19 CAR工具(pCLS23856,SEQ ID NO 77)的慢病毒颗粒激活转导,并按照实施例1所述的步骤转染。关于转染,在它们激活5天后,分别用20分别编码CTLA4a或b Ig(分别为阿巴西普或贝拉西普pCLS27068 SEQ ID NO:16和pCLS27066,SEQ ID NO:17)的mRNA转染500万的CAR T细胞或T细胞并根据实施例1中所述的方案进行培养。转染一天后,回收CAR T细胞以表征它们通过ELISA在培养基中排泄CTLA4 Ig的能力,并确定这种表达/排泄对它们针对靶向的相关和非相关肿瘤细胞(分别为Daudi和K562)的特异性细胞溶解活性的影响。

[0454] 我们的结果表明,通过编码CTLA4a或b Ig的mRNA转染原代T细胞导致培养基中相应融合蛋白的出现。在我们的实验条件下,培养基中CTLA4 Ig的量与分别以最大值为2.1和3.1pg/mL的CTLA4a Ig和CTLA4b Ig转染的mRNA的量近似成正比。如预期的,模拟转染的T细胞的培养基不含任何可检测的CTLA4 Ig蛋白。这些结果表明CTLA4a Ig和CTLA4b Ig被原代T细胞成功表达,并在培养基中排泄。

[0455] 特异性细胞溶解活性

[0456] 为了研究CTLA4 Ig对CAR T细胞活性的影响,使用实施例1中描述的基于流程的测定法测定它们对相关和非相关肿瘤细胞系的细胞溶解活性。我们的研究表明,模拟转染的CAR T细胞和CTLA4 Ig CAR T细胞对Daudi细胞显示出显著的细胞溶解活性。总的看

来,这些结果表明原代T细胞成功表达并排泄CTLA4 Ig,同时保留了它们的抗肿瘤活性。

[0457] 实施例3.由原代T细胞转基因表达和排泄CTLA4 Ig和CTLA4 Ig/PD-L1配体

[0458] 在本实验中,如前所述用编码PD-L1和CTLA4Ig的LV载体共转导T细胞。图17显示了用单独的编码CTLA4Ig的LV载体(平均值=250pg/用编)转导的T细胞分泌的上清液中或者在用编码PD-L1和CTLA4Ig的LV载体(平均值=270pg/者在)共转导的T细胞中的CTLA4 Ig的水平,而在PD-L1转导的T细胞中没有检测到表达。结果表明,PD-L1在用单独的编码PD-L1的LV载体(>70%的细胞表达PD-L1,图17)转导的T细胞中或在用编码PD-L1和CTLA4Ig的LV载体共转导的T细胞中表达(59%),而在未转导的T细胞中或CTLA4Ig转导的T细胞中无法检测到表达。

[0459] 实施例4:混合反应测定(MLR)测试同种异体T细胞反应

[0460] 实验的基本原理和方案

[0461] 为了检测由CAR T细胞过表达的PD-L1和/或CTLA4Ig是否对宿主免疫系统具有影响,建立了体外测试,其中将来自供体1的初始PBMC与来自HLA-错配的供体2的T细胞共培养。简言之,用CFSE标记PBMC(供体1)并与未标记的丝裂霉素处理或照射的工程化T细胞(供体2)混合,是指它们不能增殖。在6天的时间后,使用以下门控策略进行流式细胞术分析:FSC/SSC->活细胞->CD3+(来自供体1PBMC的T细胞)->CFSE由于存在HLA错配的供体2的T细胞,CFSE染色的减少指示细胞分裂和供体1的T细胞的同种异体反应。

[0462] 图18中从左到右设置了一系列实验:

[0463] - (a) 单独培养没有任何处理的来自供体1的PBMC,

[0464] - (b) 单独培养已经以增加浓度的PHA(植物血球凝集素)处理的来自供体1的PBMC,一种T细胞丝裂原;

[0465] - (c) 将来自供体1的PBMC与来自供体2的未转导的T细胞共培养;

[0466] - (d) 将来自供体1的PBMC与来自供体2的PD-L1转导的T细胞共培养;

[0467] - (e) 将来自供体1的PBMC与来自供体2的CTLA4Ig转导的T细胞共培养;

[0468] - (f) 将来自供体1的PBMC与来自供体2的PD-L1和CTLA4Ig共转导的T细胞共培养。

[0469] 结果

[0470] 从图18可以看出,当不共培养(a)或在自体T细胞存在(c)时,CD3+ T细胞似乎不增殖。作为对照(b),如预期的,来自供体1的PBMC,CFSE阳性人群随着PHA浓度增加而降低。CD3+ T细胞在同种异体T细胞(c)的存在下增殖(CFSE阳性人群的消失)。当同种异体T细胞被工程化以表达PD-L1(d)、CTLA4Ig(e)或两者(f)时,观察到应答T细胞保持明亮的CFSE染色,得出结论:通过工程化T细胞表达PD-L1和/或CTLA4Ig抑制应答增殖。因此,图18得到的结果表明,在体外混合淋巴细胞反应(MLR)测定中,表达PD-L1、CTLA4Ig或两者的工程化T细胞较不易刺激同种异体T细胞应答。此外,结果显示当表达PD-L1、CTLA4Ig两者时的累积效应。

[0471] 实施例5:细胞毒性检测测试表达PD-L1和/或CTLA4Ig的抗-CD123 CAR T细胞的杀死MOLM13靶细胞的能力

[0472] 该实验旨在通过CAR分子的表达来测试表达PD-L1和/或CTLA4Ig的T细胞的杀死特异性靶细胞的能力。

[0473] 用PD-L1LV、CTLA4IG或两者转导的T细胞已经用20经用的编码抗-CD123 CAR(SEQ ID NO.69)的mRNA转染。在2天时间后,使用作为特异性靶细胞的MOLM13细胞系进行细胞毒

性测定。

[0474] 来自细胞毒性测定的结果,图19和图20显示,表达PD-L1、CTLA4Ig或两者的工程化T细胞,并且进一步工程化以表达CD123 CAR分子,维持它们杀死特异性靶标的能力。此外,这些数据表明PD-L1、CTLA4Ig或两者的表达增加它们的内在细胞溶解活性。

[0475] 实施例6:体内实验

[0476] 这些实验的目的是验证修饰的T细胞仍能够在体内消除同源肿瘤细胞。因此,已经进行体内实验来研究PD-L1、CTLA4Ig或两者的表达是否影响CAR T细胞抗肿瘤活性。方案概要如图21所示。

[0477] 获得用于以下处理组的激活T细胞:

[0478] -未转导的T细胞;

[0479] -使用CD123 CAR慢病毒(LV)转导的T细胞;

[0480] -使用CD123 CAR LV和PD-L1LV转导的T细胞;

[0481] -使用CD123 CAR LV、CTLA4Ig LV转导的T细胞;

[0482] -使用CD123 CAR LV、PD-L1LV和CTLA4Ig LV转导的T细胞。

[0483] 转染2天后,在G-Rex中扩增T细胞进行体内实验。19天后,回收细胞并计数。

[0484] 图22显示与CAR Cd123工程化T细胞相比,表达PD-L1、CTLA4Ig或两者的工程化T细胞,并进一步工程化以表达CD123 CAR分子,维持相似的增殖能力。

[0485] 将由此获得的T细胞注射到NOG小鼠中进行体内实验。

[0486] 抗-肿瘤小鼠模型

[0487] 将免疫缺陷NOG小鼠静脉内(iv)注射(CD123表达_MOLM13-萤光素酶细胞作为AML异种移植小鼠模型。然后,将小鼠静脉内注射(在注射肿瘤细胞系2或7天后)不同剂量的待测试的CD123 CAR+ T细胞,或使用未使用CD123 CAR慢病毒载体转导的T细胞。在T细胞注射当天(D0),在T细胞注射后D7和D14测定生物发光信号,以跟踪不同动物上的肿瘤进展。

[0488] 来自图23A和图23B的生物发光分析结果表明,与对照组相比,注射有工程化CAR T细胞的所有组的小鼠有效地根除肿瘤,以及工程化CAR T细胞在体内的明显抗体活性。

[0489] 实施例7使用特异性B2M TALEN的有效的B2M基因敲除。

[0490] 已产生了靶向B2M基因的第一个编码外显子(基因库登录号NC_000015)中的序列(SEQ ID N°1)的特异性TALEN(左DNA结合结构域RVD:具有SEQ ID NO:2的NN-NN-HD-HD-NG-NG-NI-NN-HD-NG-NN-NG-NN-HD-NG-NG,和右DNA结合结构域RVD:具有SEQ ID NO:3的NI-NN-HD-HD-NG-HD-HD-NI-NN-NN-HD-HD-NI-NN-NI-NG)。

[0491] 为了测试该B2M特异性TALEN在B2M基因座上促进易出错NHEJ事件的能力,根据制造商方案,使用脉冲敏捷技术在原代T细胞中电穿孔2或10 μ g的编码TALEN的mRNA。转染三天后,回收细胞,并用与藻红蛋白的荧光染料偶联的特异性 β 2-微球蛋白抗体标记。然后,通过流式细胞术分析细胞的活力和 β 2-m表达。结果如图16所示。在顶板上,接近100%的未转染的T细胞表达 β 2-m(右上图)。使用特异性B2M TALEN转染T细胞显著降低 β 2-m表达,因为当分别用2 μ g或10 μ g的TALEN mRNA转染时,38%(右中图)和80%的T细胞(右下图)变为 β 2-m阴性。这些数据表明,可以高效率实现T细胞中的B2M敲除。

[0492] 实施例8:T细胞中的单链分子B2M-UL18的生产和表达。

[0493] HCMV UL18编码I型跨膜糖蛋白,其与 β 2-m缔合并结合内源性肽的MHC I类分子共

有高水平的AA序列同一性。由于我们的目标是在其中使B2M基因无效的T细胞中表达该分子,因此我们的策略是产生嵌合分子,其中 $\beta 2\text{-m}$ 和UL18被融合为单链多肽。SEQ ID N°39显示了嵌合蛋白的氨基酸序列。含有嵌合B2M-UL18的慢病毒颗粒被转导入T细胞中。通过使用 $\beta 2\text{-m}$ 抗体的FACS分析来监测转基因的表达。来自该实验的结果旨在表明B2M-UL18嵌合蛋白在T细胞中有效表达。

[0494] 实施例9:T细胞中的NKG2D配体的产生和表达

[0495] NKG2D天然配体是跨膜蛋白或GPI锚定蛋白。为了实现通过T细胞分泌这些分子,NKG2D配体的细胞外结构域已在它们的N末端融合成分泌肽形式。分泌的嵌合NKG2D配体的氨基酸序列如下所示(SEQ ID NO:40至SEQ ID NO:47)。含有嵌合NKG2D配体的慢病毒颗粒被转导入T细胞中。通过使用特异性抗体的蛋白质印迹分析来监测培养上清液中的转基因表达。来自该实验的结果旨在显示嵌合NKG2D配体蛋白在T细胞中有效表达。

[0496] 实施例10: $\beta 2\text{-M}$ 例有缺陷型CAR T细胞不被同种异体T细胞识别

[0497] 将来自健康供体A的PBMC与来自供体B的经辐照或丝裂霉素处理的工程化的 $\beta 2\text{-m}$ 缺陷型T细胞共培养。作为对照,将来自健康供体A的PBMC与来自供体B的经辐照或丝裂霉素处理的工程化的 $\beta 2\text{-m}$ 阳性T细胞共培养。7天后,通过XTT比色测定或CFSE稀释法(FACS分析)测量来自供体A的细胞增殖。虽然在对照中观察到细胞增殖,但当工程化T细胞不表达 $\beta 2\text{-m}$ 时,没有观察到细胞增殖或观察到有限的细胞增殖。来自该实验的结果旨在表明同种异体反应T细胞不能识别和增殖抗 $\beta 2\text{-m}$ 缺陷型T细胞。

[0498] 实施例11:高效抑制NK介导的T细胞裂解

[0499] 从健康供体A PBMC中纯化NK细胞。作为靶标,在下面制备和列出来自健康供体B的工程化T细胞。a) 工程化T细胞(阴性对照)、b) $\beta 2\text{-m}$ 缺陷型工程化T细胞(阳性对照)、c) 表达B2M-UL18的 $\beta 2\text{-m}$ 缺陷型工程化T细胞(SEQ ID N°39)、d-k) 分别表达SP-MICAed (SEQ ID N°40)、SP-MICBed (SEQ ID N°41)、SP-ULBP1ed (SEQ ID N°42)、SP-ULBP2ed (SEQ ID N°43)、SP-ULBP3ed (SEQ ID N°44)、SP-N2DL4ed (SEQ ID N°45)、SP-RET1Ged (SEQ ID N°46)、SP-RAET1Led (SEQ ID N°47)的 $\beta 2\text{-m}$ 缺陷型工程化T细胞。通过CFSE标记测定法测定由NK细胞介导的细胞毒性。将靶细胞用CFSE标记,用PBS洗涤,以各种E:T细胞比例与NK细胞混合,在37混合孵育4小时。然后通过流式细胞术分析细胞,并测定CFSE阳性工程化T细胞的百分比,表明在NK细胞的存在下工程化T细胞的存活。意图是,尽管在阳性对照中观察到NK介导的细胞裂解($\beta 2\text{-m}$ 缺陷型工程化T细胞),但当 $\beta 2\text{-m}$ 缺陷型工程化T细胞工程化T细胞表达B2M-UL18 (SEQ ID N°39)或分泌的NKG2D配体(SP-MICAed (SEQ ID N°40)、SP-MICBed (SEQ ID N°41)、SP-ULBP1ed (SEQ ID N°42)、SP-ULBP2ed (SEQ ID N°43)、SP-ULBP3ed (SEQ ID N°44)、SP-N2DL4ed (SEQ ID N°45)、SP-RET1Ged (SEQ ID N°46)、SP-RAET1Led (SEQ ID N°47))时,没有观察到NK介导的细胞裂解或观察到有限的NK介导的细胞裂解。来自该实验的结果旨在表明,当在工程化T细胞中表达嵌合分子,作为抑制信号受体(B2M-UL18)或刺激信号受体(NKG2D配体)的诱饵时,同种异体NK细胞的细胞毒性活性受损。

[0500] 实施例12:ISU在工程化T细胞中的表达

[0501] 将携带来自莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV) (SEQ ID N°78)的包膜蛋白的慢病毒颗粒,来自MMLV (SEQ ID N°79)的包膜蛋白的跨膜截短形式或分泌的14聚体ISU肽(来自HIV-1病毒SEQ ID N°19至24的6个变体;来自HIV-2病毒SEQ ID N°25至30的6个变体;来自分别为

SEQ ID N°32、33、34、35、36、37和38的SIV、MoMuLV、HTLV-1、MPMV、Syncitin 1、Syncitin 2、HERV-K和FELV病毒的)转导到T细胞中。通过FACS分析监测膜结合转基因的表达,而通过蛋白质印迹在细胞培养上清液中监测分泌的ISU肽的表达。来自该实验的结果旨在表明两种形式的ISU在T细胞中有效表达。

[0502] 实施例13:FP肽在工程化T细胞中的表达

[0503] 将携带分泌的9聚体FP多肽的慢病毒颗粒(1个来自HIV-1病毒,和2个来自具有各自的SEQ ID N°48和49-50的人工序列)转导到T细胞中。通过蛋白质印迹在细胞培养上清液中监测分泌的FP肽的表达。来自该实验的结果旨在表明分泌的FP肽在T细胞中有效表达。

[0504] 实施例14:对表达ISU的工程化T细胞的T细胞增殖的有效抑制

[0505] 将来自健康供体A的PBMC与表达ISU的来自供体B的辐照或丝裂霉素处理的工程化T细胞共培养。作为对照,将来自健康供体A的PBMC与不表达ISU的来自供体B的经辐照或丝裂霉素处理的工程化T细胞共培养。7天后,通过XTT比色测定法或通过CFSE稀释法(FACS分析)测量来自供体A的细胞增殖。虽然在对照中观察到细胞增殖,但当工程化T细胞表达膜结合或分泌的ISU时,没有观察到细胞增殖或观察到有限的细胞增殖。本实验的结果旨在表明当工程化T细胞表达ISU时,同种异体反应的T细胞增殖被抑制。

[0506] 实施例15:对表达FP的工程化T细胞的T细胞增殖的有效抑制

[0507] 将来自健康供体A的PBMC与表达FP的来自供体B的辐照或丝裂霉素处理的工程化T细胞共培养。作为对照,将来自健康供体A的PBMC与不表达FP的来自供体B的经辐照或丝裂霉素处理的工程化T细胞共培养。7天后,通过XTT比色测定法或通过CFSE稀释法(FACS分析)测量来自供体A的细胞增殖。虽然在对照中观察到细胞增殖,但当工程化T细胞表达分泌的FP时,没有观察到细胞增殖或观察到有限的细胞增殖。本实验的结果旨在表明当工程化T细胞表达FP时,同种异体反应的T细胞增殖被抑制。

[0508] 说明书中引用的参考文献列表

[0509] Arimondo, P.B., C.J. Thomas, et al. (2006). "Exploring the cellular activity of camptothecin-triple-helix-forming oligonucleotide conjugates." *Mol Cell Biol* 26(1):324-33.

[0510] Arnould, S., P. Chames, et al. (2006). "Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets." *J Mol Biol* 355(3):443-58.

[0511] Ashwell, J.D. and R.D. Klausner (1990). "Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor." *Annu Rev Immunol* 8:139-67.

[0512] Boch, J., H. Scholze, et al. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." *Science* 326(5959):1509-12.

[0513] Boni, A., P. Muranski, et al. (2008). "Adoptive transfer of allogeneic tumor-specific T cells mediates effective regression of large tumors across major histocompatibility barriers." *Blood* 112(12):4746-54.

[0514] Brahmer, J.R., C.G. Drake, et al. (2010). "Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates." *J Clin Oncol* 28(19):

3167-75.

[0515] Cermak,T.,E.L.Doyle,et al.(2011). "Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting." *Nucleic Acids Res* 39(12):e82.

[0516] Choulika,A.,A.Perrin,et al.(1995). "Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 15(4):1968-73.

[0517] Christian,M.,T.Cermak,et al.(2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases." *Genetics* 186(2):757-61.

[0518] Coutinho,A.E.and K.E.Chapman(2011). "The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights." *Mol Cell Endocrinol* 335(1):2-13.

[0519] Critchlow,S.E.and S.P.Jackson(1998). "DNA end-joining: from yeast to man." *Trends Biochem Sci* 23(10):394-8.

[0520] Deng,D.,C.Yan,et al.(2012). "Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors." *Science* 335(6069):720-3.

[0521] Eisenschmidt,K.,T.Lanio,et al.(2005). "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage." *Nucleic Acids Res* 33(22):7039-47.

[0522] EGeissler,R.,H.Scholze,et al.(2011). "Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity." *PLoS One* 6(5):e19509.

[0523] Huang,P.,A.Xiao,et al.(2011). "Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs." *Nat Biotechnol* 29(8):699-700.

[0524] Jena,B.,G.Dotti,et al.(2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." *Blood* 116(7):1035-44.

[0525] Kalish,J.M.and P.M.Glazer(2005). "Targeted genome modification via triple helix formation." *Ann N Y Acad Sci* 1058:151-61.

[0526] Li,L.,M.J.Piatek,et al.(2012). "Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification." *Plant Mol Biol* 78(4-5):407-16.

[0527] Li,T.,S.Huang,et al.(2011). "TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain." *Nucleic Acids Res* 39(1):359-72.

[0528] Li,T.,S.Huang,et al.(2011). "Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes." *Nucleic Acids Res* 39(14):6315-25.

[0529] Ma,J.L.,E.M.Kim,et al.(2003). "Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences." *Mol Cell Biol* 23(23):8820-8.

- [0530] Mahfouz,M.M.,L.Li,et al.(2012). "Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein." *Plant Mol Biol* 78(3):311-21.
- [0531] Mahfouz,M.M.,L.Li,et al.(2011). "De novo-engineered transcription activator-like effector(TALE)hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(6): 2623-8.
- [0532] Mak,A.N.,P.Bradley,et al.(2012). "The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target." *Science* 335(6069):716-9.
- [0533] Miller,J.C.,S.Tan,et al.(2011). "A TALE nuclease architecture for efficient genome editing." *Nat Biotechnol* 29(2):143-8.
- [0534] Morbitzer,R.,P.Romer,et al.(2011). "Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector(TALE)-type transcription factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(50):21617-22.
- [0535] Moscou,M.J.and A.J.Bogdanove(2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." *Science* 326(5959):1501.
- [0536] Mussolino,C.,R.Morbitzer,et al.(2011). "A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity." *Nucleic Acids Res* 39(21):9283-93.
- [0537] Paques,F.and P.Duchateau(2007). "Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination:perspectives for gene therapy." *Curr Gene Ther* 7(1):49-66.
- [0538] Pardoll,D.and C.Drake(2012). "Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy." *J Exp Med* 209(2):201-9.
- [0539] Pardoll,D.M.(2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* 12(4):252-64.
- [0540] Park,T.S.,S.A.Rosenberg,et al.(2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." *Trends Biotechnol* 29(11):550-7.
- [0541] Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, Imperato GH, Tedder TF, Sadelain M, Brentjens RJ. (2012). "Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning". *Blood* 119(18):4133-41
- [0542] Pingoud,A.and G.H.Silva(2007). "Precision genome surgery." *Nat Biotechnol* 25(7):743-4.
- [0543] Porteus,M.H.and D.Carroll(2005). "Gene targeting using zinc finger nucleases." *Nat Biotechnol* 23(8):967-73.
- [0544] Robert,C.and C.Mateus(2011). "[Anti-CTLA-4 monoclonal antibody:a major step in the treatment of metastatic melanoma]." *Med Sci(Paris)* 27(10):850-8.
- [0545] Rong Z,Wang M,Hu Z,Stradner M,Zhu S,Kong H,Yi H,Goldrath A,Yang YG,Xu Y and FuX. (2014). "An Effective Approach to Prevent Immune Rejection of Human ESC-Derived Allografts." *Cell Stem Cell*.14(1):121-30.

[0546] Rouet,P.,F.Smith,et al.(1994). "Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease." Mol Cell Biol 14(12):8096-106.

[0547] Sander,J.D.,L.Cade,et al.(2011). "Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs." Nat Biotechnol 29(8):697-8.

[0548] Stoddard,B.L.(2005). "Homing endonuclease structure and function." Q Rev Biophys 38(1):49-95.

[0549] Tesson,L.,C.Usal,et al.(2011). "Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs." Nat Biotechnol 29(8):695-6.

[0550] Waldmann,H.and G.Hale(2005). "CAMPATH:from concept to clinic." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 360(1461):1707-11.

[0551] Weber,E.,R.Gruetzner,et al.(2011). "Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning." PLoS One 6(5):e19722.

[0552] Zhang,F.,L.Cong,et al.(2011). "Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription." Nat Biotechnol 29(2):149-53.。

	<110> 塞勒克提斯公司 (CELLECTIS)	
	<120> 用于工程化同种异体T细胞以增加在患者中的和/或植入成活率的方法	
	<130> P81501020PCT00	
	<150> PA201570138	
	<151> 2015-03-11	
	<160> 79	
	<170> PatentIn 3.5版	
	<210> 1	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (homo sapiens)	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> B2M TALEN T01靶向序列 (B2M TALEN T01targeting sequence)	
	<400> 1	
[0001]	tctcgtctcgg ttgccttagc tgtgctcggc ctactctctc ttctctggcct ggaggcta	58
	<210> 2	
	<211> 2814	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (artificial sequence)	
	<220>	
	<221> CDS	
	<223> β 2M T01- TALEN -左 (Beta2M T01- TALEN - LEFT)	
	<400> 2	
	atggggcgtc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgtatgt tccagattac	60
	gtatctgata tgcgcgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
	aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt	180
	acacacgcgc acatcgttgc gtttaagcaa caccgcgcag cgttagggac cgtcgtctgc	240
	aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gagcgacac acgaagegat cgttggcgtc	300
	ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgtcttg gagccttgc tcacgggtggc gggagagttg	360
	agaggtecac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcgge	420
	gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgaegggtgc cccgtcaac	480
	ttgaccccc agcagggtgtt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	540
	acgggtccagc ggtgtgtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	600
	gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtcca gggctgttg	660
	ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggccat cggcagccac	720
	gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtgt gtgccaggcc	780
	caeggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	840

[0002]	ctggagacgg	tccagcggt	gttgccggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	900
	caggtggtgg	ccatgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgttgagag	ggtccagcgg	960
	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
	ageaatggcg	gtggcaagca	ggcgtggag	acggctccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
	caggeccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatat	tggtggcaag	1140
	caggecgtgg	agacggtgca	ggcgtgttg	ccggtgtgt	gccaggecca	cggttgacc	1200
	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	aatggtggca	agcaggecgt	ggagacggtc	1260
	cagcggtgt	tgccggtgt	gtgccaggcc	cacggttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1320
	atgccagcc	acgatggcg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggt	gttgccggtg	1380
	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	1440
	ggcaagcagg	cgttgagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1500
	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgtggag	1560
	acggtccagc	ggtgtgtgcc	ggtgtgtgtc	caggeccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	1620
	gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	caggcgtgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1680
	cgggtgtgt	gccaggcccc	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1740
	aatggtggca	agcaggcgt	ggagacggtc	cagcggtgt	tgccggtgt	gtgccaggcc	1800
	cacggttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1860
	ctggagacgg	tccagcggt	gttgccggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	1920
	caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgttgagac	ggtccagcgg	1980
	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
	agcaatggcg	ggcagggcc	ggegtggag	agcattgtg	cccagttate	tcgccctgat	2100
	cggcggttg	ccgcttgac	caacgaccac	ctcgtgcct	tgccctgcct	cggcgggct	2160
	cctgcgtgg	atgcagtga	aaagggttg	gggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
	aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttagggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
	gagtacatcg	agctgatcga	gategcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
	aaggtgatgg	agttctcat	gaaggtgtac	ggtacaggg	gcaagcacct	ggcgggctcc	2400
	aggaagcccc	acggcgccat	ctacaccgtg	ggtccccc	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
	gacaccaagg	cctactccgg	cggtacaaac	ctgcccateg	gccaggecca	cgaaatgcag	2520
	aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
	gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgccggcca	cttcaagggc	2640
	aactacaagg	cccagctgac	caggetgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgcctgtctg	2700
	tccgtggagg	agtcctgat	cggcgccgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gacctggag	2760
	gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814

<210> 3

<211> 2832

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> CDS

<223> β 2M T01 TALEN -右 (Beta2M T01 TALEN -RIGHT)

