



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0137079  
(43) 공개일자 2017년12월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 5/0783* (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)  
*A61K 39/00* (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 5/0638* (2013.01)  
*A61K 35/17* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7028154
- (22) 출원일자(국제) 2016년03월11일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년09월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/055332
- (87) 국제공개번호 WO 2016/142532  
국제공개일자 2016년09월15일
- (30) 우선권주장  
PA 2015 70138 2015년03월11일 텐마크(DK)

- (71) 출원인  
셀렉티스  
프랑스, 에프-75013 파리, 뤼 드 라 크로아 재리 8
- (72) 발명자  
두차토, 필리페  
프랑스 드라베일 91210, 쿠아이 데 다메스, 바토파웬  
카바니올스, 장-피에르  
프랑스 세인트 로 라 포레 95320, 루 데 이글란틴 스 17  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인 대야