<400> 3

atgggcgac	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgccgc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatata	gcatctac	gcacgtcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	acgaaggtt	cgttcgacag	tgccgcagca	ccacaggca	180
ctggctcgcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcgttgctg	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgtgtcaa	gtatcaggac	atgatcgag	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctgg	caaacagtgg	tcggcgccac	gcgtcttgga	ggccttgctc	360
acggtggcgg	gagagttgag	aggtecaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgccgt	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcaactg	480
acgggtgccc	cgtcaactt	gaccccgag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatattggt	540
ggcaagcagg	cgttgagac	ggtgcaggcg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	600

	ttgaaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgtgag	660
	acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgtgtgc	caggccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	720
	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgtgg	agacgggtcca	gcggtgttg	780
	ccggtgtgt	gccaggccca	cggttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagccac	840
	gatggcggca	agcaggcgt	ggagacggtc	caggcgtgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	900
	caaggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcgggtg	caagcaggcg	960
	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	1020
	caggtgtgtg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgtggagac	ggccagcgg	1080
	ctgttgccgg	tgtgtgtcca	ggccacggc	ttgacccgg	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
	agccacgatg	gcggaagca	ggcgtgag	acgggtccag	ggtgtgtgc	ggtgtgtgc	1200
	caggccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	1260
	caggcgtg	agacggtgca	ggcgtgttg	ccggtgtgt	gccaggccca	cggcttgacc	1320
	ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	aatggtggca	agcaggcgt	ggagacggtc	1380
	cagcggctgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1440
	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1500
	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	caggtgtgtg	ccatcgccag	ccacgatggc	1560
	ggcaagcagg	cgtggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgtgtgtcca	ggccacggc	1620
	ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgtgag	1680
	acgggtccagc	ggtgtgtgc	caggccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg		1740
	gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	caggcgtgg	agacggtgca	ggcgtgttg	1800
	ccggtgtgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	1860
	aatggtggca	agcaggcgt	ggagacggtc	caggcgtgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	1920
	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	1980
	ctggagacgg	tgcaggcgt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
	caggtgtgtg	ccatcgccag	caatggcggc	ggcaggcgg	cgtggagag	cattgttgcc	2100
	cagttatctc	gccctgatcc	ggcgttgcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtgccttg	2160
	gcctgcctcg	gcgggcgtcc	tgcgttgat	gcagtgaata	agggattggg	ggatcctatc	2220
[0003]	agccgttccc	agctgtgaa	gtccagctg	gaggagaaga	aatccagtt	gaggcacaag	2280
	ctgaagtacg	tgcgccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tgcgccgaa	cagcaccag	2340
	gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
	aagcacctgg	gcggtccag	gaagccgac	ggcgccatct	acaccgtggg	ctccccatc	2460
	gaetacggcg	tgategtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gtacaacct	gcccacggc	2520
	caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
	cccaacgagt	ggtggaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
	tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggtgaacca	catcaccac	2700
	tgaacggcg	ccgtgtgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
	ggcaccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgg	2820
	gccgactgat	aa					2832

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> misc_feature

<223> B2M T02- TALEN靶向序列 (B2M T02- TALEN targeting sequence)

<400> 4

tccaaagatt caggtttact cacgtcatcc agcagagaat ggaaagtcaa

50

<210> 5

- <211> 2814
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (artificial sequence)
 <220>
 <221> CDS
 <223> β 2M T02-TALEN -左 (Beta2M T02-TALEN - LEFT)

<400> 5
 atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgaatgt tccagattac 60
 gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
 aaaccgaagg ttctgttcgac agtggegcag caccacgagg cactggtegg ccacgggttt 180
 acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccggcgag cgtagggagc cgtcgtgtgc 240
 aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300
 ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagttg 360
 agaggtecac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
 gtgaccgcag tggaggcagt geatgcattg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
 ttgaccccgaggcaggttggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 540
 acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacag gcttgacccc ggagcaggtg 600
 ttggccatcg ccagccacga ttggcgcaag caggcgctgg agacgggtcca cggctgtttg 660
 ceggtgctgt gccaggccca cggttgacc cggagcagg ttgtggccat cgccagcaat 720
 attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgcgggtgct gtgccaggcc 780
 cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg 840
 ctggagacgg tgcaggcgct gtgcccgtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgagg 900
 cagggtggtg ccacgccag caataattgt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg 960
 ctgttgccgg tctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcagggtgtt ggccatcgcc 1020
 agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1080
 [0004] caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat ttgtggcaag 1140
 caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc 1200
 cccagcagg ttgtggccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1260
 cagcggtgtg tgcgggtgct gtgccaggcc caccgcttga cccccagca ggtggtggcc 1320
 atcgccagca atggcggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg 1380
 ctgtgccagg cccacggctt gaccccgagg cagggtggtg ccacgccag ccacgatggc 1440
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tctgtgcca ggcccacggc 1500
 ttgaccccgaggcaggtgtt ggccatcgcc agcaatatg ttggcaagca ggcgctggag 1560
 acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg 1620
 gtggccatcg ccagcaataa ttgtggcaag caggcgctgg agacgggtcca geggtgtttg 1680
 ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc cccagcagg ttgtggccat cgccagcaat 1740
 aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgcgggtgct gtgccaggcc 1800
 caccgcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtg caagcaggcg 1860
 ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 1920
 cagggtggtg ccacgccag caatggcggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1980
 ctgttgccgg tctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcagggtgt ggccatcgcc 2040
 agcaatggcg gggcaggccc ggcgctggag agcattgttg ccagttatc tgcctgat 2100
 ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcct ttggcctgct cggcggtgct 2160
 cctgcgctgg atgcagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
 aagtcgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
 gactacatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg 2340
 aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcact ggcggtctc 2400
 aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
 gacaccaagg cctactccgg eggtacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag 2520
 aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
 gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag tctctgttg tgcgggcca cttcaagggc 2640
 aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcca actgcaacgg cgccgtgctg 2700
 tccgtggagg agtccctgat cggcgcgag atgateaagg ccggcaccct gaccctggag 2760
 gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttgc cggccgactg ataa 2814

<210> 6

<211> 2832

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> CDS

<223> β 2M T02-TALEN 右 (Beta2M T02-TALEN RIGHT)

<400> 6

[0005]

```

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc      60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag      120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca      180
ctggteggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccggcagcg      240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgategcag cgttgccaga ggcgacacac      300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggegcac gcgtcttgga ggcccttgetc      360
acgggtggcgg gagagttagg aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag      420
attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtg atgeatggcg caatgcaetg      480
acgggtgccc cgtcaactt gacccccag caggtggtgg ccategccag caataatggt      540
ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tctgtgcca ggcccacggc      600
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag      660
acgggtgcagg cgtgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg      720
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgtcgg agacgggtca cgggctgttg      780
cegggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggccat cgcagcaat      840
ggcgggtggca agcagcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtgt gtgccaggcc      900
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atgccagca atggcgggtg caagcaggcg      960
ctggagacgg tcacagcggt gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccccag      1020
caggtggtgg ccacgccag caatggcggt ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg      1080
ctgttgccgg tctgtgcca ggcccacggc ttgacccgg agcaggtggt ggccatcgcc      1140
agccacgatg gcgcaagca ggcgtggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc      1200
cagggccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag      1260
caggcgtgga agacgggtca ggcgtgttg cgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc      1320
ccggagcagg tgggtggccat cgcagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacggtg      1380
caggcgtgtg tgccggtgt gtgccaggcc cagggcttga cccccagca ggtggtggcc      1440
atgccagca atggcgggtg caagcaggcg ctggagacgg tcacagcggt gttgccgggt      1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccacgccag caatggcggt      1560
ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tctgtgcca ggcccacggc      1620
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcgcaagca ggcgctggag      1680
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg      1740
gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgtgga agacgggtca cggcgtgttg      1800
ccgggtgctg gccaggccca cggcttgacc cggagcagg tgggtggccat cgcagccac      1860
gatggcggca agcagcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccgggtgt gtgccaggcc      1920
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atgccagca atggcgggtg caagcaggcg      1980
ctggagacgg tcacagcggt gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag      2040
caggtggtgg ccacgccag caatggcggc ggacggccgg cgtggagag cattgttgcc      2100
cagttatctc gccctgatcc ggcttggtgc gcgttgacca acgaaccact cgtgccttg      2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatcctate      2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag      2280
ctgaagtagc tgcacacga gtacatcgag ctgategaga tgcgccgaa cagcaccag      2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc      2400
aagcacctgg gcggctccag gaagcccagc ggccgcatct acaccgtggg ctcccccatc      2460
gactacggcg tgatcgtgga caecaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc      2520
cagggccagc aatgcagag gtaegtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac      2580

```

cccaacgagt	ggtggaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggetgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
ggcaccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
gcgactgat	aa					2832

<210> 7

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> misc_feature

<223> B2M T03- TALEN 靶向序列 (B2M T03- TALEN targeting sequence)

<400> 7

ttagctgtgc tcgcgtact etctctttct ggcctggagg ctatcca 47

<210> 8

<211> 2814

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> CDS

<223> β 2M T03-TALEN -左 (Beta2M T03-TALEN - LEFT)

[0006]

<400> 8

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggte	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgccgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	caccggcgag	cgttagggac	cgtcgtgtgc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gagcgacac	acgaagcgat	cgttggcgtc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gagccttgc	tcacgggtgc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caattctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgtcaca	480
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgtggag	540
acggtgcagg	cgtgtgtgcc	ggtgctgtgc	caggcccaag	gcttgacccc	ccagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagcaataa	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtca	gcggctgttg	660
ccggtgetgt	gccaggccca	cggettgcac	ccggagcagg	tgggtggccat	cggcagccac	720
gatggcgcca	agcaggcgct	ggagacggte	cagcggtgtg	tgccgggtgt	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tcagcggt	gttgccgtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	ggcaagcagg	cgtggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgtgtgtcca	ggcccaaggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgtggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggcccaag	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	tgggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacggtcca	gcggtgtgtg	ccggtgtgtg	gccaggccca	cggttgacc	1200
ccggagcagg	tgggtggccat	cggcagccac	gatggcgcca	agcaggcgct	ggagacggtc	1260
cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1320
atgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggt	ggtgcccgtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	1440

ggcaagcagg	cgetggagac	ggteccagegg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccccacg	gcttgacccc	ggagcagggtg	1620
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1680
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1740
aatggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgt	tgcgggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccggagca	ggtgggtggc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tcagcggt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgttgagac	ggtccagegg	1980
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcagggtgt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgcctgat	2100
ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgtcgct	tggcctgct	cgggggcgct	2160
ectgcgctgg	atgcagtga	aaagggattg	gggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	ggggcgctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccc	tcgactacgg	cgtgategtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggtacaaac	ctgcccateg	gccagccga	cgaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaa	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtaccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttctgttctg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggtgaac	caatcacca	actgcaacgg	cgcgctgctg	2700
tccgtggagg	agtcctgat	cggcggcgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gacctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814

<210> 9

[0007]

<211> 2832

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> CDS

<223> β 2M T03-TALEN -右 (Beta2M T03-TALEN -RIGHT)

<400> 9

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggte	atcgataagg	agaccgcccgc	tgccaagtte	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatata	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggt	cgttcgacag	tggcgagca	ccacgaggca	180
ctggctggcc	acgggtttac	acacggcgac	atcggttgcg	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaacc	tcgtgtcaa	gtatcaggac	atgatecgag	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctgg	caaacagtgg	tcggcgcgac	gcgtcttgga	ggccttgctc	360
acgggtggcgg	gagagttgag	aggteccacc	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgcgct	gaccgcagtg	gaggcagtcg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgtcaactt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	540
ggcaagcagg	cgtggagac	ggtccagegg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	600
ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccccacg	gcttgacccc	ggagcagggtg	720
gtggccatcg	ccagcaatat	tggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtgca	ggcgctgttg	780
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	840
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgt	tgcgggtgct	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccggagca	ggtgggtggc	atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	1020
caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	ggcaagcagg	cgttgagac	ggtccagegg	1080
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccgg	agcagggtgt	ggccatcgcc	1140
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	acggtcagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200

caggccccacg	gcttgacccc	ggagcagggtg	gtggccateg	ccageccacga	tggeggcaag	1260
caggcgetgg	agacggteca	gcggetgttg	cegggtgetgt	gccaggccca	cggettgage	1320
ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	ggcgggtggca	agcaggcget	ggagacggtc	1380
cagegggtgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	caagggttga	ccccggagca	ggtgggtggc	1440
atgccagecc	acgatggcgg	caagcaggcg	etggagaegg	tecagegggt	gttgccgggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	cagggtggtgg	ccatcgccag	ccaegatggc	1560
ggcaagcagg	cgetggagac	ggtccagegg	ctgttgccgg	tgetgtgcca	ggccccaggc	1620
ttgaccccg	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaatatgt	gtggcaagca	ggcgctggag	1680
acgggtgcagg	cgetgttgcc	ggtgtgtgtc	caggeccacg	gcttgacccc	ccagcagggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggcgtgtg	agacgggtcca	geggctgttg	1800
cegggtgtgt	gccaggccca	cgcttgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1860
aatggtggca	agcaggcget	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccgggtgt	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccggagca	ggtgggtggc	atgccagecc	acgatggcgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tcacggcgt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
cagggtggtg	ccatcgccag	caatggcggc	ggcaggccgg	cgtggagag	cattgtttgc	2100
cagttatete	gccctgatec	ggcgttggcc	gegttagcca	acgaccacct	cgtegccttg	2160
gectgecteg	gegggegtcc	tgcgttggt	gcagtgaata	agggattggg	ggatcctate	2220
agecgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatecgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtaeg	tgecccacga	gtacatcgag	ctgategaga	tcgcccggaa	cageacccag	2340
gaecgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcaactgg	geggctccag	gaagcccgac	ggcgccatct	acacgtggg	ctcccccate	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gccccatg	2520
cagcccgacg	aatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	ctgttctgtg	2640
tecgcccaet	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggetgaacca	cateaccaac	2700
tgaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatec	gcggcgagat	gateaaggcc	2760
ggcaccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
gecgactgat	aa					2832

[0008]

<210> 10

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> misc_feature

<223> PDCD1_T01

<400> 10

ttctccccag cctgtctgt ggtgaccgaa ggggacaacg ccaccttca

49

<210> 11

<211> 2814

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> CDS

<223> PDCD1_T01-L TALEN

<400> 11

atgggcgate ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgaatg tccagattac

60

	gctatcgata	tcgccgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
	aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
	acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	caccgcgcag	cgtaggggac	cgtcgctgtc	240
	aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gagcgacac	acgaagcgat	cgttggcgte	300
	ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gaggecttgc	tcaeggtggc	gggagagttg	360
	agaggtccac	cgttacagtt	ggacacagge	caacttctca	agattgcaaa	aegtggcgge	420
	gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgaagggtgc	cccgtctaac	480
	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
	acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggeccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	600
	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtctgtg	660
	ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtagccat	cgccagcaat	720
	ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggte	cagcggtgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	780
	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	840
	ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	900
	caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
	ctgttgccgg	tgetgtgcca	ggccccagge	ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
	caggccacgc	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	1140
	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1200
	ceggagcagg	tggtagccat	cgcacgaat	attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	1260
	caggcgctgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	cacgcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1320
	atcgccagca	ataatgggtg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgtgtg	1380
	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	1440
	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggccacggc	1500
	ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	1560
	acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacgc	gcttgacccc	ggagcaggtg	1620
	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1680
	ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtagccat	cgccagcaat	1740
	ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggte	cagcggtgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	1800
	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatgggtg	caagcaggcg	1860
	ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	1920
	eaggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
	ctgttgccgg	tgetgtgcca	ggccccagge	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
	agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgcctgat	2100
	ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgtcgctt	tggcctgcct	cggcgggcgt	2160
	cctgcgctgg	atgcagtga	aaagggtatg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
	aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
	gagtacatcg	agctgatcga	gategcccgg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
	aaggtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	ggcggtctcc	2400
	aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccca	tcgactaegg	cgtgatcgtg	2460
	gacaccaagg	cctactccgg	eggtacaa	ctgcccacg	gccagccga	cgaatgcaag	2520
	aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
	gtgtaccctt	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
	aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
	tcggtggagg	agctcctgat	cggcgcgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gacctggag	2760
	gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814

<210> 12

<211> 2829

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> CDS

<223> PDCD1_T01-R TALEN

<400> 12

atgggcgacg ctaaaaagaa acgtaaggte atcgataagg agaccgcgcg tgccaagtte 60
 gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgetcgg ctacagccag 120
 cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggea 180
 ctggctggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg 240
 ttagggaccg tcgtgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac 300
 gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc 360
 acgggtggcg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420
 attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtcg atgcatggcg caatgcactg 480
 acgggtgccc cgtcaactt gacccccgag caagtcgtcg caatcgccag ccattgatgga 540
 gggaagcaag cctcgaaaac cgtgcagcgg ttgcttctcg tgctctgcca ggcccacggc 600
 cttacccctc agcaggttgt ggccatcgca agtaacggag gaggaagca agecttgagg 660
 acagtgcagc gctgttgtcc cgtgtgtgtc caggcacacg gcctcacacc agagcaggtc 720
 gtggccattg cctcccatga cggggggaaa caggctcttg agaccgtcca gaggtgctcg 780
 cccgtctctc gtcaagctca cggcctgact ccccaacaag ttgtcgccat cgcctctaag 840
 ggcgccggga agcaggeact ggaaacagtg cagagactgc tccctgtgct ttgccaaget 900
 catgggttga ccccccaaca ggtcgtcgtc attgcctcaa acgggggggg caagcagggc 960
 cttgagactg tgcagaggtc gttgccagtg ctgttcagg ctcaagggtc cactccaca 1020
 caggtagtgc caattgccag caaeggcgcg ggaaagcaag ctcttgaaac cgttcaacgc 1080
 ctctgcccgc tgcctgtca ggtccttggt ctgacaccac aacaagtcgt ggccatcgcc 1140
 agtaataatg gcgggaaaca ggtctttgag accgtccaga ggtgctccc agtgctctgc 1200
 caggcacacg ggtgacccc cgagcaggtg gtggctatcg ccagcaatat tgggggcaag 1260
 caggcccttg aaacagtcca ggccctgtcg ccagtgttt gccaggtca cgggtcact 1320
 cccagcagc tegtggcaat cgcctccaac ggcgaggga agcaggtct ggagaccgtg 1380
 cagagactgc tgcctgtctt gtgccagggc caggactca cactgaaca ggtcgtcgcc 1440
 attgcctctc acgatggggg caaacaagcc ctggagacag tgcagcggt gttgcctgtg 1500
 ttgtgccaag cccacggctt gactcctcaa caagtgtcg ccctgcctc aaatggcggc 1560
 ggaaaacaag ctctggagac agtgcagagg ttgtgcccg tctctgcca agcccacggc 1620
 ctgactcccc aacaggtcgt cgcattgcc agcaacaacg gaggaagca ggctctcgaa 1680
 actgtgcagc ggtgtcttc tgtgtgtgt caggtcatg ggtgacccc cgagcaagtg 1740
 gtggctattg cctetaatgg aggaagcaa gcccttgaga cagtcagag gctgttgcca 1800
 gtgtgtgtcc aggcceacgg gctcacacce cagcaggtg tgcctatcg cagtaacaac 1860
 gggggcaaac aggcattgga aaccgtccag cgcctgttc cagtgtctg ccaggcacac 1920
 ggactgacac ccgaacaggt ggtggccatt gcatcccatg atgggggcaa gcaggccctg 1980
 gagaccgtgc agagactcct gccagtgttg tgccaagtc acggcctcac cctcagcaa 2040
 gtgttgcca tcgctcaaa cggggggggc cggcctgcac tggagagcat tgttgcccag 2100
 ttatctcgcc ctgateccgc gttggccgcg ttgaccaacg accacctcgt cgccttgccc 2160
 tgctcggcg ggcgtctgc gctggatgca gtgaaaaagg gattggggga tctatcagc 2220
 cgttcccagc tggtaagtc cgagctggag gagaagaaat ccgagttgag gcacaagctg 2280
 aagtacgtgc ccacagagta catcgagctg atcgagatcg cccggaacag caccaggac 2340
 cgtatccttg agatgaaggt gatggagttc ttcattgaagg tgtacggcta caggggcaag 2400
 cacttgggcg gctccaggaa gcccagcggc gccatctaca ccgtgggtc ccccatcgac 2460
 tacggcgtga tcgtggacac caaggcctac tccggcggt acaacctgcc catcgccag 2520
 gccgacgaaa tgcagaggta cgtggaggag aaccagacca ggaacaagca catcaacccc 2580
 aacgagtgtg ggaaggtgta cccctccagc gtgaccaggt tcaagtctc gtctgtctc 2640
 ggccacttca agggcaacta caaggcccag ctgaccaggc tgaaccacat caccaactgc 2700
 aacggcgccg tctgtccgt ggaggagctc ctgateggcg gcgagatgat caaggccggc 2760
 accctgaccc tggaggaggt gaggaggaag ttcaacaacg gcgagatcaa ctctcgggc 2820
 gactgataa 2829

<210> 13

<211> 49

	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (artificial sequence)	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	PDCD1_T03	
	<400>	13	
		tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagaga	49
	<210>	14	
	<211>	2814	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (artificial sequence)	
	<220>		
	<221>	CDS	
	<223>	PDCD1_T03-L TALEN	
	<400>	14	
[0011]		atgggcgcatc ctaaaaagaa acgtaaggte atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
		gtatctgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagate	120
		aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt	180
		acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccgcgcag cgttagggac cgtcgtgtc	240
		aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgcac acgaagcgat cgttggcgtc	300
		ggcaaacagt ggtecggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtagc gggagagtgt	360
		agaggtccac cgttacagtt ggacacagge caacttctca agattgcaaa acgtggcgge	420
		gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgaatgcac tgacgggtgc ccgctcaac	480
		ttgacccgg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag	540
		acgggtgcagg cgtgtgtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg	600
		gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcgctgttg	660
		ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtagccat cggcagccac	720
		gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcgctgtg tgccggtgct gtgccaggcc	780
		cacggcttga cccccagca ggtgggtggc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg	840
		ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg ccacggctt gaccccgag	900
		caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcg	960
		ctgttgccgg tgcgtgtcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc	1020
		agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgtgtgc	1080
		caggceacag gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag	1140
		caggcgctgg agacggtcca gcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc	1200
		ccccagcagg tggtagccat cggcagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggte	1260
		cagcggtgtg tgcgggtgct gtgccaggcc caggcttga cccccagca ggtggtaggc	1320
		atcgccagca ataattgttg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg	1380
		ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	1440
		ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgtcca ggcccacggc	1500
		ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	1560
		acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	1620
		gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag caggcgctgg agacggtcca gcgctgttg	1680
		ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtagccat cggcagccac	1740
		gatggcggca agcaggcgct ggagacggte cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc	1800
		cacggcttga ccccgagca ggtggtaggc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	1860
		ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg ccacggctt gaccccgag	1920
		caggtggtgg ccatcgccag caatattggt ggcaagcagg cgttgagac ggtgcaggcg	1980
		ctgttgccgg tgcgtgtcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc	2040

agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgccctgat	2100
ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaaccac	ctcgctgcct	tggcctgcct	cggcggggcgt	2160
cctgcgctgg	atgcagtga	aaagggattg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctgggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agetgatcga	gategcccgg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttettcat	gaaggtgtac	ggtacagggg	gcaagcacct	gggcggctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccca	tegactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	ectactccgg	cggtacaaac	ctgcccacgc	gccagggcga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtaccctt	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttctgttctg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggttgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tcggtggagg	agtcctgat	cggcggcgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gacctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggcgcactg	ataa	2814

<210> 15

<211> 2829

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> CDS

<223> PDCD1_T03-R TALEN

<400> 15

[0012]

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgcccgc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatac	gcgatctac	gcaagctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggtt	cgttcgacag	tggcgacagca	ccacgaggea	180
ctggctggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggttgcgt	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgtgtcaa	gtatcaggac	atgatcgacg	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtegg	caaacagtg	tcggcgcaac	gcgtcttggga	ggccttgcctc	360
acgggtggcgg	gagagttgag	aggteccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgggcg	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgtcaactt	gacccccgag	caagtcgtcg	caatcgccag	ccatgatgga	540
gggaagcaag	ccctcgaaac	cgtgcagcgg	ttgcttccctg	tgtcttgcca	ggcccacggc	600
cttaceccctc	agcaggtgg	ggccatcgca	agtaacggag	gaggaaagca	agccttgagg	660
acagtgcagc	gcctgttgcc	cgtgtgtgtg	caggcacacg	gcctcacacc	agagcaggtc	720
gtggccattg	cctcccatga	cggggggaaa	caggtctctg	agaccgtcca	gaggtgctg	780
ccgctcctct	gtcaagctca	cgccctga	ccccacaag	tggctgccat	cgcctctaat	840
ggcgggggga	agcaggaact	ggaaacagtg	cagagaactgc	tcctgtgtgt	ttgccaagct	900
catgggttga	ccccccaaca	ggctgtctgt	attgctctca	acgggggggg	caagcaggec	960
cttgagactg	tgcagaggt	gttgccagtg	ctgtgtcagg	ctcacgggt	cactccacaa	1020
caggtggtcg	caattgccag	caaeggcggc	ggaaagcaag	ctcttgaaac	cgtgcaacgc	1080
ctcttgcctg	tgtctgtca	ggtctatggc	ctgacaccac	aacaagtcgt	ggccatcgcc	1140
agtaataatg	gcgggaaaca	ggctcttgag	accgtccaga	ggctgtctcc	agtgtcttgc	1200
caggcacacg	ggctgacccc	cgagcaggtg	gtggctatcg	ccagcaatat	tgggggcaag	1260
caggcccttg	aaacagtcca	ggccctgctg	ccagtgtttt	gccaggtcca	cgggctcact	1320
ccccagcagg	tcgtggcaat	cgcctccaac	ggcgagggga	agcaggtctt	ggagaccgtg	1380
cagagactgc	tgcctgtctt	gtgccaggcc	cacggactca	cacctgaaca	ggtcgtcgcc	1440
attgcctctc	acgatggggg	caaacaagcc	ctggagacag	tgcagcggt	gttgctgtg	1500
ttgtgccaa	ccccaggtt	gactctctca	caagtgtgtg	ccatcgctc	aaatggcgge	1560
ggaaaacaag	ctctggagac	agtgcagagg	ttgtgtcccg	tcctctgcca	agcccaacggc	1620
ctgactcccc	aacaggtcgt	cgcctatgcc	agcaacaacg	gaggaaagca	ggctctcgaa	1680
actgtgcagc	ggtgtcttcc	tgtgtgtgtg	caggtctatg	ggtgacccc	cgagcaagtg	1740
gtggctattg	cctctaatgg	aggcaagcaa	gccccttgaga	cagtccagag	gtgtttgcca	1800

```

gtgctgtgcc aggeccacgg gctcacaccc cagcaggtgg tcgccatcgc cagtaacaac 1860
ggggggcaaac aggcattgga aaccgtccag cgcctgcttc cagtgtctctg ccaggcacac 1920
ggactgacac ccgaacaggt ggtggccatt gcatcccatg atggggggcaa gcaggccctg 1980
gagaccgtgc agagactcct gccagtgttg tgccaagctc acggcctcac cctcagcaa 2040
gtcgtggcca tcgcctcaaa cgggggggggc cggcctgcac tggagagcat tgttgcccag 2100
ttatctegcc ctgatccggc gttggccgeg ttgaccaacg accacctcgt cgccttggee 2160
tgccctcgcg ggcgtcctgc gctggatgca gtgaaaaagg gattggggga tctatcagc 2220
cgttcccagc tggatgaagtc egagctggag gagaagaaat ccgagttgag gcacaagctg 2280
aagtacgtgc cccacagagta catcgagctg atcgagatcg cccggaacag caccaggac 2340
cgtatcctgg agatgaaggt gatggagtgc ttcatgaagg tgtaeggcta caggggcaag 2400
cacctgggcg gctccaggaa gcccgcgggc gccatctaca ccgtgggctc ccccatcgac 2460
tacggcgatga tctgtggacac caaggectac tccggcggtt acaacctgcc catcgggcag 2520
gccgacgaaa tgcagaggtta cgtggaggag aaccagacca ggaacaagca catcaacccc 2580
aacgagtggt ggaaggtgta cccctccagc gtgaccgagt tcaagttcct gttcgtgtcc 2640
ggccacttca agggcaacta caaggcccag ctgaccaggc tgaaccacat caccaactgc 2700
aaeggcgcgc tgetgtccgt ggaggagctc ctgateggcg gcgagatgat caaggccggc 2760
accctgaccc tggaggaggt gaggaggaag ttcaacaacg gcgagatcaa cttegcggcc 2820
gactgataa 2829

```

<210> 16

<211> 386

<212> PRT

[0013] <213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> MUTAGEN

<223> pCLS27068: CTLA4a 表达质粒 (pCLS27068; CTLA4a expression plasmid)

<400> 16

```

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
1           5           10           15

```

```

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln
                20           25           30

```

```

Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys
35           40           45

```

```

Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu
50           55           60

```

```

Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met
65           70           75           80

```

```

Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr
85           90           95

```

Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met
100 105 110

Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro
115 120 125

Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro
130 135 140

Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
145 150 155 160

His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser
165 170 175

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
180 185 190

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
195 200 205

[0014]

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
210 215 220

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
225 230 235 240

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
245 250 255

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
260 265 270

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
275 280 285

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
290 295 300

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
305 310 315 320

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
325 330 335

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
340 345 350

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
355 360 365

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

Gly Ser
385

<210> 17

<211> 386

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

[0015]

<220>

<221> MUTAGEN

<223> pCLS27066: CTLA4b 表达质粒 (pCLS27066: CTLA4b expression plasmid)

<400> 17

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln
20 25 30

Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys
35 40 45

Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu
50 55 60

Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met
65 70 75 80

Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr
85 90 95

Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met
100 105 110

Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro
115 120 125

Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro
130 135 140

Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
145 150 155 160

His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser
165 170 175

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
180 185 190

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
195 200 205

[0016]

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
210 215 220

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
225 230 235 240

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
245 250 255

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
260 265 270

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
275 280 285

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
290 295 300

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
305 310 315 320

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
325 330 335

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
340 345 350

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
355 360 365

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

Gly Ser
385

<210> 18

<211> 293

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

[0017]

<220>

<221> MUTAGEN

<223> pCLS27069: PDL-1 表达质粒 (pCLS27069: PDL-1 expression plasmid)

<400> 18

Met Gly Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu
1 5 10 15

Leu Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu
20 25 30

Tyr Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln
35 40 45

Leu Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn
50 55 60

Ile Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser
65 70 75 80

Ser Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly
85 90 95

Asn Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val
100 105 110

Tyr Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr
115 120 125

Val Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val
130 135 140

Val Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly
145 150 155 160

Tyr Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu
165 170 175

Ser Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe
180 185 190

Asn Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe
195 200 205

[0018]

Tyr Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu
210 215 220

Leu Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr
225 230 235 240

His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu
245 250 255

Thr Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys
260 265 270

Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu
275 280 285

Glu Glu Thr Gly Ser
290

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

	<213>	HIV-1病毒 (HIV-1 virus)
	<220>	
	<221>	CHAIN
	<223>	来自gp41包膜蛋白的ISU肽n? (ISU peptide n? from gp41 env protein)
	<400>	19
		Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp
		1 5 10
	<210>	20
	<211>	14
	<212>	PRT
	<213>	HIV-1病毒 (HIV-1 virus)
	<220>	
	<221>	CHAIN
	<223>	来自gp41包膜蛋白的ISU肽n? (ISU peptide n? from gp41 env protein)
	<400>	20
		Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp
		1 5 10
[0019]	<210>	21
	<211>	14
	<212>	PRT
	<213>	HIV-1 病毒 (HIV-1 virus)
	<220>	
	<221>	CHAIN
	<223>	来自gp41包膜蛋白的ISU肽n? (ISU peptide n? from gp41 env protein)
	<400>	21
		Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Ala Asp
		1 5 10
	<210>	22
	<211>	14
	<212>	PRT
	<213>	HIV-1病毒 (HIV-1 virus)
	<220>	
	<221>	CHAIN
	<223>	来自gp41包膜蛋白的ISU肽n? (ISU peptide n? from gp41 env protein)
	<400>	22
		Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Ala Asp
		1 5 10

Leu Gln Ala Arg Val Thr Ala Ile Glu Tyr Leu Ala Asp
1 5 10

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> HIV-2病毒 (HIV-2 virus)

<220>

<221> CHAIN

<223> 来自gp41包膜蛋白的ISU肽n? (ISU peptide n? from gp41 env protein)

<400> 27

Leu Gln Ala Arg Val Thr Ala Ile Glu Lys Tyr Leu Gln Asp
1 5 10

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> HIV-2病毒 (HIV-2 virus)

<220>

<221> CHAIN

[0021] <223> 来自gp41包膜蛋白的ISU肽n? (ISU peptide n? from gp41 env protein)

<400> 28

Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Gln His
1 5 10

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> HIV-2病毒 (HIV-2 virus)

<220>

<221> CHAIN

<223> 来自gp41包膜蛋白的ISU肽n? (ISU peptide n? from gp41 env protein)

<400> 29

Leu Gln Ala Arg Val Thr Ala Ile Glu Tyr Leu Ala His
1 5 10

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> HIV-2病毒 (HIV-2 virus)

<220>

- <221> CHAIN
 <223> 来自gp41包膜蛋白的ISU肽n? (ISU peptide n? from gp41 env protein)
 <400> 30
 Leu Gln Ala Arg Val Thr Ala Ile Glu Lys Tyr Leu Gln His
 1 5 10
- <210> 31
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> SIV 病毒 (SIV virus)
- <220>
 <221> CHAIN
 <223> 来自gp41包膜蛋白的ISU肽 (ISU peptide from gp41 env protein)
 <400> 31
 Leu Gln Ala Arg Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp
 1 5 10
- <210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> MoMuLV病毒 (MoMuLV virus)
- [0022] <220>
 <221> CHAIN
 <223> 来自gp41包膜蛋白的ISU肽 (ISU peptide from gp41 env protein)
 <400> 32
 Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Leu Lys Glu
 1 5 10
- <210> 33
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> HTLV-I, -2 病毒 (HTLV-I, -2 virus)
- <220>
 <221> CHAIN
 <223> 来自gp41包膜蛋白的ISU肽 (ISU peptide from gp41 env protein)
 <400> 33
 Ala Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Trp Glu Gln
 1 5 10
- <210> 34
 <211> 14

<212> PRT
 <213> MPMV, SRV-1病毒 (MPMV, SRV-1 virus)
 <220>
 <221> CHAIN
 <223> 来自gp41包膜蛋白的ISU肽 (ISU peptide from gp41 env protein)

<400> 34
 Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Thr Ala Glu Gln
 1 5 10

<210> 35

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Syncitin 1病毒 (Syncitin 1 virus)

<220>
 <221> CHAIN
 <223> 来自gp41包膜蛋白的ISU肽 (ISU peptide from gp41 env protein)

<400> 35
 Leu Gln Asn Arg Arg Ala Leu Asp Leu Leu Thr Ala Glu Arg
 1 5 10

[0023] <210> 36

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Syncitin 2 病毒 (Syncitin 2 virus)

<220>
 <221> CHAIN
 <223> 来自gp41包膜蛋白的ISU肽 (ISU peptide from gp41 env protein)

<400> 36
 Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Met Leu Thr Ala Ala Gln
 1 5 10

<210> 37

<211> 14
 <212> PRT
 <213> HERV-K病毒 (HERV-K virus)

<220>
 <221> CHAIN
 <223> 来自gp41包膜蛋白的ISU肽 (ISU peptide from gp41 env protein)

<400> 37
 Leu Ala Asn Gln Ile Asn Asp Leu Arg Gln Thr Val Ile Trp
 1 5 10

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> FELV病毒 (FELV virus)

<220>

<221> CHAIN

<223> 来自gp41包膜蛋白的ISU肽 (ISU peptide from gp41 env protein)

<400> 38

Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Ile Leu Phe Leu Gln Glu
1 5 10

<210> 39

<211> 526

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> MUTAGEN

<223> 嵌合B2M-UL18 (Chimeric B2M-UL18)

<400> 39

[0024] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu
20 25 30

Leu Ser Leu Ser Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln
35 40 45

Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn
50 55 60

Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu
65 70 75 80

Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe
85 90 95

Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro
100 105 110

Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser

	115	120	125	
	Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser 130 135 140			
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met 145 150 155 160			
	Thr Met Trp Cys Leu Thr Leu Phe Val Leu Trp Met Leu Arg Val Val 165 170 175			
	Gly Met His Val Leu Arg Tyr Gly Tyr Thr Gly Ile Phe Asp Asp Thr 180 185 190			
	Ser His Met Thr Leu Thr Val Val Gly Ile Phe Asp Gly Gln His Phe 195 200 205			
	Phe Thr Tyr His Val Asn Ser Ser Asp Lys Ala Ser Ser Arg Ala Asn 210 215 220			
[0025]	Gly Thr Ile Ser Trp Met Ala Asn Val Ser Ala Ala Tyr Pro Thr Tyr 225 230 235 240			
	Leu Asp Gly Glu Arg Ala Lys Gly Asp Leu Ile Phe Asn Gln Thr Glu 245 250 255			
	Gln Asn Leu Leu Glu Leu Glu Ile Ala Leu Gly Tyr Arg Ser Gln Ser 260 265 270			
	Val Leu Thr Trp Thr His Glu Cys Asn Thr Thr Glu Asn Gly Ser Phe 275 280 285			
	Val Ala Gly Tyr Glu Gly Phe Gly Trp Asp Gly Glu Thr Leu Met Glu 290 295 300			
	Leu Lys Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Gly Pro Asn Tyr Glu Ile Ser 305 310 315 320			
	Trp Leu Lys Gln Asn Lys Thr Tyr Ile Asp Gly Lys Ile Lys Asn Ile 325 330 335			
	Ser Glu Gly Asp Thr Thr Ile Gln Arg Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Cys			

	340	345	350
	Thr Gln Trp Ser Val Ile Tyr Ser Gly Phe Gln Thr Pro Val Thr His 355 360 365		
	Pro Val Val Lys Gly Gly Val Arg Asn Gln Asn Asp Asn Arg Ala Glu 370 375 380		
	Ala Phe Cys Thr Ser Tyr Gly Phe Phe Pro Gly Glu Ile Asn Ile Thr 385 390 395 400		
	Phe Ile His Tyr Gly Asn Lys Ala Pro Asp Asp Ser Glu Pro Gln Cys 405 410 415		
	Asn Pro Leu Leu Pro Thr Phe Asp Gly Thr Phe His Gln Gly Cys Tyr 420 425 430		
	Val Ala Ile Phe Cys Asn Gln Asn Tyr Thr Cys Arg Val Thr His Gly 435 440 445		
[0026]	Asn Trp Thr Val Glu Ile Pro Ile Ser Val Thr Ser Pro Asp Asp Ser 450 455 460		
	Ser Ser Gly Glu Val Pro Asp His Pro Thr Ala Asn Lys Arg Tyr Asn 465 470 475 480		
	Thr Met Thr Ile Ser Ser Val Leu Leu Ala Leu Leu Leu Cys Ala Leu 485 490 495		
	Leu Phe Ala Phe Leu His Tyr Phe Thr Thr Leu Lys Gln Tyr Leu Arg 500 505 510		
	Asn Leu Ala Phe Ala Trp Arg Tyr Arg Lys Val Arg Ser Ser 515 520 525		
	<210> 40		
	<211> 310		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列 (artificial sequence)		
	<220>		
	<221> MUTAGEN		
	<223> SP-MICAed		

<400> 40
 Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
 1 5 10 15

 Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Glu Pro His Ser Leu Arg
 20 25 30

 Tyr Asn Leu Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly Ser Val Gln Ser Gly Phe
 35 40 45

 Leu Thr Glu Val His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu Arg Cys Asp Arg
 50 55 60

 Gln Lys Cys Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala Glu Asp Val Leu
 65 70 75 80

 Gly Asn Lys Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg Asp Leu Thr Gly Asn Gly
 85 90 95

 Lys Asp Leu Arg Met Thr Leu Ala His Ile Lys Asp Gln Lys Glu Gly
 100 105 110

 [0027]
 Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile His Glu Asp Asn
 115 120 125

 Ser Thr Arg Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu
 130 135 140

 Ser Gln Asn Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr Met Pro Gln Ser Ser Arg
 145 150 155 160

 Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Asp Ala
 165 170 175

 Met Lys Thr Lys Thr His Tyr His Ala Met His Ala Asp Cys Leu Gln
 180 185 190

 Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Val Leu Arg Arg Thr Val
 195 200 205

 Pro Pro Met Val Asn Val Thr Arg Ser Glu Ala Ser Glu Gly Asn Ile
 210 215 220

Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp Asn Ile Thr Leu
225 230 235 240

Ser Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asp Thr Gln Gln Trp
245 250 255

Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala
260 265 270

Thr Arg Ile Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu
275 280 285

His Ser Gly Asn His Ser Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Val Leu
290 295 300

Val Leu Gln Ser His Trp
305 310

<210> 41

[0028]

<211> 313

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> MUTAGEN

<223> SP-MICBed

<400> 41

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Glu Pro His Ser Leu
20 25 30

Arg Tyr Asn Leu Met Val Leu Ser Gln Asp Glu Ser Val Gln Ser Gly
35 40 45

Phe Leu Ala Glu Gly His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu Arg Tyr Asp
50 55 60

Arg Gln Lys Arg Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala Glu Asp Val
65 70 75 80

Leu Gly Ala Lys Thr Trp Asp Thr Glu Thr Glu Asp Leu Thr Glu Asn
85 90 95

Gly Gln Asp Leu Arg Arg Thr Leu Thr His Ile Lys Asp Gln Lys Gly
100 105 110

Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile His Glu Asp
115 120 125

Ser Ser Thr Arg Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe
130 135 140

Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Gln Glu Ser Thr Val Pro Gln Ser Ser
145 150 155 160

Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Thr Asn Phe Trp Lys Glu Asp
165 170 175

Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr Arg Ala Met Gln Ala Asp Cys Leu
180 185 190

[0029]

Gln Lys Leu Gln Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Ala Ile Arg Arg Thr
195 200 205

Val Pro Pro Met Val Asn Val Thr Cys Ser Glu Val Ser Glu Gly Asn
210 215 220

Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Ser Phe Tyr Pro Arg Asn Ile Thr
225 230 235 240

Leu Thr Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asn Thr Gln Gln
245 250 255

Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val
260 265 270

Ala Thr Arg Ile Arg Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met
275 280 285

Glu His Ser Gly Asn His Gly Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Val
290 295 300

Leu Val Leu Gln Ser Gln Arg Thr Asp
305 310

<210> 42

<211> 209

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> MUTAGEN

<223> SP-ULBP1ed

<400> 42

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Gly Trp Val Asp Thr His
20 25 30

Cys Leu Cys Tyr Asp Phe Ile Ile Thr Pro Lys Ser Arg Pro Glu Pro
35 40 45

[0030]

Gln Trp Cys Glu Val Gln Gly Leu Val Asp Glu Arg Pro Phe Leu His
50 55 60

Tyr Asp Cys Val Asn His Lys Ala Lys Ala Phe Ala Ser Leu Gly Lys
65 70 75 80

Lys Val Asn Val Thr Lys Thr Trp Glu Glu Gln Thr Glu Thr Leu Arg
85 90 95

Asp Val Val Asp Phe Leu Lys Gly Gln Leu Leu Asp Ile Gln Val Glu
100 105 110

Asn Leu Ile Pro Ile Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys
115 120 125

Glu His Glu Ala His Gly His Gly Arg Gly Ser Trp Gln Phe Leu Phe
130 135 140

Asn Gly Gln Lys Phe Leu Leu Phe Asp Ser Asn Asn Arg Lys Trp Thr
145 150 155 160

Ala Leu His Pro Gly Ala Lys Lys Met Thr Glu Lys Trp Glu Lys Asn
165 170 175

Arg Asp Val Thr Met Phe Phe Gln Lys Ile Ser Leu Gly Asp Cys Lys
180 185 190

Met Trp Leu Glu Glu Phe Leu Met Tyr Trp Glu Gln Met Leu Asp Pro
195 200 205

Thr

<210> 43

<211> 211

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> MUTAGEN

<223> SP-ULBP2ed

<400> 43

[0031]

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Gly Arg Ala Asp Pro His
20 25 30

Ser Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro
35 40 45

Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His
50 55 60

Tyr Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro Leu Gly Lys
65 70 75 80

Lys Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro Val Leu Arg
85 90 95

Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Arg Asp Ile Gln Leu Glu
100 105 110

Asn Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys

115	120	125
Glu Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln Phe Ser Phe		
130	135	140
Asp Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg Met Trp Thr		
145	150	155
Thr Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp		
165	170	175
Lys Val Val Ala Met Ser Phe His Tyr Phe Ser Met Gly Asp Cys Ile		
180	185	190
Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro		
195	200	205
Ser Ala Gly		
210		

[0032]

<210> 44
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (artificial sequence)

 <220>
 <221> MUTAGEN
 <223> SP-ULBP3ed

 <400> 44
 Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
 1 5 10 15

 Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Asp Ala His Ser Leu Trp
 20 25 30

 Tyr Asn Phe Thr Ile Ile His Leu Pro Arg His Gly Gln Gln Trp Cys
 35 40 45

 Glu Val Gln Ser Gln Val Asp Gln Lys Asn Phe Leu Ser Tyr Asp Cys
 50 55 60

 Gly Ser Asp Lys Val Leu Ser Met Gly His Leu Glu Glu Gln Leu Tyr
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Ala Trp Gly Lys Gln Leu Glu Met Leu Arg Glu Val Gly
85 90 95

Gln Arg Leu Arg Leu Glu Leu Ala Asp Thr Glu Leu Glu Asp Phe Thr
100 105 110

Pro Ser Gly Pro Leu Thr Leu Gln Val Arg Met Ser Cys Glu Cys Glu
115 120 125

Ala Asp Gly Tyr Ile Arg Gly Ser Trp Gln Phe Ser Phe Asp Gly Arg
130 135 140

Lys Phe Leu Leu Phe Asp Ser Asn Asn Arg Lys Trp Thr Val Val His
145 150 155 160

Ala Gly Ala Arg Arg Met Lys Glu Lys Trp Glu Lys Asp Ser Gly Leu
165 170 175

Thr Thr Phe Phe Lys Met Val Ser Met Arg Asp Cys Lys Ser Trp Leu
180 185 190

[0033]

Arg Asp Phe Leu Met His Arg Lys Lys Arg Leu Glu Pro Thr
195 200 205

<210> 45

<211> 221

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> MUTAGEN

<223> SP-N2DL4ed

<400> 45

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met His Ser Leu Cys Phe Asn
20 25 30

Phe Thr Ile Lys Ser Leu Ser Arg Pro Gly Gln Pro Trp Cys Glu Ala
35 40 45

Gln Val Phe Leu Asn Lys Asn Leu Phe Leu Gln Tyr Asn Ser Asp Asn
50 55 60

Asn Met Val Lys Pro Leu Gly Leu Leu Gly Lys Lys Val Tyr Ala Thr
65 70 75 80

Ser Thr Trp Gly Glu Leu Thr Gln Thr Leu Gly Glu Val Gly Arg Asp
85 90 95

Leu Arg Met Leu Leu Cys Asp Ile Lys Pro Gln Ile Lys Thr Ser Asp
100 105 110

Pro Ser Thr Leu Gln Val Glu Met Phe Cys Gln Arg Glu Ala Glu Arg
115 120 125

Cys Thr Gly Ala Ser Trp Gln Phe Ala Thr Asn Gly Glu Lys Ser Leu
130 135 140

Leu Phe Asp Ala Met Asn Met Thr Trp Thr Val Ile Asn His Glu Ala
145 150 155 160

[0034]

Ser Lys Ile Lys Glu Thr Trp Lys Lys Asp Arg Gly Leu Glu Lys Tyr
165 170 175

Phe Arg Lys Leu Ser Lys Gly Asp Cys Asp His Trp Leu Arg Glu Phe
180 185 190

Leu Gly His Trp Glu Ala Met Pro Glu Pro Thr Val Ser Pro Val Asn
195 200 205

Ala Ser Asp Ile His Trp Ser Ser Ser Ser Leu Pro Asp
210 215 220

<210> 46

<211> 224

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> MUTAGEN

<223> SP-RET1Ged

<400> 46

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Gly Leu Ala Asp Pro His
20 25 30

Ser Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro
35 40 45

Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His
50 55 60

Tyr Asp Cys Gly Ser Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro Leu Gly Lys
65 70 75 80

Lys Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro Val Leu Arg
85 90 95

Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Leu Asp Ile Gln Leu Glu
100 105 110

[0035]

Asn Tyr Ile Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys
115 120 125

Glu Gln Lys Ala Glu Gly His Gly Ser Gly Ser Trp Gln Leu Ser Phe
130 135 140

Asp Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Asn Arg Met Trp Thr
145 150 155 160

Thr Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp
165 170 175

Lys Asp Met Thr Met Ser Phe His Tyr Ile Ser Met Gly Asp Cys Thr
180 185 190

Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro
195 200 205

Ser Ala Gly Ala Pro Pro Thr Met Ser Ser Gly Thr Ala Gln Pro Arg
210 215 220

<210> 47
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (artificial sequence)
 <220>
 <221> MUTAGEN
 <223> SP-RAETILed
 <400> 47
 Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Arg Arg Asp Asp Pro His
 20 25 30
 Ser Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro
 35 40 45
 Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His
 50 55 60
 [0036] Tyr Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro Leu Gly Lys
 65 70 75 80
 Lys Leu Asn Val Thr Met Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro Val Leu Arg
 85 90 95
 Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Leu Asp Ile Gln Leu Glu
 100 105 110
 Asn Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys
 115 120 125
 Glu Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln Phe Ser Ile
 130 135 140
 Asp Gly Gln Thr Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg Met Trp Thr
 145 150 155 160
 Thr Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp
 165 170 175
 Lys Asp Val Ala Met Ser Phe His Tyr Ile Ser Met Gly Asp Cys Ile

	180	185	190
	Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro 195200205		
	Ser Ala Gly 210		
	<210> 48		
	<211> 9		
	<212> PRT		
	<213> HIV-1 病毒 (HIV-1 virus)		
	<220>		
	<221> CHAIN		
	<223> FP多肽 (FP polypeptide)		
	<400> 48		
	Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly 15		
[0037]	<210> 49		
	<211> 9		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列 (artificial sequence)		
	<220>		
	<221> CHAIN		
	<223> FP多肽 (FP polypeptide)		
	<400> 49		
	Ala Gly Phe Gly Leu Leu Leu Gly Phe 15		
	<210> 50		
	<211> 9		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列 (artificial sequence)		
	<220>		
	<221> CHAIN		
	<223> FP多肽 (FP polypeptide)		
	<400> 50		
	Ala Gly Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly 15		

	<210>	51	
	<211>	59	
	<212>	DNA	
	<213>	智人 (Homo sapiens)	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	靶TRAC (Target TRAC)	
	<400>	51	
		tgatcctctt gteccacaga tateccagaac cctgaccctg ccgtgtacca gctgagaga	59
	<210>	52	
	<211>	2832	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (artificial sequence)	
	<220>		
	<221>	CDS	
	<223>	TALEN TRAC 左 (TALEN TRAC LEFT)	
	<400>	52	
[0038]		atgggcgacg ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgcgcg tgccaagttc	60
		gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
		cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttegacag tggcgacaga ccacgaggca	180
		ctggctcgcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccggcagcg	240
		ttagggaacc tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgacg cgttgccaga ggcgacacac	300
		gaagcgatcg ttggcgctgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc	360
		acgggtggcg gagagttag aggtccaccg ttacagttag acacaggcca acttctcaag	420
		attgcaaaac gtggcggtcg gaccgcagtg gaggcagtg atgcatggcg caatgcactg	480
		acgggtgccc cgtcaactt gaccccgag caggtggtgg ccacgccag ccacgatggc	540
		ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg ctgttgccgg tctgtgcca ggcccacggc	600
		ttgaccccc agcaggtggg ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag	660
		acgggtccag ggtgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg	720
		gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtgttg	780
		ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc cggagcagg ttgtggccat cggcagcaat	840
		attggtggca agcagcgct ggagacgggt caggcgctgt tgcgggtgt gtgccagggc	900
		caaggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataattgttg caagcagggc	960
		ctggagacgg tccagcggt gtgtccgggt ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag	1020
		caggtggtgg ccacgatggc ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg	1080
		ctgttgccgg tctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggg ggccatcgc	1140
		agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtgtgtgc ggtgtgtgc	1200
		caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag	1260
		caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg ccggtgtgt gccaggccca cggttgacc	1320
		ccccagcagg ttgtggccat cggcagcaat aatggtggca agcagcgct ggagacggtc	1380
		cagcggtgt tgcgggtgt gtgccaggcc caggttga cccccagca ggtggtggcc	1440
		atcgccagca atggcggtgg caagcagggc ctggagacgg tccagcggt gttgccgggtg	1500
		ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccacgccag caatattggt	1560
		ggcaagcagg cgttgagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tctgtgcca ggcccacggc	1620
		ttgaccccg agcaggtggg ggccatcgcc agccacgat gcggcaagca ggcgctggag	1680
		acgggtccag ggtgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg	1740
		gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtga ggcgctgtg	1800

ecggtgctgt	gccaggccca	cggettggacc	ecggagcagg	tggtggccat	cgccagccac	1860
gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggte	cagcggetgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	1920
caaggcttga	ccccccagca	ggtgggtggc	atgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tecaggcgct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
caggtgggtg	ccatgccag	caatggcgge	ggcaggccgg	cgttgagag	catgtgtgce	2100
cagttatctc	gccctgatec	ggcgttgccc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtgccttg	2160
gcctgcctcg	gcggcgctcc	tgcctggat	gcagtgaata	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtaag	tgcctcacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgcccggaa	cagcaccacg	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccagc	ggcgccatct	acaccgtggg	ctcccccatc	2460
gaactacggc	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccacggcg	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tcgggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccac	2700
tgaacggcg	cgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
ggcaccctga	cctggaggga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgeg	2820
gcgactgat	aa					2832

<210> 53

<211> 2814

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> CDS

[0039]

<223> TALEN TRAC 右 (TALEN TRAC RIGHT)

<400> 53

atgggcgate	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgattacc	catacgatgt	tecagattac	60
gctategata	tegccgatct	acgcaegctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagate	120
aaaccgaagg	ttegttegac	agtggcgag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	caccggcgag	cgttagggac	cgtcgtgtgc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttgccgtc	300
ggcaaacagt	ggteggcgcc	acgcgctctg	gaggeettgc	tcacgggtgc	gggagagttg	360
agaggtecac	cgttacagtt	ggacacagge	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcattg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgtcaac	480
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgtggag	540
acggteecag	ggetgttgcc	ggtgctgtgc	caggccccag	gettgaaccc	ccagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggaag	caggcgctgg	agacgggtcc	gcggctgttg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggettggacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	720
ggcggtgga	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	780
caaggcttga	ccccggagca	ggtgggtggc	atgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tcaggcggt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	900
caggtgggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgtggagag	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgtggag	acggteacgc	ggtgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggccccag	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatat	tggtaggcaag	1140
caggcgctgg	agacggtgca	ggcgtgttg	cgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1200
ccggagcagg	tggtagccat	cgccagccac	gatggcgga	agcaggcgct	ggagacggte	1260
cagcggtgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	cagcgcttga	ccccggagca	ggtgggtggc	1320
atgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	1440
ggcaagcagg	cgtggagac	ggteacggc	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	1500

ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acgggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccaag	gcttgacccc	ccagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1680
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1740
attggtggca	ageaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tggcggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccggtg	1920
cagggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgtggagac	ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	ggcgagggc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgccctgat	2100
ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgctgcct	tggcctgcct	cggcgggcgt	2160
cctgcgctgg	atgcagtga	aaagggattg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgacga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aagggtgatgg	agttcttcat	gaagggtgac	ggctacaggg	gcaagcacct	gggcggctcc	2400
aggaagcccc	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccca	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggtacaaac	ctgcccacg	gccaggccga	cgaatgcag	2520
aggtagctgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttctgttctg	tgcccgcca	cttcaagggc	2640
aaetacaagg	cccagctgac	caggetgaac	caatcacca	actgcaacgg	cggcgtgctg	2700
tccgtggagg	agtcctgat	cggcgggcag	atgateaagg	ccggcaccct	gacctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814

<210> 54

<211> 49

<212> DNA

[0040]

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> misc_feature

<223> 靶TRAC-T01 (Target TRAC-T01)

<400> 54

ttgtcccaca gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgaga

49

<210> 55

<211> 2814

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> CDS

<223> TALEN TRAC T01 左 (TALEN TRAC T01 LEFT)

<400> 55

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgattacc	catacagatgt	tecagattac	60
gctatcgata	tcgcccagct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	caetggctgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagecaa	caccggcgag	cgtagggac	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgte	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gaggecttgc	tcacgggtgg	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420

98

	ctgggtcgcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcgttgctg	taagccaaca	cccggcagcg	240
	ttagggaacc	tcgtgtcaa	gtatcaggac	atgatcgag	cgttgccaga	ggcgacacac	300
	gaagcgatcg	ttggcgtcgg	caaacagtgg	tccggcgac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
	acgggtggcg	gagagttgag	aggteccacg	ttacagtgg	acacaggcca	acttctcaag	420
	attgcaaaac	gtggcggcgt	gaccgcagtg	gaggecagtc	atgcatggcg	caatgcaetg	480
	acgggtgccc	cgtcaactt	gaccccgagg	caggtggtgg	ccatcgccag	ccaegatggc	540
	ggcaagcagg	cgttgagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	600
	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
	acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggeccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	720
	gtggccatcg	ccagccacga	tggeggcaag	caggecgtgg	agacggteca	gcggctgttg	780
	ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	840
	attggtggca	agcaggcgct	ggagacggtg	caggcgctgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	900
	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	960
	ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	1020
	caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgttgagac	ggtccagcgg	1080
	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggccccaggg	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
	caggeccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	tgggtggcaag	1260
	caggecgtgg	agacggteca	cggctgtttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1320
	ccccagcagg	tgggtggccat	cgecageaat	aatggtggca	agcaggecgt	ggagacggte	1380
	cagcggtgtg	tgcgggtgt	gtgccaggcc	cacggttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1440
	atcgccagca	atggcgggtg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	1500
	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	caggtggtgg	ccatcgccag	caatattggt	1560
	ggcaagcagg	cgttgagac	ggtgcaggcg	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	1620
	ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	1680
	acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggeccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	1740
	gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	caggecgtgg	agacggtgca	ggcgctgttg	1800
[0042]	ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgcacgccac	1860
	gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	1920
	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1980
	ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
	eaggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggc	ggcaggccgg	cgttgagag	cattgttgcc	2100
	cagttatctc	gccctgatcc	ggcggtggcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtgccttg	2160
	gcctgcctcg	gcgggcgtcc	tgcgctggat	gcagtgaana	agggattggg	ggatcctatc	2220
	agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
	ctgaagtaag	tgcgccacga	gtacatcgag	ctgategaga	tcgcccggaa	cagcaccag	2340
	gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
	aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccagc	ggcgccatct	acaccggtgg	ctcccccatc	2460
	gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gtacaacct	gcccacggc	2520
	cagggcgagc	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
	cccaacaggt	ggtggaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agtteaagtt	cctgttctgt	2640
	tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
	tgcaacggcg	cgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
	ggcaccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
	gccactgat	aa					2832

<210> 57

<211> 49

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> misc feature

<223> 靶TRAC-T02 (Target TRAC-T02)

	<400> 57 tttagaaagt tcctgtgatg tcaagctggt cgagaaaagc tttgaaaca	49
	<210> 58	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> misc feature	
	<223> 靶TRAC-T03 (Target TRAC-T03)	
	<400> 58 tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc gattttgatt ctcaaacaa	49
	<210> 59	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> misc feature	
	<223> 靶TRAC-T04 (Target TRAC-T04)	
[0043]	<400> 59 tatatcacag acaaaactgt gctagacatg aggtctatgg acttcaaga	49
	<210> 60	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> misc feature	
	<223> 靶TRAC-T05 (Target TRAC-T05)	
	<400> 60 tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaa	49
	<210> 61	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<220>	
	<221> misc feature	
	<223> 靶TRBC_T01 (Target TRBC_T01)	

<400> 61			
tgtgtttgag	ccatcagaag	cagagatctc	ccacacccaa aaggccaca
<210> 62			
<211> 2814			
<212> DNA			
<213> 人工序列 (artificial sequence)			
<220>			
<221> CDS			
<223> TALEN TRBC_T01 左 (TALEN TRBC_T01 LEFT)			
<400> 62			
atgggagatc	ctaaaaagaa	acgtaaaggtc	atcgattacc catacgaatgt tccagattac 60
getategata	tgccegatct	acgcacgctc	ggctacagcc agcagcaaca ggagaagate 120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgagc	caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	caccggcgag cgtagggac cgtcgtctgc 240
aagtatcagg	acatgatcgc	agegttgcca	gagcgacac acgaagegat cgttggcgte 300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gagccettgc tcacgggtggc gggagagttg 360
agaggttccg	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccc	agcaggttgt	ggccatcgcc	agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 540
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	cagggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 600
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	cagggcgtgg agacgggtcca gcggtgttg 660
ccggtgtctgt	gccaggccca	cggttgacc	ccccagcagg tggtagccat cgcagcaat 720
[0044] aatgggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg tgccggtgtg gtgccaggcc 780
cacggcttga	ccccccagca	ggtgggtggc	atgccagca atggcgggtg caagcaggcg 840
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccggtg	ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 900
caggtggttg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg 960
ctgttgccgg	tgtgtgtcca	ggcccacggc	ttgaccccc agcaggttgt ggccatcgcc 1020
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgttgag	acgggtccagc ggtgtgtgccc ggtgctgtgc 1080
caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag 1140
caggcgttg	agacgttcca	gcggtgtgtg	ccggtgtgtg gccaggccca cggcttgacc 1200
ccggagcagg	tggtagccat	cgcagcaat	attggtggca agcaggcgct ggagacgggtg 1260
caggcgtgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	cacggcttga cccccagca ggtggtggcc 1320
atgccagca	ataatggttg	caagcaggcg	ctggagacgg tccagcggtc gttgccggtg 1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccggag	caggtggttg ccatgccag ccacgatggc 1440
ggcaagcagg	cgttgagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg tgtgtgtcca ggcccacggc 1500
ttgaccccgg	agcaggttgt	ggccatcgcc	agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 1560
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	cagggcccacg gottgacccc ggagcaggtg 1620
gtggccatcg	ccagcaatat	tggtaggcaag	cagcgcttg agacgggtgca ggcgctgttg 1680
ccggtgtgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg tggtagccat cgcagcaat 1740
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg tgccgggtgt gtgccaggcc 1800
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 1860
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccggtg	ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag 1920
caggtggttg	ccatcgccag	caatatgtgt	ggcaagcagg cgttgagac ggtgcaggcg 1980
ctgttgccgg	tgtgtgtcca	ggcccacggc	ttgacccctc agcaggttgt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgttgag	agcattgttg cccagttatc tgcctgat 2100
ccggcgttgg	ccgcttgac	caacgaccac	ctcgtcgctc tggcctgctc cggcggcgct 2160
cctgcgttg	atgcagtga	aaagggattg	ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtacatcg	agctgatcga	gategcccgg	aacagcacc aggaccgtat cctggagatg 2340
aaggtgatgg	agttctcat	gaaggtgtac	ggctacagg gcaagcacc ggccggctcc 2400

aggaagcccc	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccc	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggtacaaac	ctgcccacg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	acccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtecggtcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggtgaac	cacataacca	actgcaacgg	cgcctgtctg	2700
tcctgtggagg	agctectgat	cggcggtgag	atgateaagg	cgggcacccct	gacctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cgcccgactg	ataa	2814

<210> 63

<211> 2832

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> CDS

<223> TALEN TRBC T01 右 (TALEN TRBC T01 RIGHT)

<400> 63

[0045]

atgggcgacg	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgcgcg	tgccaagtgc	60
gagagacagc	acatggacag	categatate	gccgatctac	gcacgtctcg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggt	cgttcgacag	tggtgcagca	ccacgaggca	180
ctggctggcc	acgggtttac	acaecggcac	atcgttgcgt	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaacc	tcgtgtcaa	gtatcaggac	atgategcag	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcgg	caaacagtgg	tcggcgccac	gcgtcttgga	ggccttgcct	360
acgggtggcg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcggtgt	gacgcagctg	gaggcagctg	atgcattggc	caatgcaact	480
acgggtgccc	cgtcaacttt	gacccccag	caggtggtgg	ccatgcgcag	caataatggt	540
ggcaagcagg	cgtggagac	ggteccagcg	ctgttgccgg	tgtgttgcca	ggccccaggc	600
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgtgtggg	660
acgggtccag	ggctgttgcc	ggtgtgtgtc	caggccccag	gcttgacccc	ccagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggegtgg	agaeggtcca	gggctgtgtg	780
ccggtgtgtg	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgcagcaat	840
aatggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccgggtgt	gtgccaggcc	900
caeggtttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tcacgcggt	gttgccggtg	ctgtgcccag	cccacggctt	gaccccgagg	1020
caggtggtgg	ccatgcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgttgagagc	ggteccagcg	1080
ctgttgccgg	tgtgttgcca	ggccccaggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgttgag	acggteccag	ggtgttgcc	ggtgtgtgtc	1200
caggeccagc	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	1260
caggcgttgg	agacggtcca	gggtgtgttg	cgggtgtgtg	ggcaggccca	cggcttgacc	1320
ccccagcagg	tggtggccat	cgcagcaat	ggcgggtggc	agcaggcgct	ggagacggtc	1380
cagcggtgtg	tgccggtgtg	gtgccaggcc	caeggtttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tcacgcggtg	gttgccggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatgcgccag	caataatggt	1560
ggcaagcagg	cgtggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgtgttgcca	ggccccaggc	1620
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgtgtggg	1680
acggteccag	ggctgttgcc	ggtgtgtgtc	caggccccag	gcttgacccc	ccagcaggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggcgttgg	agacggtcca	ggcgtgtgtg	1800
ccggtgtgtg	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgcagcaat	1860
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccggtgtg	gtgccaggcc	1920
caeggtttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tcacgcggt	gttgccggtg	ctgtgcccag	cccacggctt	gacccctcag	2040
caggtggtgg	ccatgcgccag	caatggcggc	ggcaggccgg	cgttgagagc	cattgttgcc	2100
cagttatete	gcctgatec	ggcgttgccc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtgccttgc	2160

```

gectgcctcg gcgggcgctcc tgcgctggat gcagtgaana agggattggg ggatcctatc 2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgacgaga tcgcccggaa cagcaccacg 2340
gaecgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggtccag gaagcccgac ggcccatct acaccgtggg cteccccatc 2460
gaactacggcg tgategtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct geccatcggc 2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tcgggcaact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggtgaacca cateaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctcgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcacctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gcegactgat aa 2832

```

<210> 64

<211> 50

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> misc feature

<223> 靶TRBC_T02 (Target TRBC_T02)

<400> 64

```
ttcccacccg aggtcgtgtg gtttagacca tcagaagcag agatctccca 50
```

[0046]

<210> 65

<211> 2814

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> CDS

<223> TALEN TRBC_T02 左 (TALEN TRBC_T02 LEFT)

<400> 65

```

atgggcgate ctaaaaagaa acgtaaggct atcgattacc catacgatgt tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgag caccacgagg cactgggtcg ccacgggttt 180
acacacggcg acatcgttgc gttaagccaa caccggcgag cgttagggac cgtcgtgtc 240
aagtateagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagegat cgttggcgtc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcaagggtgc gggagagttg 360
agaggtecac cgttacagtt ggacacagge caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc ccgctcaac 480
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 540
acggteccag ggtgtgtgcc ggtgtgtgtc cagggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 600
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgttgg agacgggtcca gcggctgttg 660
ccggtgtgtg gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtagccat cgccagccac 720
gatggcggca agcaggcgct ggagacggct cagcggctgt tgccgggtgt gtgccaggcc 780
cacggcttga ccccgagca ggtgggtggc atcgccagca atatgggtgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagg ccacggctt gaccccgag 900
caggtgtgtg ccacgccag ccaagatgga ggcaagcagg cgttgagac ggtccaggcg 960
ctgttgccgg tgetgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc 1020

```

	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	acggctccagc	ggctgttgce	ggtgctgtgc	1080
	caggccccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagccacga	tgccggcaag	1140
	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccgggtgtgt	gccaggccca	cggttgacc	1200
	ccccagcagg	tggtggccat	cggcagcaat	aatggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1260
	cagcggtgtg	tgcgggtgtg	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1320
	atgccacga	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccggtg	1380
	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatgccag	caataatggt	1440
	ggcaagcagg	cgtggagac	ggccagcgg	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	1500
	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
	acggctccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	1620
	gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1680
	ccgggtgtgt	gccaggccca	cggttgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cggcagccac	1740
	gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccgggtgt	gtgccaggcc	1800
	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atgccacga	ataatggtgg	caagcaggcg	1860
	ctggagacgg	tccagcggt	gttgccggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccgag	1920
	caggtggtgg	ccatcgccag	ccaagatggc	ggcaagcagg	cgtggagac	ggtccagcgg	1980
	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatgcc	2040
	agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgccctgat	2100
	ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgtgcctt	tgccctgect	cggcggcgct	2160
	cctgcctgag	atgcagtga	aaagggattg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctgggtg	2220
	aagtccgagg	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
	gagtacatcg	agctgacga	gategccegg	aacagcacc	aggacggtat	cctggagatg	2340
	aaggtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	gggcggctcc	2400
	aggaagcccc	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccc	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
	gacaccaagg	cctactccgg	cggtacaaac	ctgcccctcg	gccaggccga	cgaatgcag	2520
	aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
	gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
[0047]	aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatceaca	actgcaacgg	cgcctgtctg	2700
	tccgtggagg	agctcctgat	cggcggcgag	atgateaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
	gaggtgagga	ggaagtcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814

<210> 66

<211> 2832

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> CDS

<223> TALEN TRBC_T02 右 (TALEN TRBC_T02 RIGHT)

<400> 66

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgcgcg	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatata	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggt	cgttcgacag	tgccgcagca	ccacaggcca	180
ctggctggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcgttgctg	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaacc	tcgtgtcaa	gtatcaggac	atgatcgag	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcgg	caaacagtgg	tccggcgca	gcgtcttgga	ggccttgcct	360
acgggtggcg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcggcgt	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgtcaactt	gacccccag	caggtggtgg	ccatgccag	caataatggt	540
ggcaagcagg	cgtggagac	ggccagcgg	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	600
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acggctccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	ggcgctgttg	780

	ecggtgctgt	gccaggecca	cggettggacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	840
	attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	900
	cacggcttga	ccccccagca	ggtgggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	960
	ctggagacgg	tccagegget	gttgcgggtg	ctgtgceagg	cccacggett	gaccccgagg	1020
	caggtggtgg	ccatcgccag	caatattggt	ggcaagcagg	cgtggagac	ggtgcaggcg	1080
	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgtggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
	caggccccag	gcttgacccc	ggagcagggtg	gtggccatcg	ccagccaega	tggeggcaag	1260
	caggcgetgg	agacggtcca	gaggctgttg	ccggtgctgt	gccaggecca	cggettggacc	1320
	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacggte	1380
	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1440
	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggtg	1500
	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccccag	caggtgggtg	ccatcgccag	caatggcggt	1560
	ggcaagcagg	cgtggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1620
	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgtggag	1680
	acggtccagc	ggtgtgtgcc	ggtgctgtgc	caggccccacg	gcttgacccc	ggagcagggtg	1740
	gtggccatcg	ccagccacga	tggeggcaag	caggegetgg	agacgggtcca	gaggctgttg	1800
	ccggtgctgt	gccaggecca	cggettggacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1860
	ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacggte	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	1920
	caeggcttga	ccccccagca	ggtgggtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1980
	ctggagacgg	tccageggct	gttgccgggtg	ctgtgcccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
	caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcgcc	ggcaggccgg	cgtggagag	cattgttgcc	2100
	cagttatctc	gccctgatcc	ggcgttgccc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtgccttg	2160
	gcctgcctcg	gcgggcgtcc	tgcgtggat	gcagtgaana	agggattggg	ggatcctatc	2220
	agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
	ctgaagtaag	tgcctccagc	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgcccggaa	cagcaccag	2340
	gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
[0048]	aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccgac	ggcgcctatc	acaccgtggg	ctcccccatc	2460
	gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gtacaacct	gcccacggc	2520
	caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
	cccaacgagt	ggtggaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
	tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggtgaaacca	catcaccaac	2700
	tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
	ggcaccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagtccaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
	gcegaactgat	aa					2832

<210> 67

<211> 557

<212> PRT

<213> 鼠 (murine)

<220>

<221> CHAIN

<223> CD19 抗原 (CD19 antigen)

<400> 67

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met
 1 5 10 15

Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp
 20 25 30

Asn	Ala	Val	Leu	Gln	Cys	Leu	Lys	Gly	Thr	Ser	Asp	Gly	Pro	Thr	Gln
	35						40					45			
Gln	Leu	Thr	Trp	Ser	Arg	Glu	Ser	Pro	Leu	Lys	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu
	50					55					60				
Ser	Leu	Gly	Leu	Pro	Gly	Leu	Gly	Ile	His	Met	Arg	Pro	Leu	Ala	Ile
65					70					75					80
Trp	Leu	Phe	Ile	Phe	Asn	Val	Ser	Gln	Gln	Met	Gly	Gly	Phe	Tyr	Leu
				85					90					95	
Cys	Gln	Pro	Gly	Pro	Pro	Ser	Glu	Lys	Ala	Trp	Gln	Pro	Gly	Trp	Thr
			100					105					110		
Val	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Gly	Glu	Leu	Phe	Arg	Trp	Asn	Val	Ser	Asp
	115						120					125			
Leu	Gly	Gly	Leu	Gly	Cys	Gly	Leu	Lys	Asn	Arg	Ser	Ser	Glu	Gly	Pro
	130					135					140				
[0049]															
Ser	Ser	Pro	Ser	Gly	Lys	Leu	Met	Ser	Pro	Lys	Leu	Tyr	Val	Trp	Ala
145					150					155					160
Lys	Asp	Arg	Pro	Glu	Ile	Trp	Glu	Gly	Glu	Pro	Pro	Cys	Leu	Pro	Pro
				165					170					175	
Arg	Asp	Ser	Leu	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu	Thr	Met	Ala	Pro
			180					185					190		
Gly	Ser	Thr	Leu	Trp	Leu	Ser	Cys	Gly	Val	Pro	Pro	Asp	Ser	Val	Ser
		195					200					205			
Arg	Gly	Pro	Leu	Ser	Trp	Thr	His	Val	His	Pro	Lys	Gly	Pro	Lys	Ser
	210					215					220				
Leu	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Lys	Asp	Asp	Arg	Pro	Ala	Arg	Asp	Met	Trp
225					230					235					240
Val	Met	Glu	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Thr	Ala	Gln	Asp	Ala
				245					250					255	

Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
260 265 270

Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
275 280 285

Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu
290 295 300

Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg
305 310 315 320

Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val
325 330 335

Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu
340 345 350

Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala
355 360 365

[0050]

Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp
370 375 380

Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly
385 390 395 400

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu
405 410 415

Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu
420 425 430

Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly
435 440 445

Pro Glu Asp Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu
450 455 460

Asp Glu Glu Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser
465 470 475 480

Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Ala
485 490 495

Gly Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro
500 505 510

Gln Leu Arg Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp
515 520 525

Ala Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala
530 535 540

Trp Gly Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
545 550 555

<210> 68

<211> 300

<212> PRT

<213> 鼠 (murine)

[0051]

<220>

<221> CHAIN

<223> CD38 抗原 (CD38 antigen)

<400> 68

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys
1 5 10 15

Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val
20 25 30

Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln
35 40 45

Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu
50 55 60

Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val
65 70 75 80

Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys
85 90 95

His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu
100 105 110

Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile
115 120 125

Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr
130 135 140

Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys
145 150 155 160

Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp
165 170 175

Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val
180 185 190

Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu
195 200 205

[0052]

Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser
210 215 220

Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala
225 230 235 240

Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp
245 250 255

Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln
260 265 270

Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val
275 280 285

Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
290 295 300

<210> 69

<211> 378

<212> PRT

<213> 鼠 (murine)

<220>

<221> CHAIN

<223> CD123抗原 (CD123 antigen)

<400> 69

Met Val Leu Leu Trp Leu Thr Leu Leu Leu Ile Ala Leu Pro Cys Leu
1 5 10 15

Leu Gln Thr Lys Glu Asp Pro Asn Pro Pro Ile Thr Asn Leu Arg Met
20 25 30

Lys Ala Lys Ala Gln Gln Leu Thr Trp Asp Leu Asn Arg Asn Val Thr
35 40 45

Asp Ile Glu Cys Val Lys Asp Ala Asp Tyr Ser Met Pro Ala Val Asn
50 55 60

Asn Ser Tyr Cys Gln Phe Gly Ala Ile Ser Leu Cys Glu Val Thr Asn
65 70 75 80

[0053] Tyr Thr Val Arg Val Ala Asn Pro Pro Phe Ser Thr Trp Ile Leu Phe
85 90 95

Pro Glu Asn Ser Gly Lys Pro Trp Ala Gly Ala Glu Asn Leu Thr Cys
100 105 110

Trp Ile His Asp Val Asp Phe Leu Ser Cys Ser Trp Ala Val Gly Pro
115 120 125

Gly Ala Pro Ala Asp Val Gln Tyr Asp Leu Tyr Leu Asn Val Ala Asn
130 135 140

Arg Arg Gln Gln Tyr Glu Cys Leu His Tyr Lys Thr Asp Ala Gln Gly
145 150 155 160

Thr Arg Ile Gly Cys Arg Phe Asp Asp Ile Ser Arg Leu Ser Ser Gly
165 170 175

Ser Gln Ser Ser His Ile Leu Val Arg Gly Arg Ser Ala Ala Phe Gly
180 185 190

Ile Pro Cys Thr Asp Lys Phe Val Val Phe Ser Gln Ile Glu Ile Leu

	195	200	205	
	Thr Pro Pro Asn Met Thr	Ala Lys Cys Asn Lys	Thr His Ser Phe Met	
	210	215	220	
	His Trp Lys Met Arg Ser	His Phe Asn Arg Lys	Phe Arg Tyr Glu Leu	
	225	230	235	240
	Gln Ile Gln Lys Arg Met	Gln Pro Val Ile Thr	Glu Gln Val Arg Asp	
		245	250	255
	Arg Thr Ser Phe Gln Leu	Leu Asn Pro Gly Thr	Tyr Thr Val Gln Ile	
		260	265	270
	Arg Ala Arg Glu Arg Val	Tyr Glu Phe Leu Ser	Ala Trp Ser Thr Pro	
		275	280	285
	Gln Arg Phe Glu Cys Asp	Gln Glu Glu Gly Ala	Asn Thr Arg Ala Trp	
	290	295	300	
[0054]	Arg Thr Ser Leu Leu Ile	Ala Leu Gly Thr	Leu Leu Ala Leu Val	Cys
	305	310	315	320
	Val Phe Val Ile Cys Arg	Arg Tyr Leu Val Met	Gln Arg Leu Phe Pro	
		325	330	335
	Arg Ile Pro His Met Lys	Asp Pro Ile Gly Asp	Ser Phe Gln Asn Asp	
		340	345	350
	Lys Leu Val Val Trp Glu	Ala Gly Lys Ala Gly	Leu Glu Glu Cys Leu	
		355	360	365
	Val Thr Glu Val Gln Val	Val Gln Lys Thr		
	370	375		
<210>	70			
<211>	335			
<212>	PRT			
<213>	鼠 (murine)			
<220>				
<221>	CHAIN			
<223>	CS1抗原 (CS1 antigen)			

<400> 70
 Met Ala Gly Ser Pro Thr Cys Leu Thr Leu Ile Tyr Ile Leu Trp Gln
 1 5 10 15

 Leu Thr Gly Ser Ala Ala Ser Gly Pro Val Lys Glu Leu Val Gly Ser
 20 25 30

 Val Gly Gly Ala Val Thr Phe Pro Leu Lys Ser Lys Val Lys Gln Val
 35 40 45

 Asp Ser Ile Val Trp Thr Phe Asn Thr Thr Pro Leu Val Thr Ile Gln
 50 55 60

 Pro Glu Gly Gly Thr Ile Ile Val Thr Gln Asn Arg Asn Arg Glu Arg
 65 70 75 80

 Val Asp Phe Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Lys Leu Lys
 85 90 95

 Lys Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr Val Gly Ile Tyr Ser Ser Ser Leu
 100 105 110
 [0055]
 Gln Gln Pro Ser Thr Gln Glu Tyr Val Leu His Val Tyr Glu His Leu
 115 120 125

 Ser Lys Pro Lys Val Thr Met Gly Leu Gln Ser Asn Lys Asn Gly Thr
 130 135 140

 Cys Val Thr Asn Leu Thr Cys Cys Met Glu His Gly Glu Glu Asp Val
 145 150 155 160

 Ile Tyr Thr Trp Lys Ala Leu Gly Gln Ala Ala Asn Glu Ser His Asn
 165 170 175

 Gly Ser Ile Leu Pro Ile Ser Trp Arg Trp Gly Glu Ser Asp Met Thr
 180 185 190

 Phe Ile Cys Val Ala Arg Asn Pro Val Ser Arg Asn Phe Ser Ser Pro
 195 200 205

 Ile Leu Ala Arg Lys Leu Cys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Asp Ser
 210 215 220

Ser Met Val Leu Leu Cys Leu Leu Leu Val Pro Leu Leu Leu Ser Leu
225 230 235 240

Phe Val Leu Gly Leu Phe Leu Trp Phe Leu Lys Arg Glu Arg Gln Glu
245 250 255

Glu Tyr Ile Glu Glu Lys Lys Arg Val Asp Ile Cys Arg Glu Thr Pro
260 265 270

Asn Ile Cys Pro His Ser Gly Glu Asn Thr Glu Tyr Asp Thr Ile Pro
275 280 285

His Thr Asn Arg Thr Ile Leu Lys Glu Asp Pro Ala Asn Thr Val Tyr
290 295 300

Ser Thr Val Glu Ile Pro Lys Lys Met Glu Asn Pro His Ser Leu Leu
305 310 315 320

Thr Met Pro Asp Thr Pro Arg Leu Phe Ala Tyr Glu Asn Val Ile
325 330 335

[0056]

<210> 71

<211> 184

<212> PRT

<213> 鼠 (murine)

<220>

<221> CHAIN

<223> BCMA抗原 (BCMA antigen)

<400> 71

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
20 25 30

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu
50 55 60

Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile
65 70 75 80

Asn Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu
85 90 95

Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu
100 105 110

Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
115 120 125

Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
130 135 140

Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
145 150 155 160

Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu
165 170 175

[0057]

Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
180

<210> 72

<211> 993

<212> PRT

<213> 鼠 (murine)

<220>

<221> CHAIN

<223> FLT3抗原 (FLT3 antigen)

<400> 72

Met Pro Ala Leu Ala Arg Asp Gly Gly Gln Leu Pro Leu Leu Val Val
1 5 10 15

Phe Ser Ala Met Ile Phe Gly Thr Ile Thr Asn Gln Asp Leu Pro Val
20 25 30

Ile Lys Cys Val Leu Ile Asn His Lys Asn Asn Asp Ser Ser Val Gly
35 40 45

Lys Ser Ser Ser Tyr Pro Met Val Ser Glu Ser Pro Glu Asp Leu Gly
50 55 60

Cys Ala Leu Arg Pro Gln Ser Ser Gly Thr Val Tyr Glu Ala Ala Ala
65 70 75 80

Val Glu Val Asp Val Ser Ala Ser Ile Thr Leu Gln Val Leu Val Asp
85 90 95

Ala Pro Gly Asn Ile Ser Cys Leu Trp Val Phe Lys His Ser Ser Leu
100 105 110

Asn Cys Gln Pro His Phe Asp Leu Gln Asn Arg Gly Val Val Ser Met
115 120 125

Val Ile Leu Lys Met Thr Glu Thr Gln Ala Gly Glu Tyr Leu Leu Phe
130 135 140

Ile Gln Ser Glu Ala Thr Asn Tyr Thr Ile Leu Phe Thr Val Ser Ile
145 150 155 160

[0058]

Arg Asn Thr Leu Leu Tyr Thr Leu Arg Arg Pro Tyr Phe Arg Lys Met
165 170 175

Glu Asn Gln Asp Ala Leu Val Cys Ile Ser Glu Ser Val Pro Glu Pro
180 185 190

Ile Val Glu Trp Val Leu Cys Asp Ser Gln Gly Glu Ser Cys Lys Glu
195 200 205

Glu Ser Pro Ala Val Val Lys Lys Glu Glu Lys Val Leu His Glu Leu
210 215 220

Phe Gly Thr Asp Ile Arg Cys Cys Ala Arg Asn Glu Leu Gly Arg Glu
225 230 235 240

Cys Thr Arg Leu Phe Thr Ile Asp Leu Asn Gln Thr Pro Gln Thr Thr
245 250 255

Leu Pro Gln Leu Phe Leu Lys Val Gly Glu Pro Leu Trp Ile Arg Cys
260 265 270

Lys Ala Val His Val Asn His Gly Phe Gly Leu Thr Trp Glu Leu Glu
275 280 285

Asn Lys Ala Leu Glu Glu Gly Asn Tyr Phe Glu Met Ser Thr Tyr Ser
290 295 300

Thr Asn Arg Thr Met Ile Arg Ile Leu Phe Ala Phe Val Ser Ser Val
305 310 315 320

Ala Arg Asn Asp Thr Gly Tyr Tyr Thr Cys Ser Ser Ser Lys His Pro
325 330 335

Ser Gln Ser Ala Leu Val Thr Ile Val Glu Lys Gly Phe Ile Asn Ala
340 345 350

Thr Asn Ser Ser Glu Asp Tyr Glu Ile Asp Gln Tyr Glu Glu Phe Cys
355 360 365

Phe Ser Val Arg Phe Lys Ala Tyr Pro Gln Ile Arg Cys Thr Trp Thr
370 375 380

[0059]

Phe Ser Arg Lys Ser Phe Pro Cys Glu Gln Lys Gly Leu Asp Asn Gly
385 390 395 400

Tyr Ser Ile Ser Lys Phe Cys Asn His Lys His Gln Pro Gly Glu Tyr
405 410 415

Ile Phe His Ala Glu Asn Asp Asp Ala Gln Phe Thr Lys Met Phe Thr
420 425 430

Leu Asn Ile Arg Arg Lys Pro Gln Val Leu Ala Glu Ala Ser Ala Ser
435 440 445

Gln Ala Ser Cys Phe Ser Asp Gly Tyr Pro Leu Pro Ser Trp Thr Trp
450 455 460

Lys Lys Cys Ser Asp Lys Ser Pro Asn Cys Thr Glu Glu Ile Thr Glu
465 470 475 480

Gly Val Trp Asn Arg Lys Ala Asn Arg Lys Val Phe Gly Gln Trp Val
485 490 495

Ser Ser Ser Thr Leu Asn Met Ser Glu Ala Ile Lys Gly Phe Leu Val
500 505 510

Lys Cys Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Gly Thr Ser Cys Glu Thr Ile Leu
515 520 525

Leu Asn Ser Pro Gly Pro Phe Pro Phe Ile Gln Asp Asn Ile Ser Phe
530 535 540

Tyr Ala Thr Ile Gly Val Cys Leu Leu Phe Ile Val Val Leu Thr Leu
545 550 555 560

Leu Ile Cys His Lys Tyr Lys Lys Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu
565 570 575

Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val
580 585 590

Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Glu
595 600 605

[0060]

Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Lys Val
610 615 620

Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val Ser Ile Gln
625 630 635 640

Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Lys Ala Asp Ser Ser Glu Arg Glu
645 650 655

Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Met Met Thr Gln Leu Gly Ser His Glu
660 665 670

Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Leu Ser Gly Pro Ile Tyr
675 680 685

Leu Ile Phe Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu Asn Tyr Leu Arg
690 695 700

Ser Lys Arg Glu Lys Phe His Arg Thr Trp Thr Glu Ile Phe Lys Glu
705 710 715 720

His Asn Phe Ser Phe Tyr Pro Thr Phe Gln Ser His Pro Asn Ser Ser
725 730 735

Met Pro Gly Ser Arg Glu Val Gln Ile His Pro Asp Ser Asp Gln Ile
740 745 750

Ser Gly Leu His Gly Asn Ser Phe His Ser Glu Asp Glu Ile Glu Tyr
755 760 765

Glu Asn Gln Lys Arg Leu Glu Glu Glu Glu Asp Leu Asn Val Leu Thr
770 775 780

Phe Glu Asp Leu Leu Cys Phe Ala Tyr Gln Val Ala Lys Gly Met Glu
785 790 795 800

Phe Leu Glu Phe Lys Ser Cys Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn
805 810 815

Val Leu Val Thr His Gly Lys Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu
820 825 830

[0061]

Ala Arg Asp Ile Met Ser Asp Ser Asn Tyr Val Val Arg Gly Asn Ala
835 840 845

Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Phe Glu Gly Ile
850 855 860

Tyr Thr Ile Lys Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu
865 870 875 880

Ile Phe Ser Leu Gly Val Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Asp Ala
885 890 895

Asn Phe Tyr Lys Leu Ile Gln Asn Gly Phe Lys Met Asp Gln Pro Phe
900 905 910

Tyr Ala Thr Glu Glu Ile Tyr Ile Ile Met Gln Ser Cys Trp Ala Phe
915 920 925

Asp Ser Arg Lys Arg Pro Ser Phe Pro Asn Leu Thr Ser Phe Leu Gly
930 935 940

Cys Gln Leu Ala Asp Ala Glu Glu Ala Met Tyr Gln Asn Val Asp Gly
945 950 955 960

Arg Val Ser Glu Cys Pro His Thr Tyr Gln Asn Arg Arg Pro Phe Ser
965 970 975

Arg Glu Met Asp Leu Gly Leu Leu Ser Pro Gln Ala Gln Val Glu Asp
980 985 990

Ser

<210> 73

<211> 364

<212> PRT

<213> 鼠 (murine)

<220>

<221> CHAIN

<223> CD33抗原 (CD33 antigen)

<400> 73

[0062]

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
1 5 10 15

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln
20 25 30

Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro
35 40 45

Tyr Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly
50 55 60

Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln
65 70 75 80

Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro
85 90 95

Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp
100 105 110

Asn Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser

	115	120	125	
	Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg 130 135 140			
	Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn 145 150 155 160			
	Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile 165 170 175			
	Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr 180 185 190			
	His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr 195 200 205			
	Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu 210 215 220			
[0063]	Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr 225 230 235 240			
	Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly 245 250 255			
	Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala 260 265 270			
	Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys 275 280 285			
	Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly 290 295 300			
	Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr 305 310 315 320			
	Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu 325 330 335			
	Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys			

	340	345	350
	Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln 355 360		
<210>	74		
<211>	193		
<212>	PRT		
<213>	鼠 (murine)		
<220>			
<221>	CHAIN		
<223>	CD70抗原 (CD70 antigen)		
<400>	74		
	Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly 1 5 10 15		
	Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile 20 25 30		
	Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu 35 40 45		
[0064]			
	Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His 50 55 60		
	Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala 65 70 75 80		
	Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu 85 90 95		
	Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu 100 105 110		
	Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu 115 120 125		
	Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg 130 135 140		
	Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro 145 150 155 160		

Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu
165 170 175

Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg
180 185 190

Pro

<210> 75

<211> 943

<212> PRT

<213> 鼠 (murine)

<220>

<221> CHAIN

<223> EGFRvIII

<400> 75

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15

[0065]

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr
20 25 30

Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser
35 40 45

Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly
50 55 60

Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp
65 70 75 80

Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr
85 90 95

Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp
100 105 110

Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu
115 120 125

Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro
130 135 140

Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg
145 150 155 160

Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu
165 170 175

Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly
180 185 190

Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile
195 200 205

Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile
210 215 220

Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His
225 230 235 240

[0066]

Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys
245 250 255

Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys
260 265 270

Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys
275 280 285

Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys
290 295 300

Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp
305 310 315 320

Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn
325 330 335

Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu
340 345 350

Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly
355 360 365

Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val
370 375 380

Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe
385 390 395 400

Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu
405 410 415

Gln Glu Arg Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro
420 425 430

Asn Gln Ala Leu Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile
435 440 445

Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp
450 455 460

[0067]

Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu
465 470 475 480

Arg Glu Ala Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala
485 490 495

Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly
500 505 510

Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe
515 520 525

Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser
530 535 540

Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr
545 550 555 560

Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val
565 570 575

Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala
580 585 590

Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys
595 600 605

Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr
610 615 620

Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu
625 630 635 640

Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile
645 650 655

Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys
660 665 670

Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala
675 680 685

[0068]

Asp Ser Arg Pro Lys Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met
690 695 700

Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met
705 710 715 720

His Leu Pro Ser Pro Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp
725 730 735

Glu Glu Asp Met Asp Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro
740 745 750

Gln Gln Gly Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu
755 760 765

Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp
770 775 780

Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln
785 790 795 800

Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
805 810 815

Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys
820 825 830

Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu
835 840 845

Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr
850 855 860

Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val
865 870 875 880

Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His
885 890 895

Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys
900 905 910

[0069]

Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala
915 920 925

Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
930 935 940

<210> 76

<211> 497

<212> PRT

<213> 鼠 (murine)

<220>

<221> CHAIN

<223> WT1

<400> 76

Met Gln Asp Pro Ala Ser Thr Cys Val Pro Glu Pro Ala Ser Gln His
1 5 10 15

Thr Leu Arg Ser Gly Pro Gly Cys Leu Gln Gln Pro Glu Gln Gln Gly
20 25 30

Val Arg Asp Pro Gly Gly Ile Trp Ala Lys Leu Gly Ala Ala Glu Ala
35 40 45

Ser Ala Glu Arg Leu Gln Gly Arg Arg Ser Arg Gly Ala Ser Gly Ser
50 55 60

Glu Pro Gln Gln Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu
65 70 75 80

Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val
85 90 95

Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly
100 105 110

Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro
115 120 125

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro
130 135 140

[0070]

Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe
145 150 155 160

Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg
165 170 175

Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln
180 185 190

Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser
195 200 205

Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly
210 215 220

Thr Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro
225 230 235 240

Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu
245 250 255

Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr
260 265 270

Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro
275 280 285

Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met
290 295 300

Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly His Ser Thr
305 310 315 320

Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln
325 330 335

Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg
340 345 350

Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr
355 360 365

[0071]

Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg
370 375 380

Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly
385 390 395 400

Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser
405 410 415

Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys
420 425 430

Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His
435 440 445

Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys
450 455 460

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
465 470 475 480

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
485 490 495

Leu

<210> 77

<211> 671

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> CHAIN

<223> pCLS23856:抗-CD19 CAR (pCLS23856:anti-CD19 CAR)

<400> 77

Met Leu Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly
20 25 30

[0072] Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser
35 40 45

Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser
50 55 60

Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro
65 70 75 80

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
85 90 95

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
100 105 110

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
115 120 125

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg
130 135 140

Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Arg Ala Glu

	145		150		155		160
	Gly Arg Gly Ser	Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly					
		165			170		175
	Pro Met Glu Thr	Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val					
		180		185			190
	Pro Gly Ser Thr	Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu					
		195		200			205
	Ser Ala Ser Leu	Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln					
		210		215			220
	Asp Ile Ser Lys Tyr	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr					
		225		230		235	240
	Val Lys Leu Leu	Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro					
		245		250			255
[0073]	Ser Arg Phe Ser	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile					
		260		265			270
	Ser Asn Leu Glu	Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly					
		275		280			285
	Asn Thr Leu Pro	Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr					
		290		295		300	
	Lys Ala Gly Gly	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly					
		305		310		315	320
	Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly					
		325		330			335
	Leu Val Ala Pro	Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly					
		340		345			350
	Val Ser Leu Pro	Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg					
		355		360		365	
	Lys Gly Leu Glu	Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr					

131

	595	600	605
	Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp 610	615	620
	Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg 625	630	635 640
	Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr 645	650	655
	Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg 660	665	670
	<210> 78		
	<211> 665		
	<212> PRT		
	<213> MMLV病毒 (MMLV virus)		
	<220>		
	<221> CHAIN		
[0075]	<223> 来自MMLV病毒的包膜蛋白 (Env protein from MMLV virus)		
	<400> 78		
	Met Ala Arg Ser Thr Leu Ser Lys Pro Leu Lys Asn Lys Val Asn Pro 1 5 10 15		
	Arg Gly Pro Leu Ile Pro Leu Ile Leu Leu Met Leu Arg Gly Val Ser 20 25 30		
	Thr Ala Ser Pro Gly Ser Ser Pro His Gln Val Tyr Asn Ile Thr Trp 35 40 45		
	Glu Val Thr Asn Gly Asp Arg Glu Thr Ile Trp Ala Ile Ser Gly Asn 50 55 60		
	His Pro Leu Trp Thr Trp Trp Pro Asp Leu Thr Pro Asp Leu Cys Met 65 70 75 80		
	Leu Ala His His Gly Pro Ser Tyr Trp Gly Leu Glu Tyr Gln Ser Pro 85 90 95		
	Phe Ser Ser Pro Pro Gly Pro Pro Cys Cys Ser Gly Gly Ser Ser Pro 100 105 110		

Gly Cys Ser Arg Asp Cys Glu Glu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Pro Arg
115 120 125

Cys Asn Thr Ala Trp Asn Arg Leu Lys Leu Asp Gln Thr Thr His Lys
130 135 140

Ser Asn Glu Gly Phe Tyr Val Cys Pro Gly Pro His Arg Pro Arg Glu
145 150 155 160

Ser Lys Ser Cys Gly Gly Pro Asp Ser Phe Tyr Cys Ala Tyr Trp Gly
165 170 175

Cys Glu Thr Thr Gly Arg Ala Tyr Trp Lys Pro Ser Ser Ala Trp Asp
180 185 190

Phe Ile Thr Val Asn Asn Asn Leu Thr Ser Asp Gln Ala Val Gln Val
195 200 205

Cys Lys Asp Asn Lys Trp Cys Asn Pro Leu Val Ile Arg Phe Thr Asp
210 215 220

[0076]

Ala Gly Arg Arg Val Thr Ser Trp Thr Thr Gly His Tyr Trp Gly Leu
225 230 235 240

Arg Leu Tyr Val Ser Gly Gln Asp Pro Gly Leu Thr Phe Gly Ile Arg
245 250 255

Leu Arg Tyr Gln Asn Leu Gly Pro Arg Val Pro Ile Gly Pro Asn Pro
260 265 270

Val Leu Ala Gly Gln Gln Pro Leu Ser Lys Pro Lys Pro Val Lys Ser
275 280 285

Pro Ser Val Thr Lys Pro Pro Ser Gly Thr Pro Leu Ser Pro Thr Gln
290 295 300

Leu Pro Pro Ala Gly Thr Glu Asn Arg Leu Leu Asn Leu Val Asp Gly
305 310 315 320

Ala Tyr Gln Ala Leu Asn Leu Thr Ser Pro Asp Lys Thr Gln Glu Cys
325 330 335

Trp Leu Cys Leu Val Ala Gly Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Val Ala Val
340 345 350

Leu Gly Thr Tyr Ser Asn His Thr Ser Ala Pro Ala Asn Cys Ser Val
355 360 365

Ala Ser Gln His Lys Leu Thr Leu Ser Glu Val Thr Gly Gln Gly Leu
370 375 380

Cys Ile Gly Ala Val Pro Lys Thr His Gln Ala Leu Cys Asn Thr Thr
385 390 395 400

Gln Thr Ser Ser Arg Gly Pro Tyr Tyr Leu Val Ala Pro Thr Gly Thr
405 410 415

Met Trp Ala Cys Asn Thr Gly Leu Thr Pro Cys Ile Ser Thr Thr Ile
420 425 430

Leu Asn Leu Thr Thr Asp Tyr Cys Val Leu Val Glu Leu Trp Pro Arg
435 440 445

[0077]

Val Thr Tyr His Ser Pro Ser Tyr Val Tyr Gly Leu Phe Glu Lys Ser
450 455 460

Asn Arg His Lys Arg Glu Pro Val Ser Leu Thr Leu Ala Leu Leu Leu
465 470 475 480

Gly Gly Leu Thr Met Gly Gly Ile Ala Ala Gly Val Gly Thr Gly Thr
485 490 495

Thr Ala Leu Met Ala Thr Gln Gln Phe Gln Gln Leu His Ala Ala Val
500 505 510

Gln Asp Asp Leu Arg Glu Val Glu Lys Ser Ile Ser Asn Leu Glu Lys
515 520 525

Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu
530 535 540

Asp Leu Leu Phe Leu Lys Glu Gly Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu
545 550 555 560

Glu Cys Cys Phe Tyr Ala Asp His Thr Gly Leu Val Arg Asp Ser Met
565 570 575

Ala Lys Leu Arg Glu Arg Leu Asn Gln Arg Gln Lys Leu Phe Glu Ser
580 585 590

Thr Gln Gly Trp Phe Glu Gly Leu Phe Asn Arg Ser Pro Trp Phe Thr
595 600 605

Thr Leu Ile Ser Thr Ile Met Gly Pro Leu Ile Val Leu Leu Met Ile
610 615 620

Leu Leu Phe Gly Pro Cys Ile Leu Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys
625 630 635 640

Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala Leu Val Leu Thr Gln Gln Tyr His
645 650 655

Gln Leu Lys Pro Ile Glu Tyr Glu Pro
660 665

[0078]

<210> 79

<211> 229

<212> PRT

<213> MMLV病毒 (MMLV virus)

<220>

<221> CHAIN

<223> 来自MMLV病毒的缩短包膜蛋白 (Truncated env protein from MMLV virus)

<400> 79

Met Ala Arg Ser Thr Leu Ser Lys Pro Leu Lys Asn Lys Val Asn Pro
1 5 10 15

Arg Gly Pro Leu Ile Pro Leu Ile Leu Leu Met Leu Arg Gly Val Ser
20 25 30

Arg Glu Pro Val Ser Leu Thr Leu Ala Leu Leu Leu Gly Gly Leu Thr
35 40 45

Met Gly Gly Ile Ala Ala Gly Val Gly Thr Gly Thr Thr Ala Leu Met
50 55 60

	Ala	Thr	Gln	Gln	Phe	Gln	Gln	Leu	His	Ala	Ala	Val	Gln	Asp	Asp	Leu
	65					70				75						80
	Arg	Glu	Val	Glu	Lys	Ser	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Ser
					85					90					95	
	Leu	Ser	Glu	Val	Val	Leu	Gln	Asn	Arg	Arg	Gly	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe
					100				105					110		
	Leu	Lys	Glu	Gly	Gly	Leu	Cys	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Glu	Cys	Cys	Phe
			115					120					125			
	Tyr	Ala	Asp	His	Thr	Gly	Leu	Val	Arg	Asp	Ser	Met	Ala	Lys	Leu	Arg
		130					135					140				
[0079]	Glu	Arg	Leu	Asn	Gln	Arg	Gln	Lys	Leu	Phe	Glu	Ser	Thr	Gln	Gly	Trp
	145					150					155					160
	Phe	Glu	Gly	Leu	Phe	Asn	Arg	Ser	Pro	Trp	Phe	Thr	Thr	Leu	Ile	Ser
					165					170					175	
	Thr	Ile	Met	Gly	Pro	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	Met	Ile	Leu	Leu	Phe	Gly
				180					185					190		
	Pro	Cys	Ile	Leu	Asn	Arg	Leu	Val	Gln	Phe	Val	Lys	Asp	Arg	Ile	Ser
			195					200					205			
	Val	Val	Gln	Ala	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Gln	Tyr	His	Gln	Leu	Lys	Pro
		210					215					220				
	Ile	Glu	Tyr	Glu	Pro											
	225															

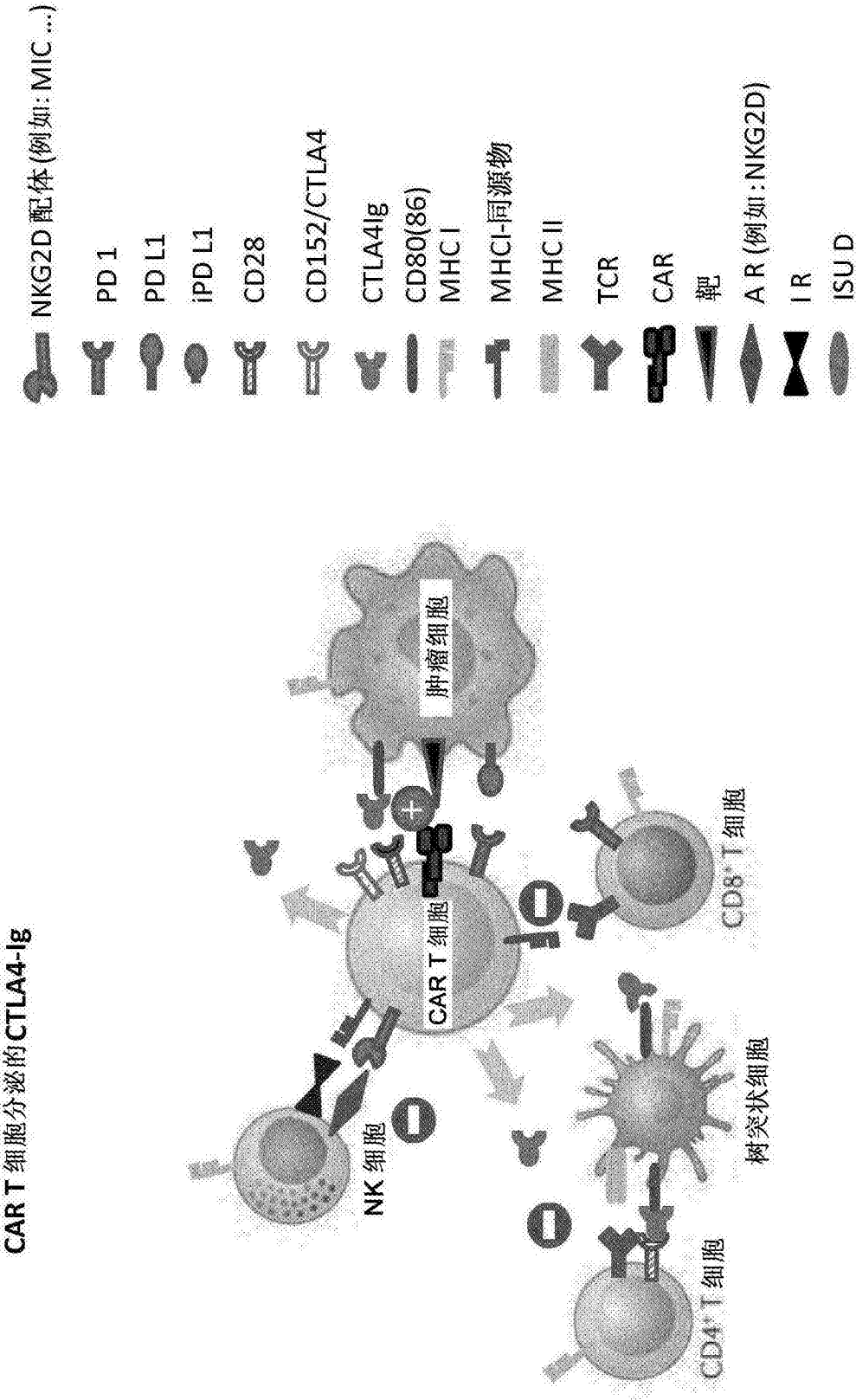


图2

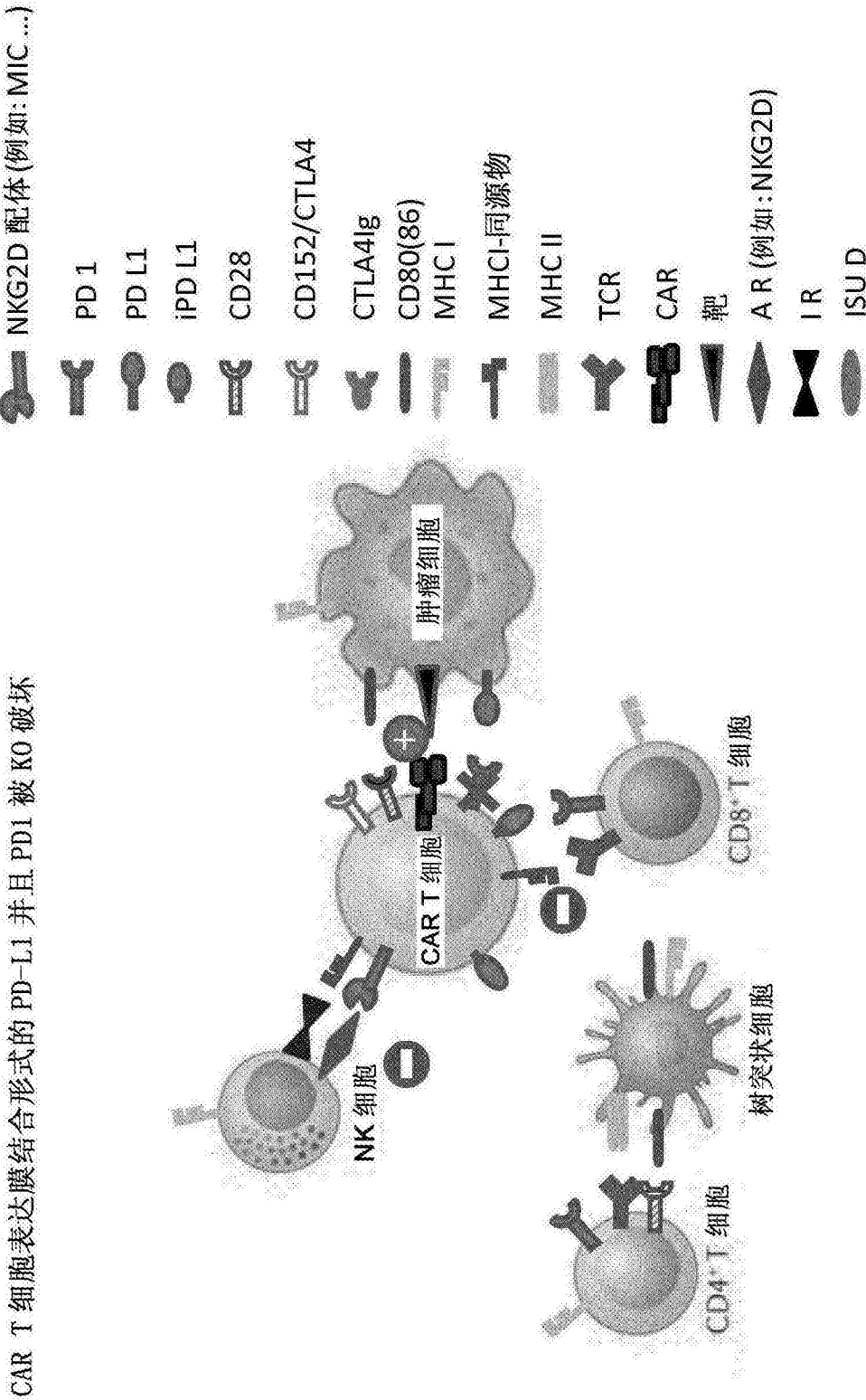


图3

CAR T 细胞表达分泌形式的 PD-L1 并且 PD1 被 KO 破坏

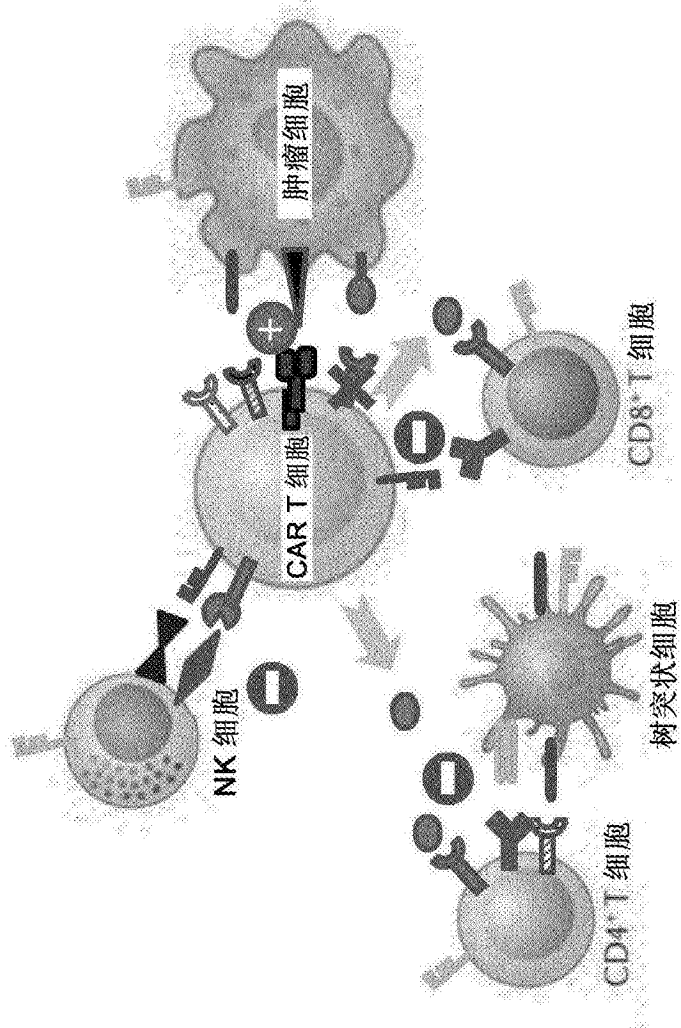
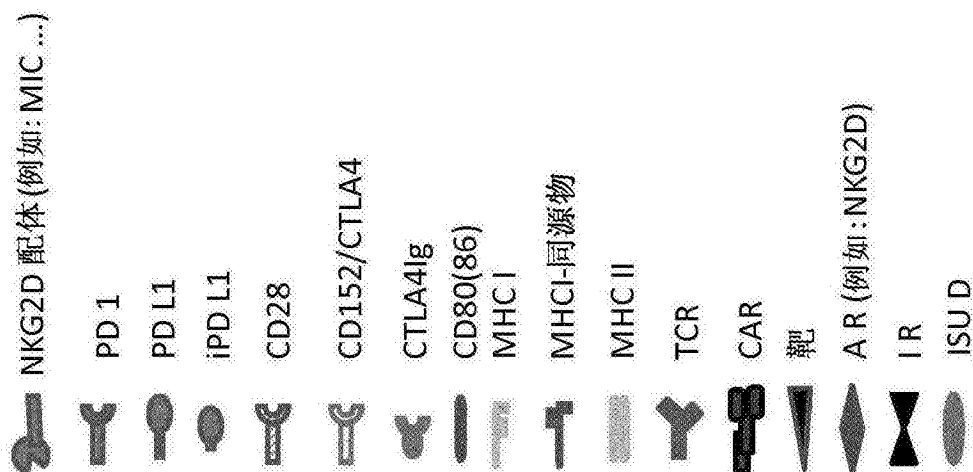


图4

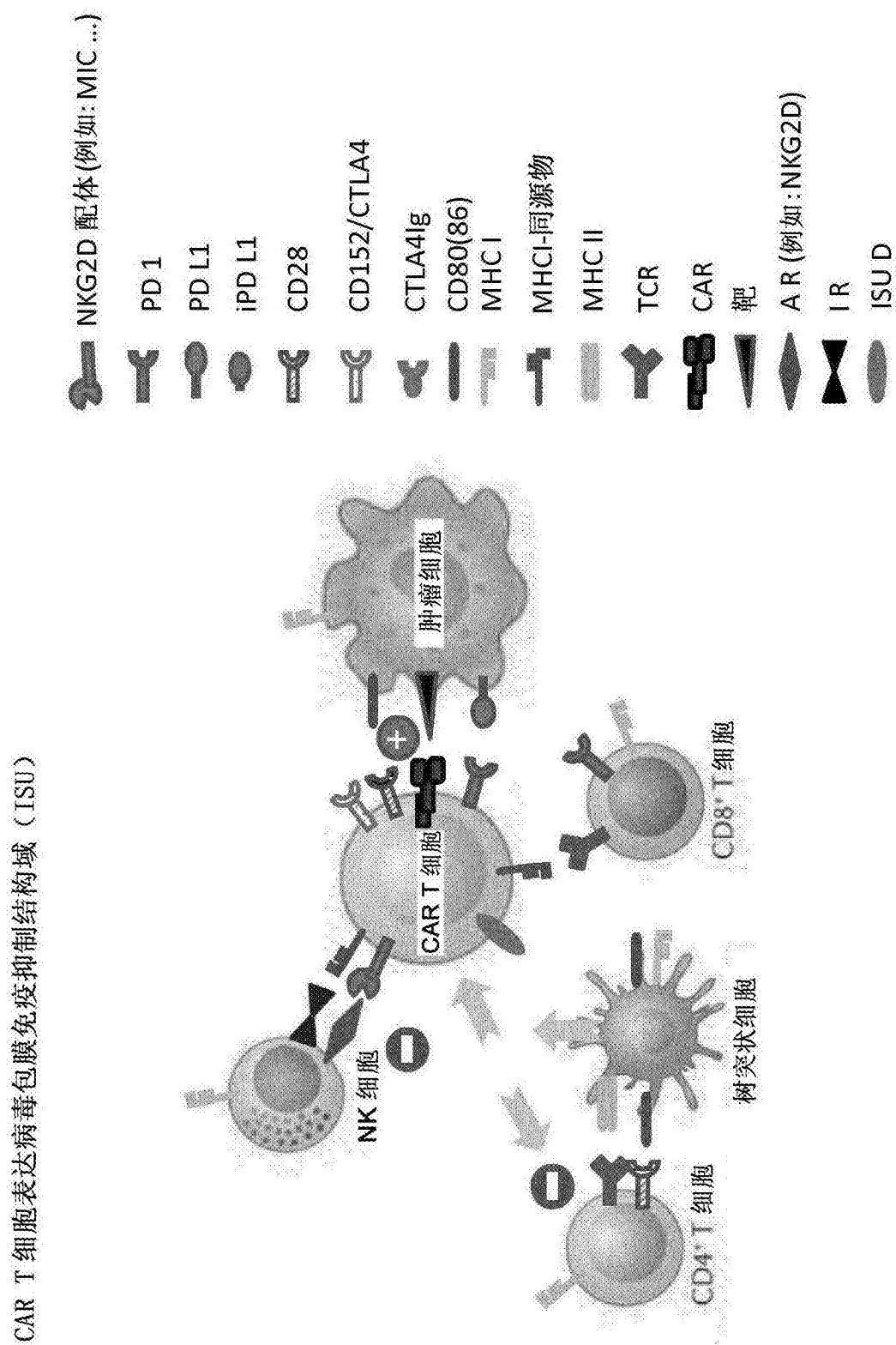


图5

隐秘的 CAR T 细胞: MHC I 被 $\beta 2m$ 基因上的 KO 失活

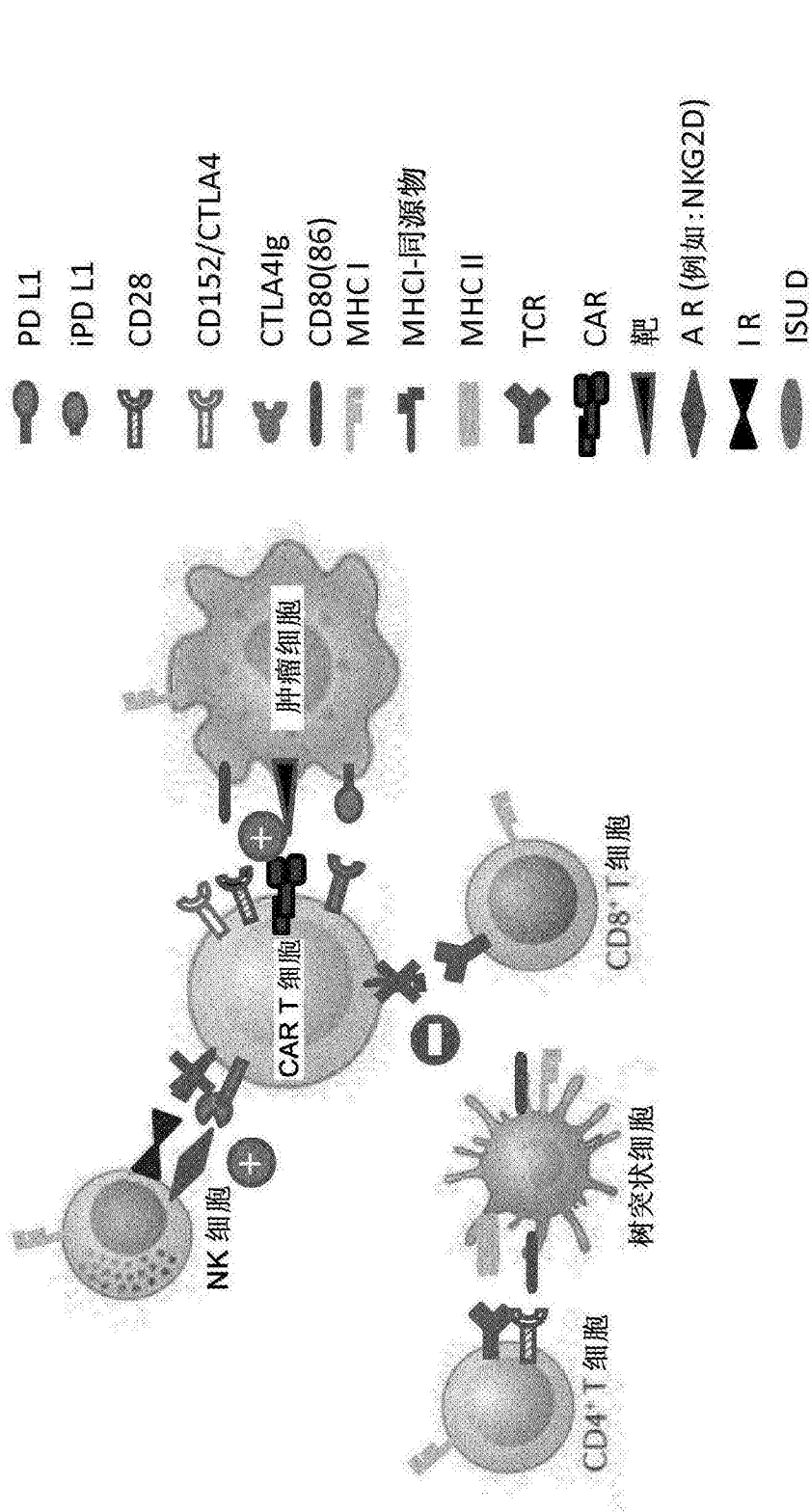


图6

对于 $\beta 2$ 微球蛋白的 CAR T 细胞 KO 并且表达病毒 MHC I 同源物

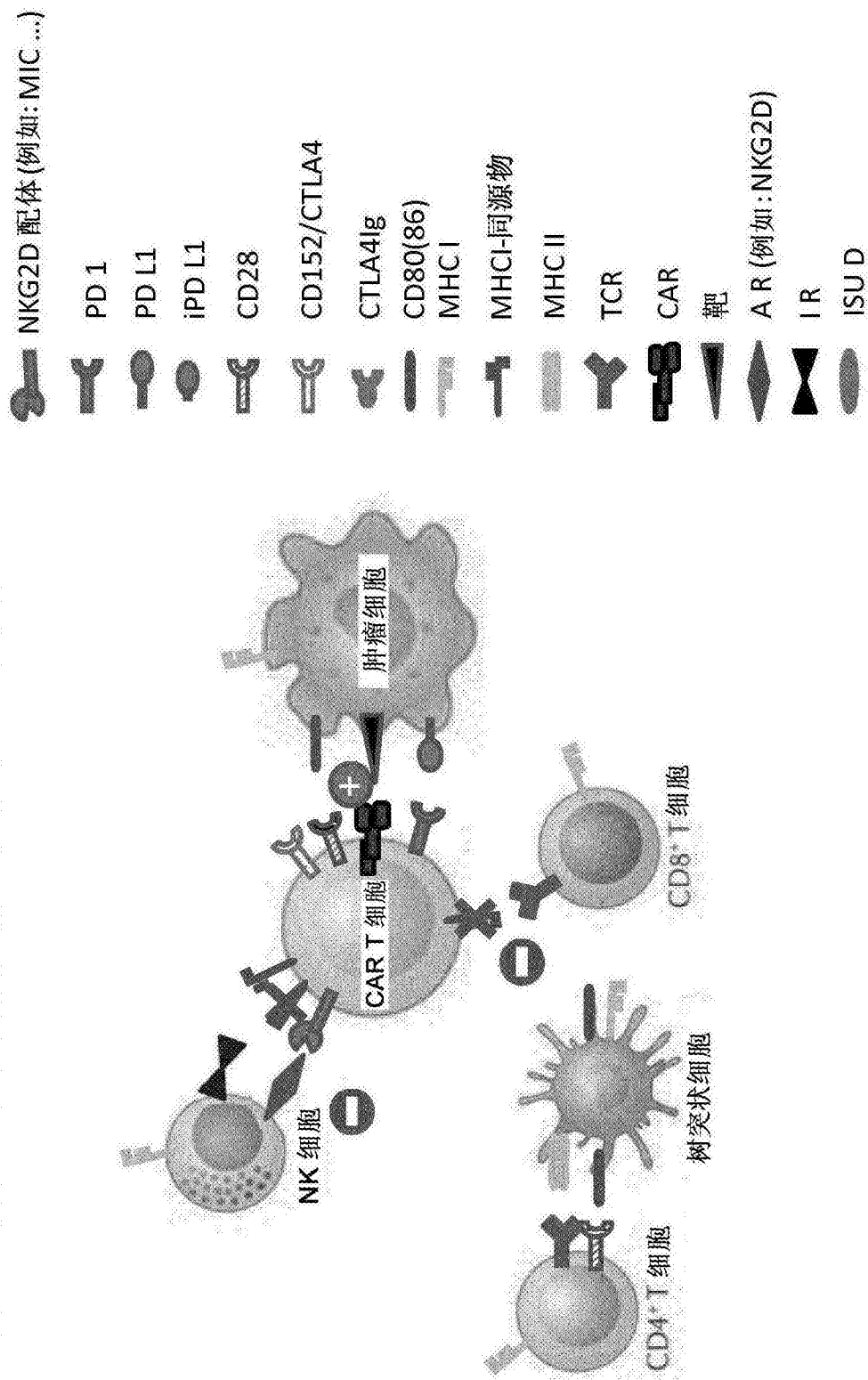


图7

对于 $\beta 2$ 微球蛋白的 CAR T 细胞 KO 并且表达可溶性 NKG2D 配体

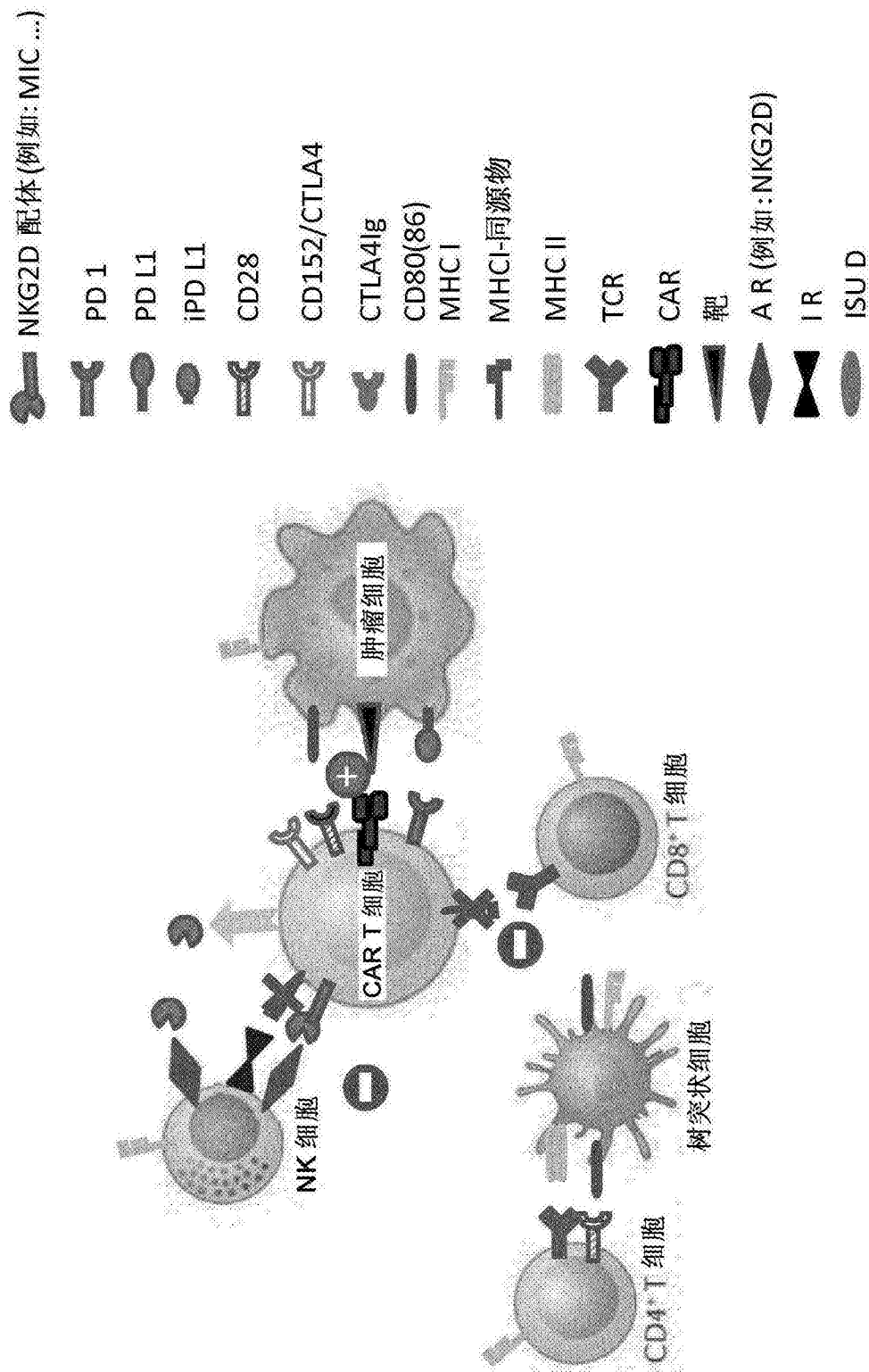


图8

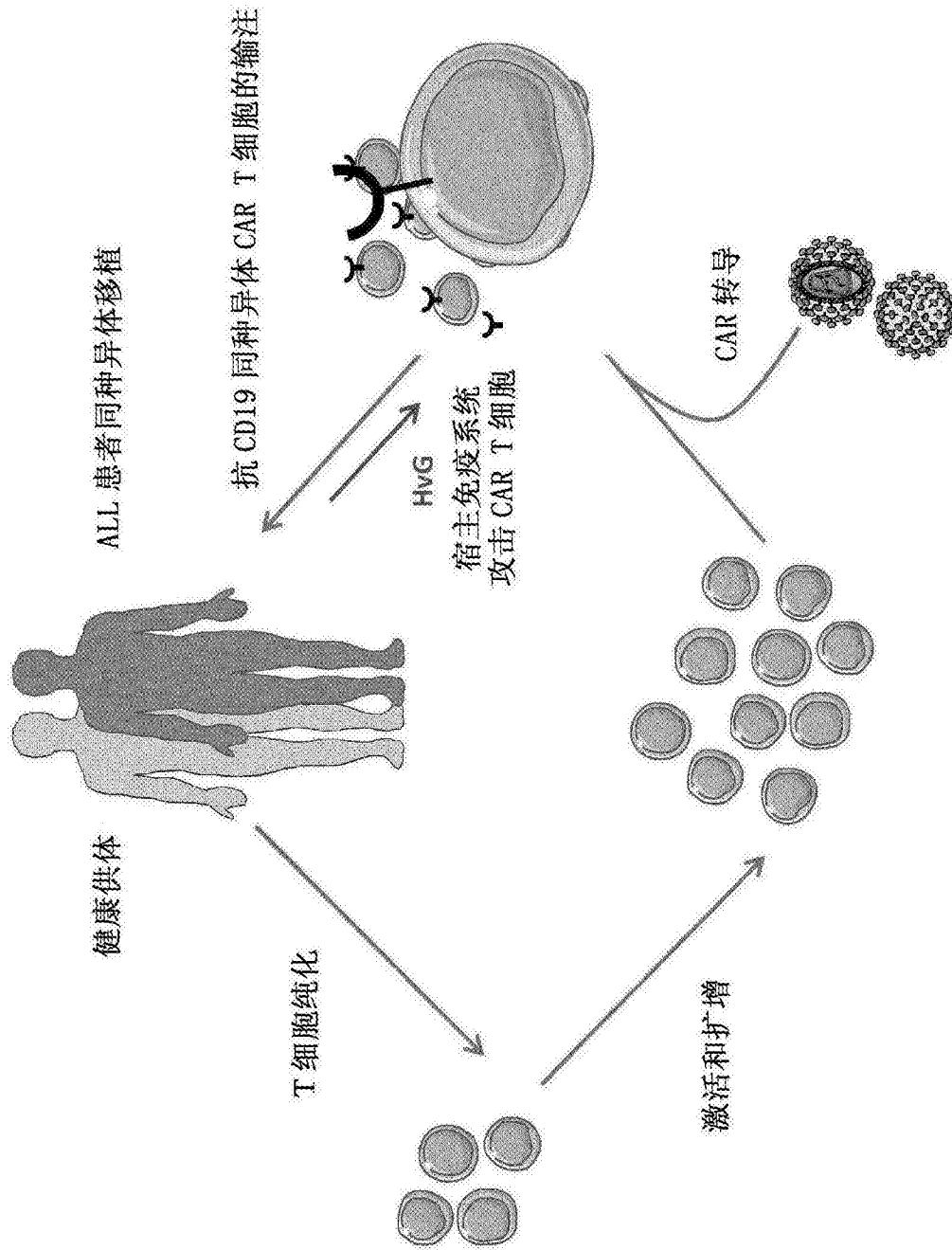


图9

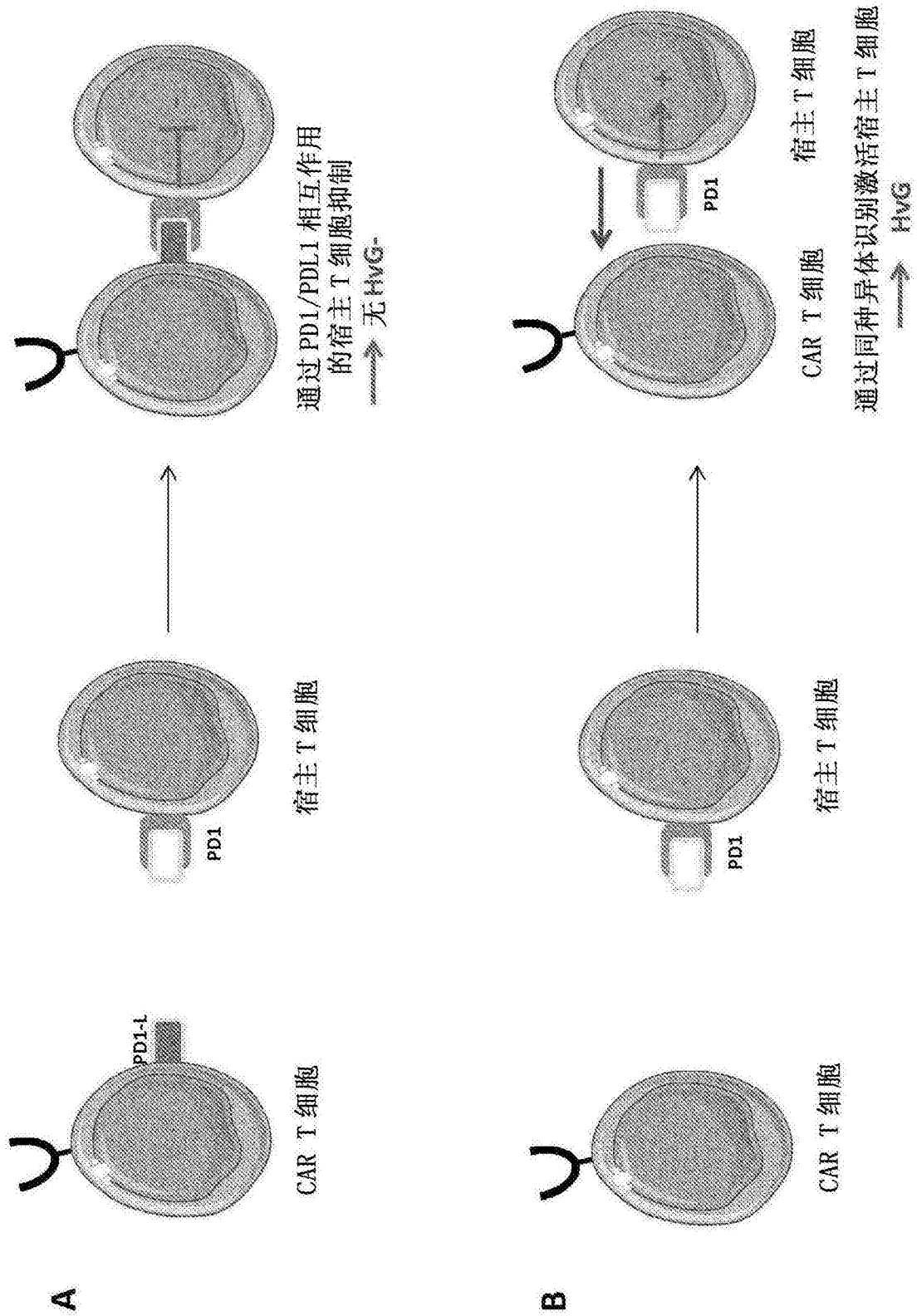


图10

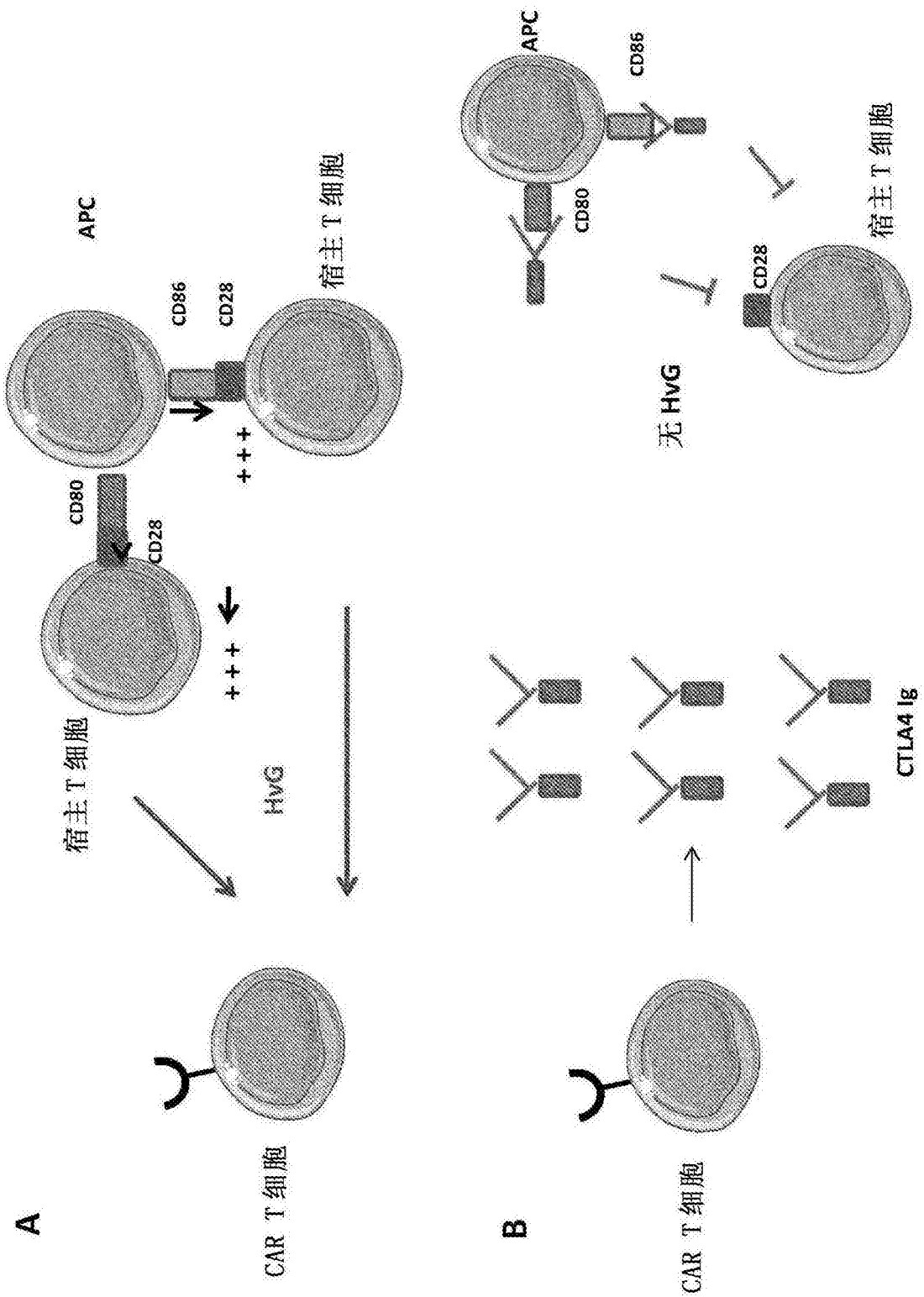


图11

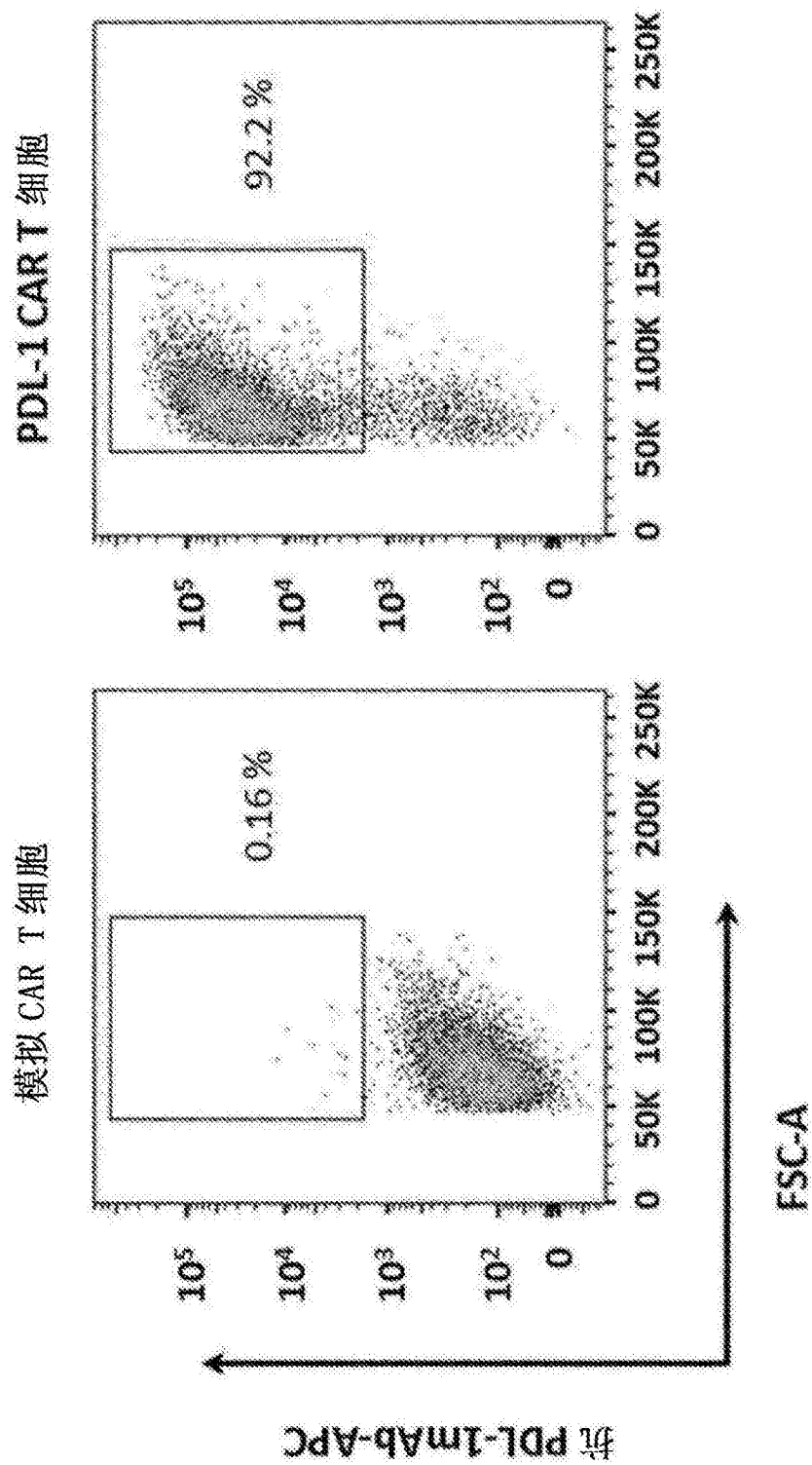


图12A

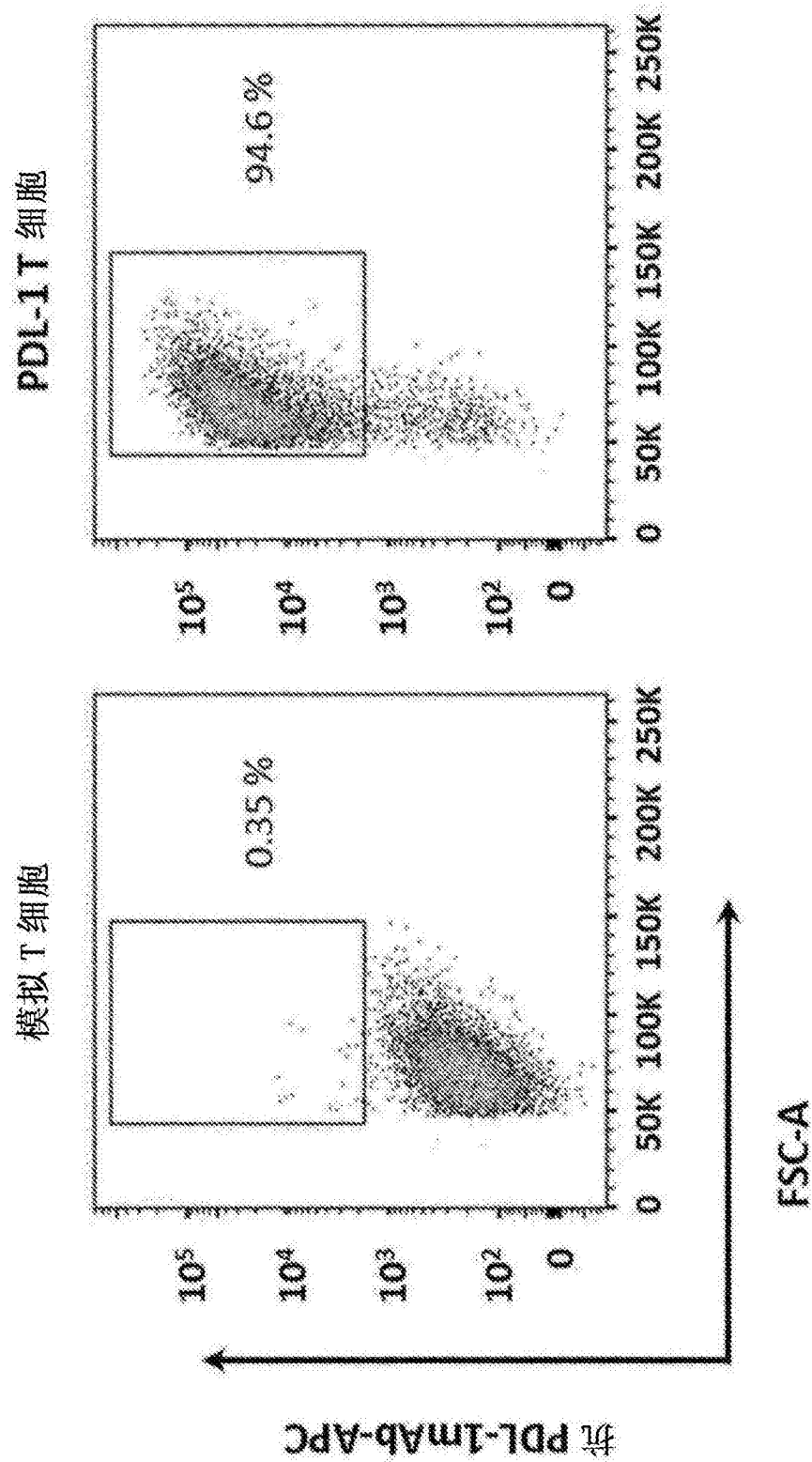


图12B

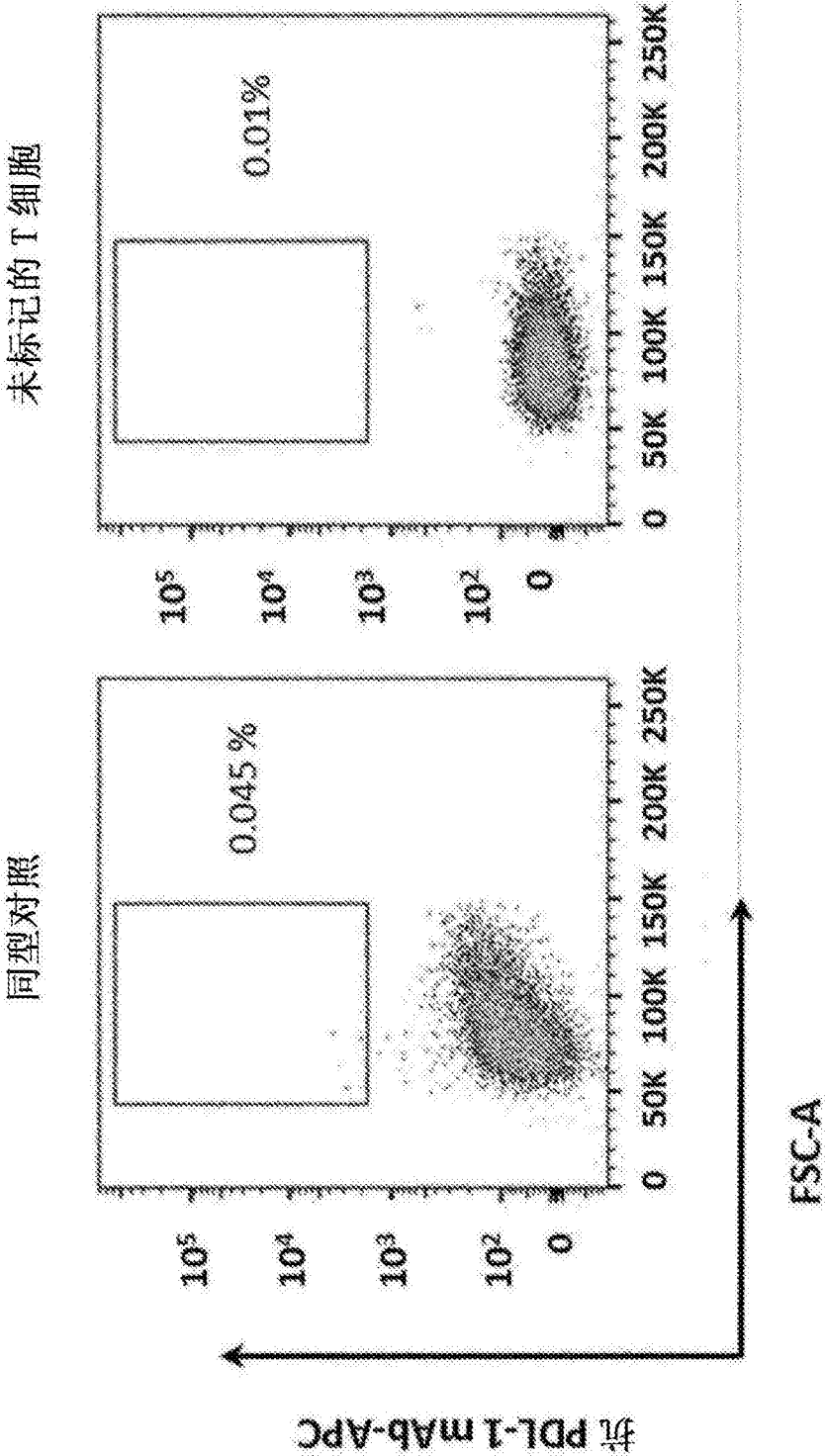


图12C

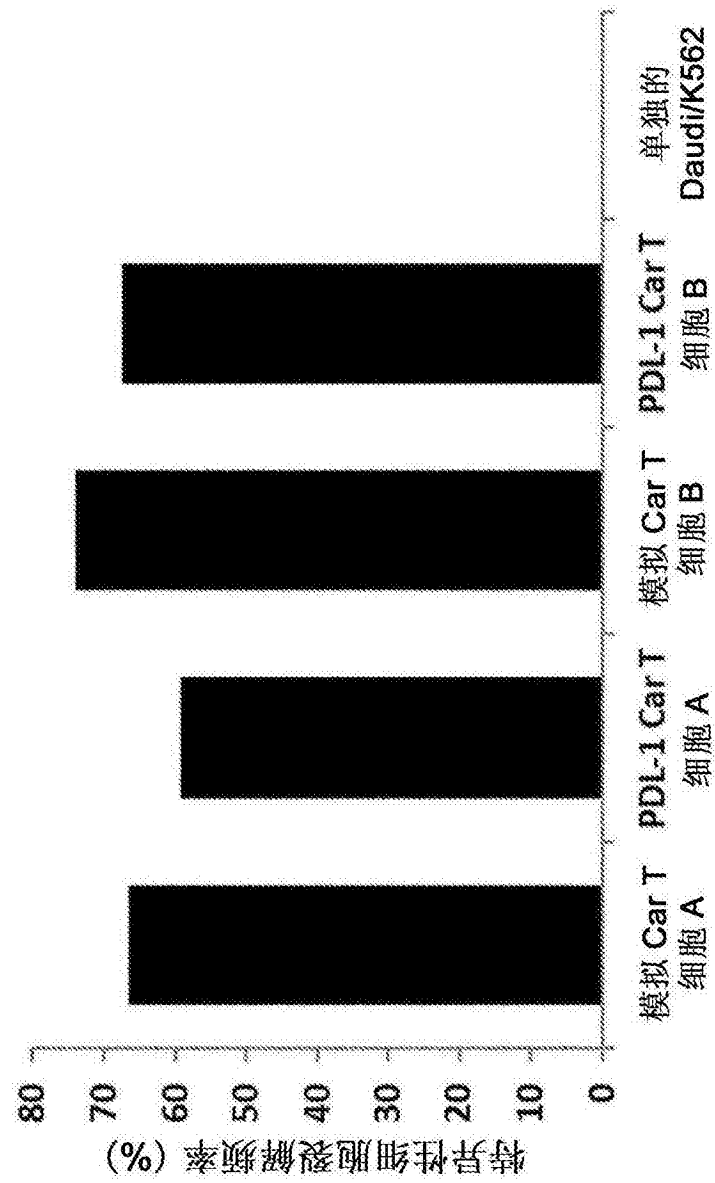


图13

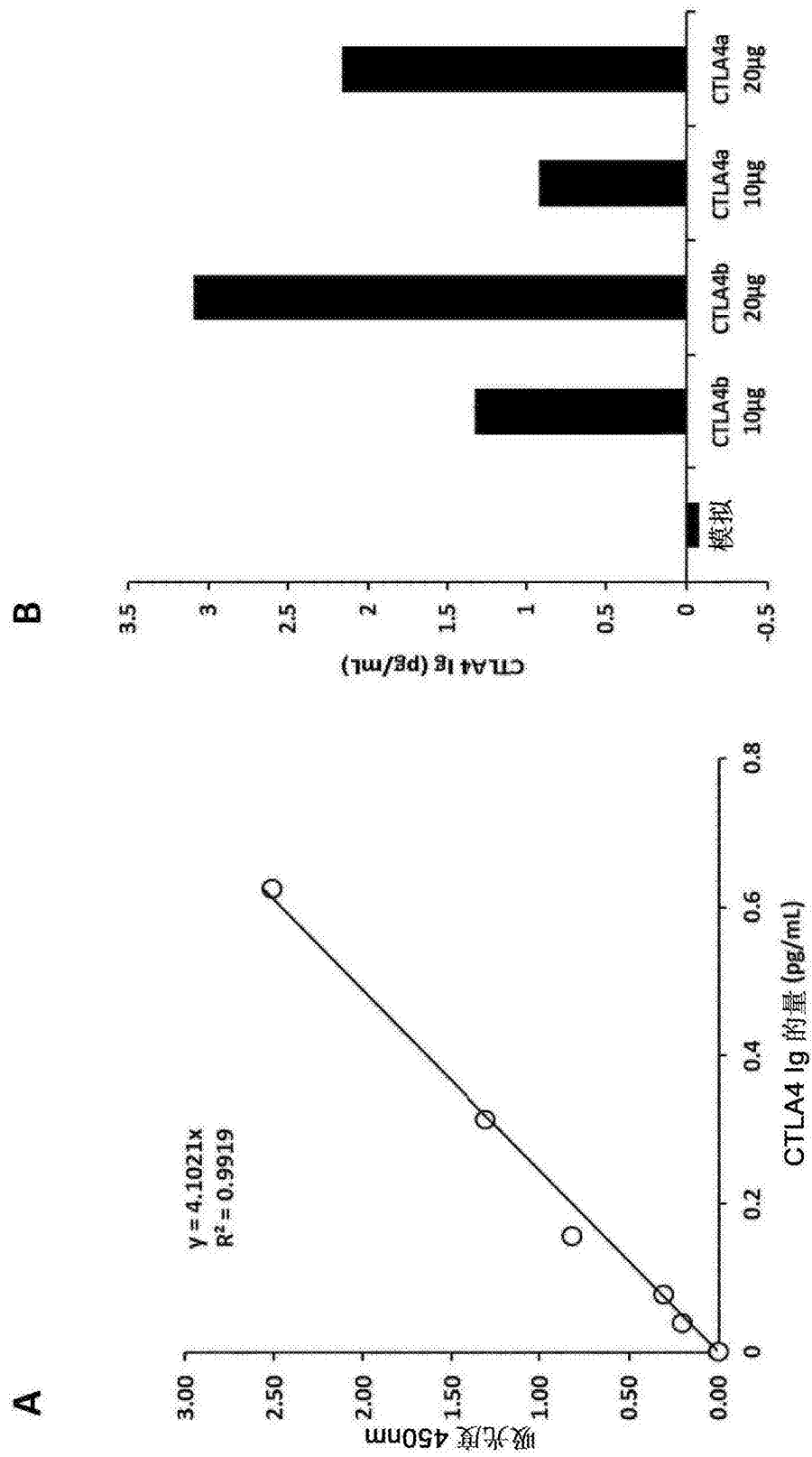


图14

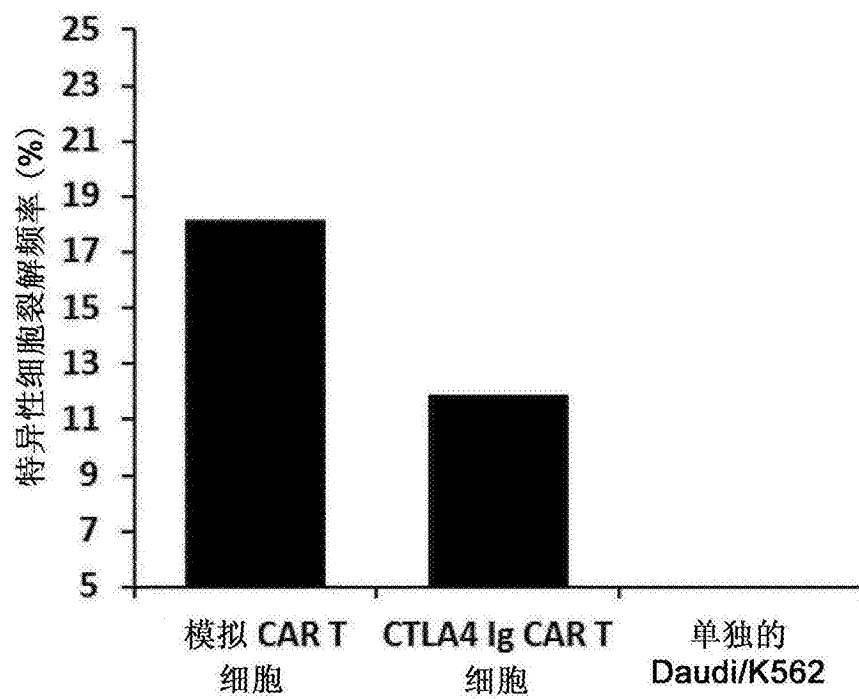
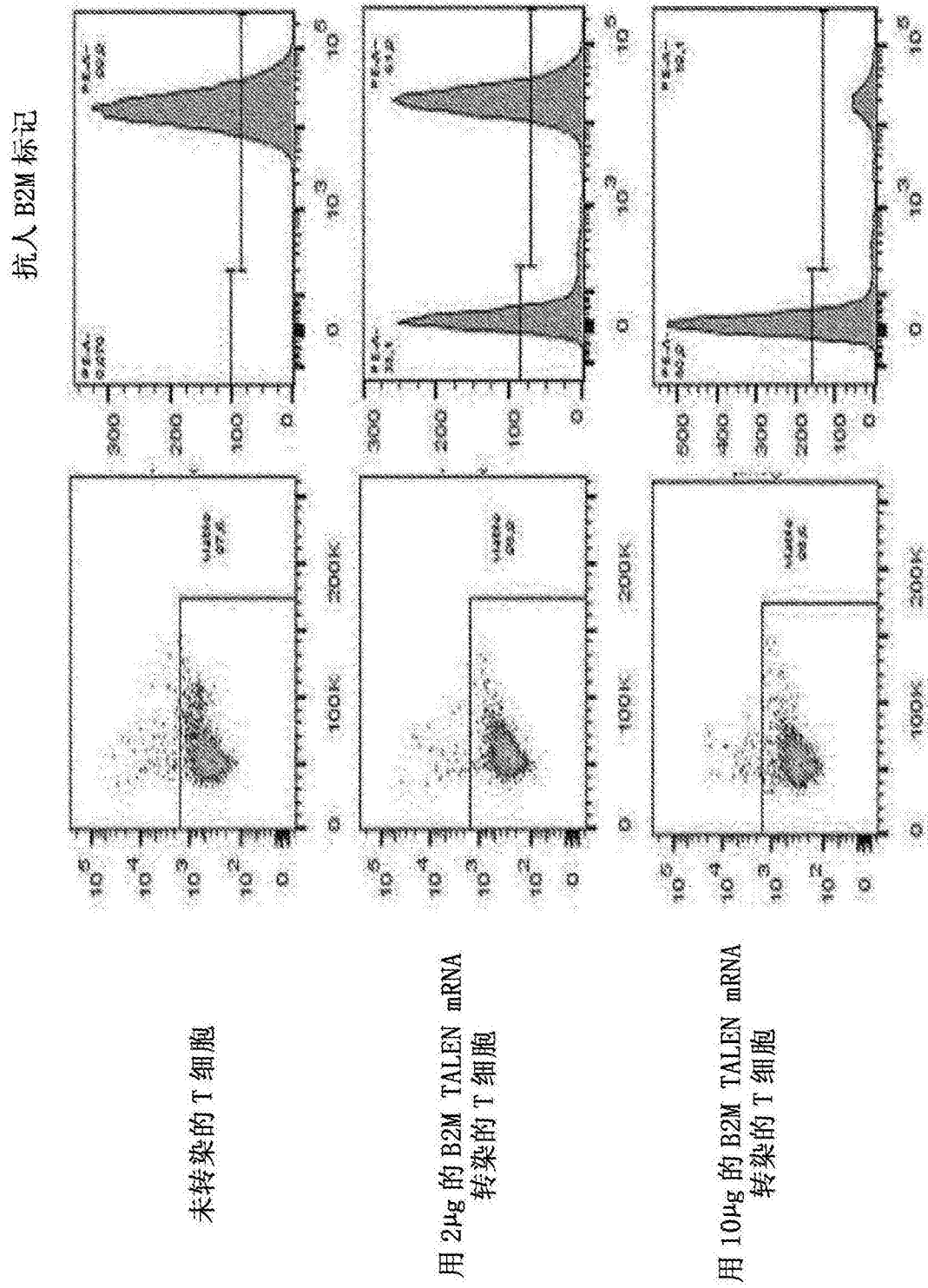


图15



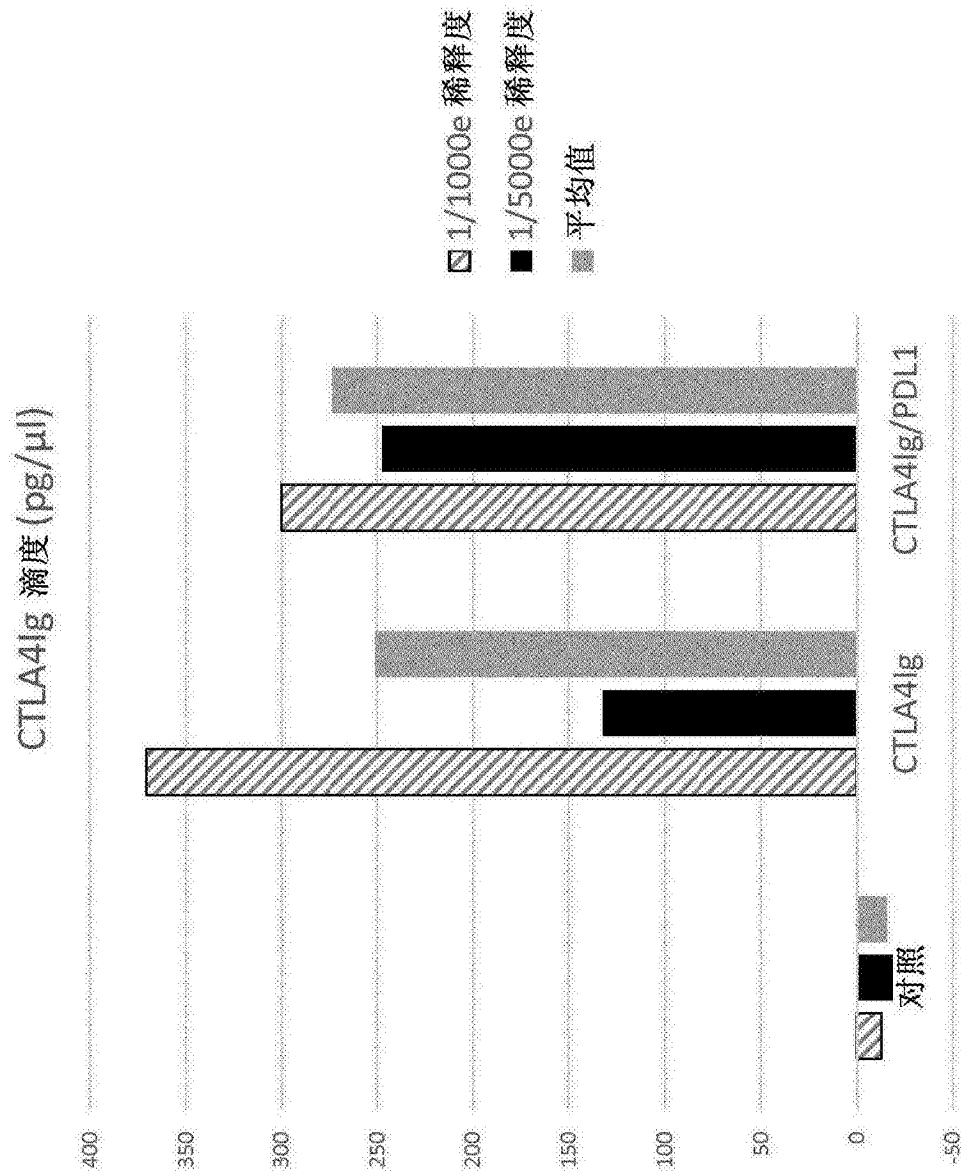


图17

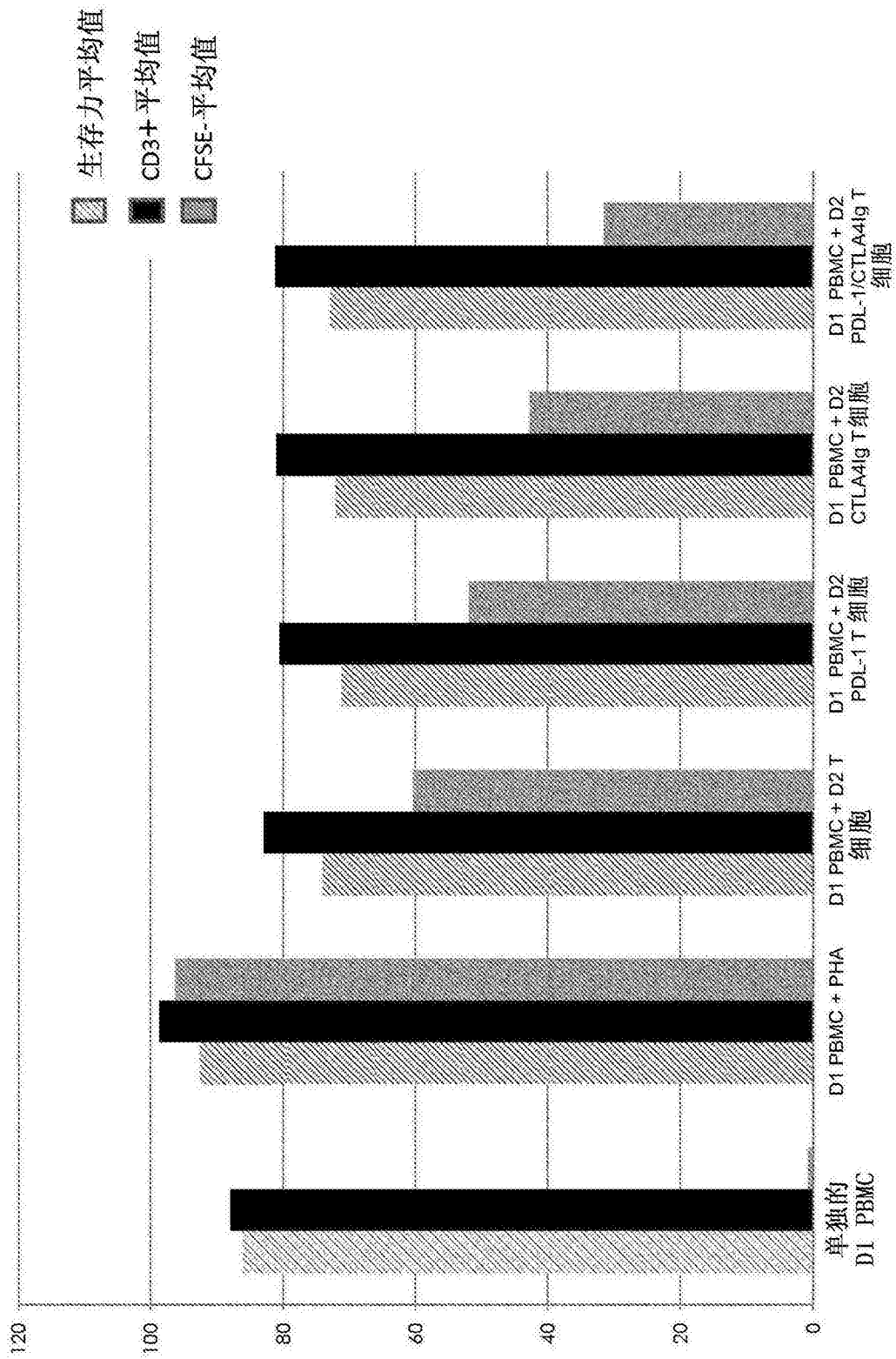


图18

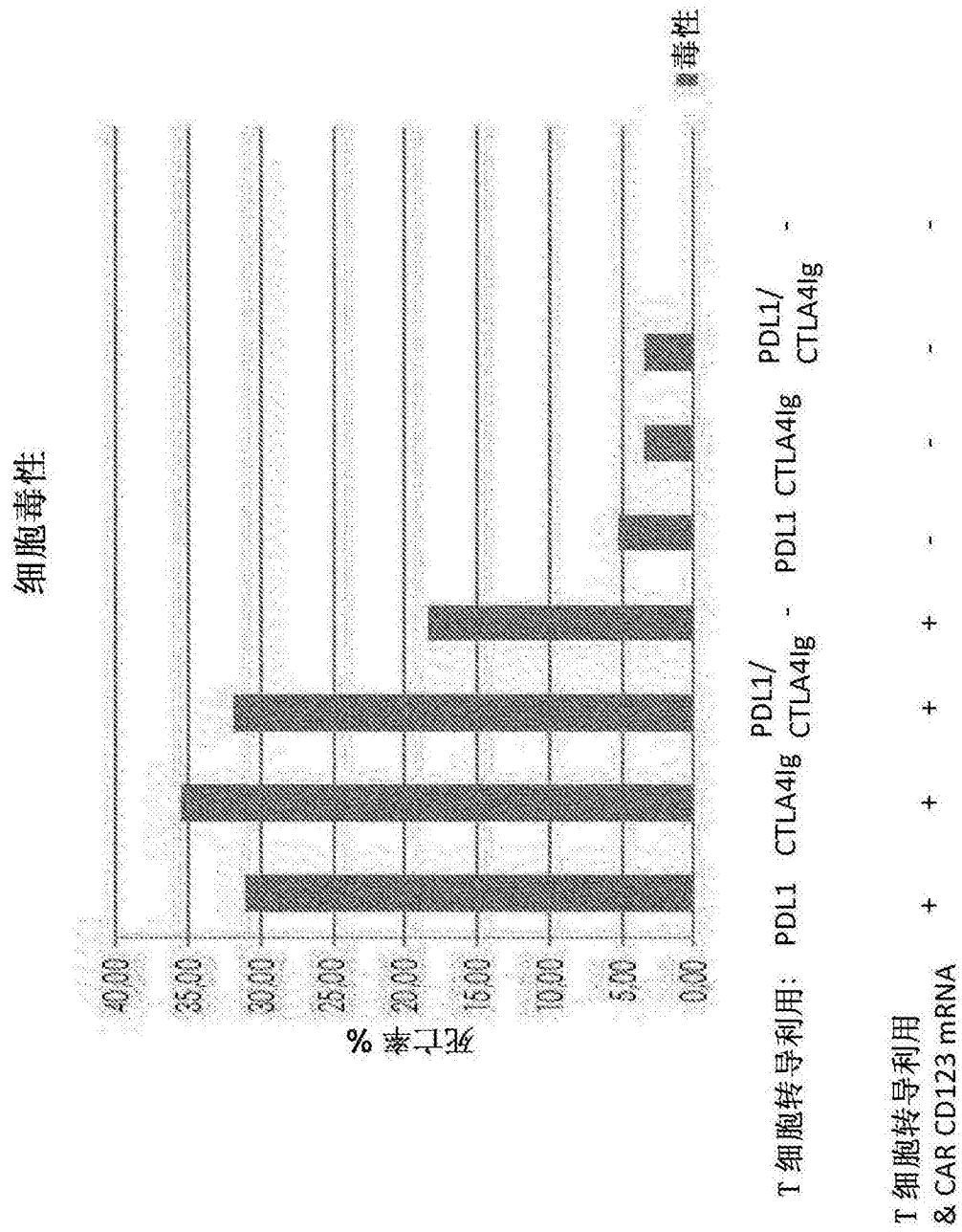


图19

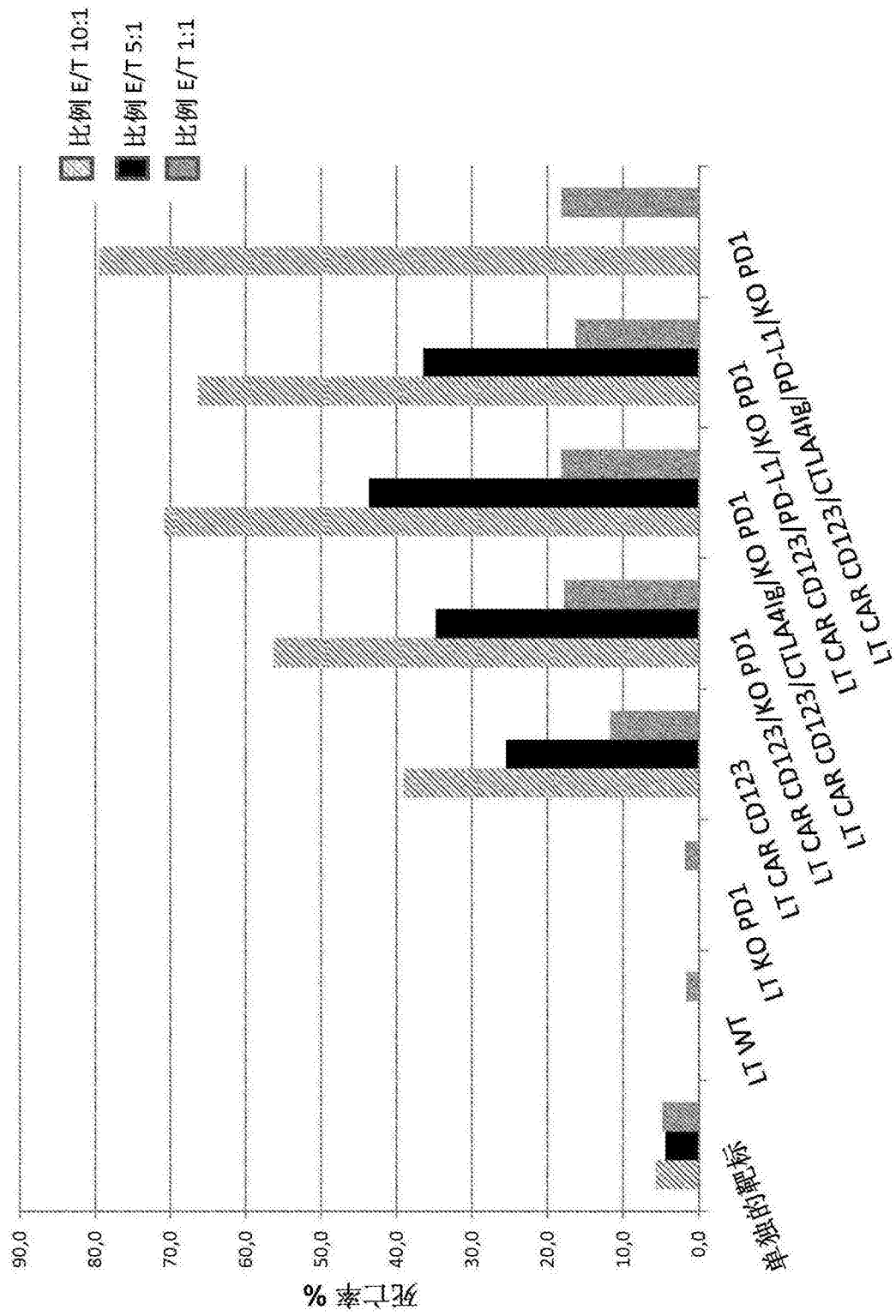


图20

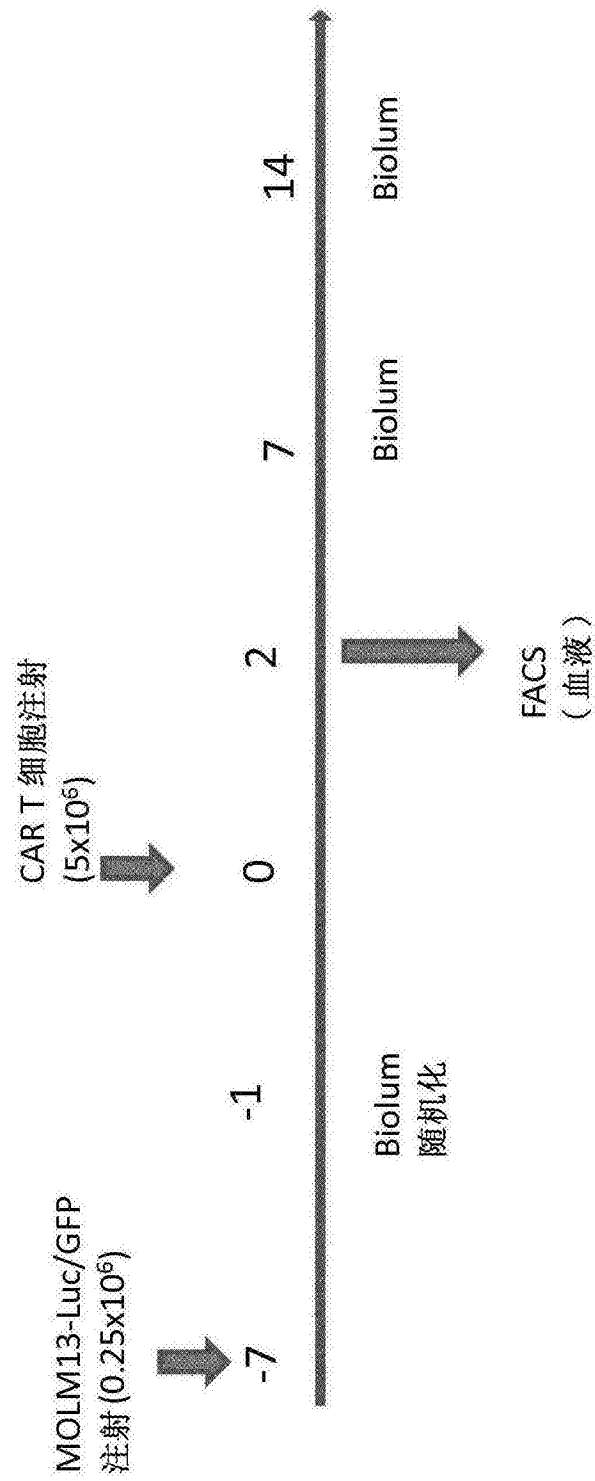


图21

组	% CAR+ 细胞	% PDL1+ 细胞	CTLA4Ig 浓度 (pg/ μ l)
CAR CD123	98.3	不可获得 (n. a.)	不可获得
CAR CD123/PDL1	97.3	96.6	不可获得
CAR CD123/CTLA4Ig	97.7	不可获得	250
CAR CD123/PDL1/CTLA4Ig	97.1	91.9	275

图22

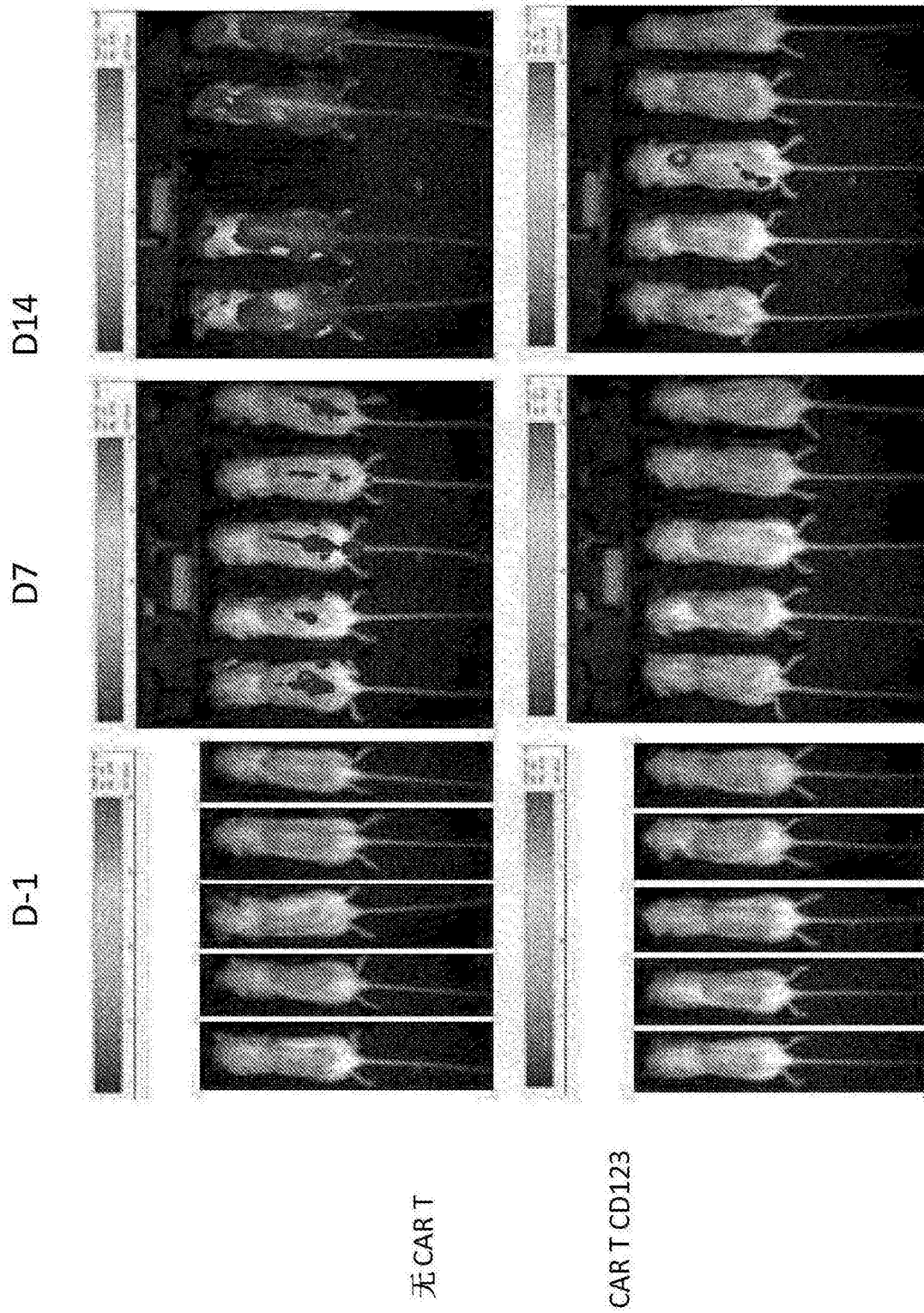


图23A

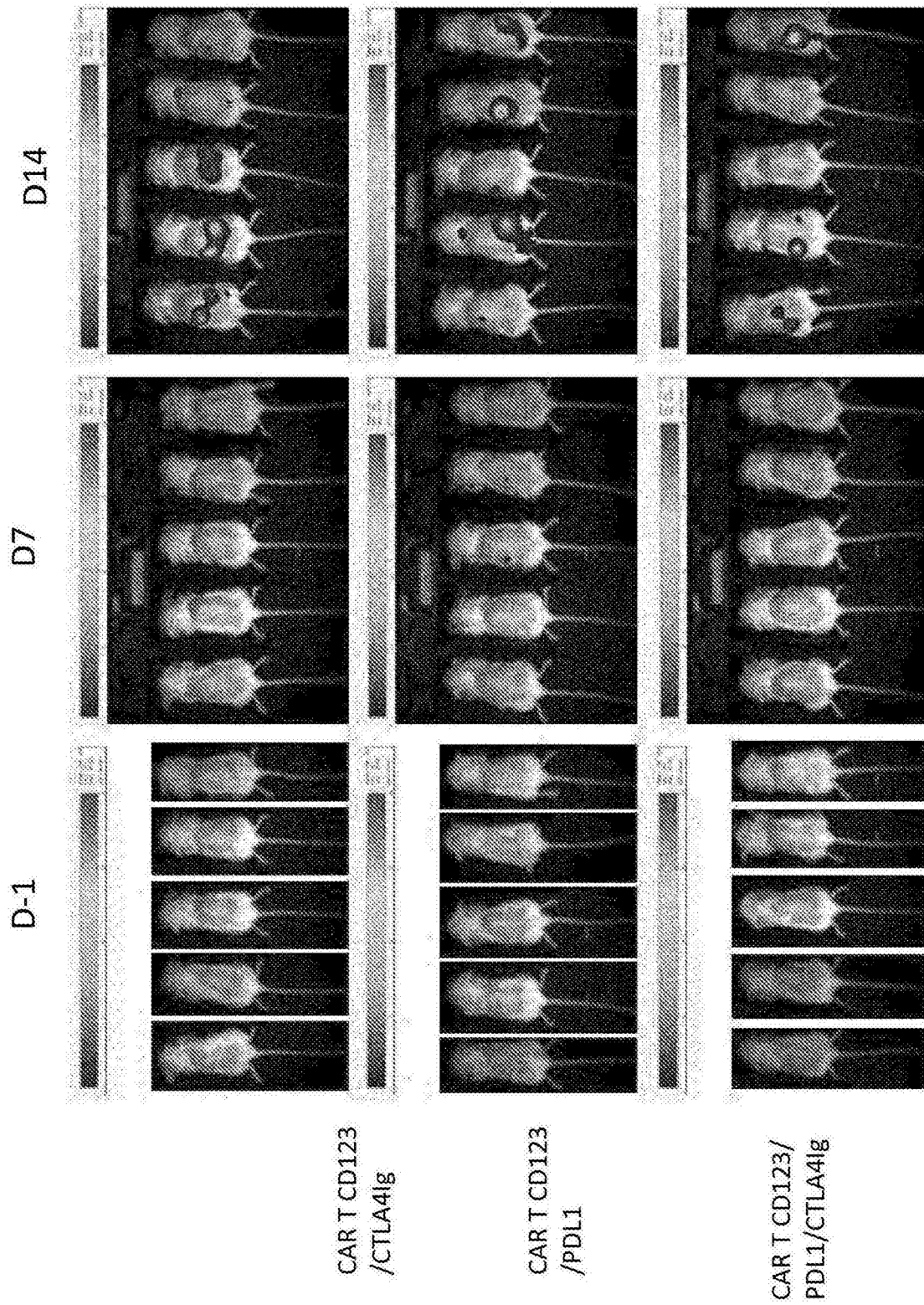


图23B

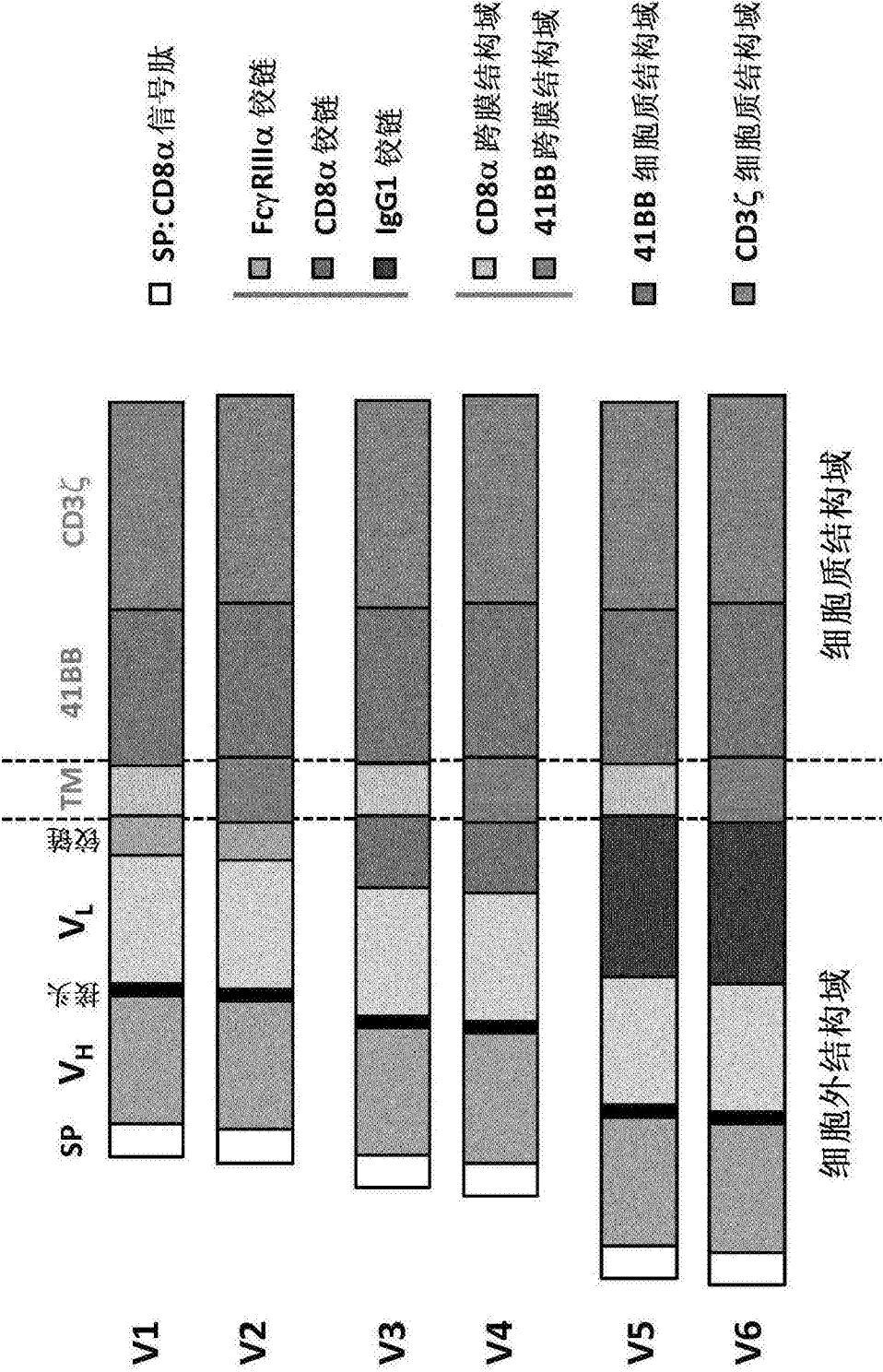


图24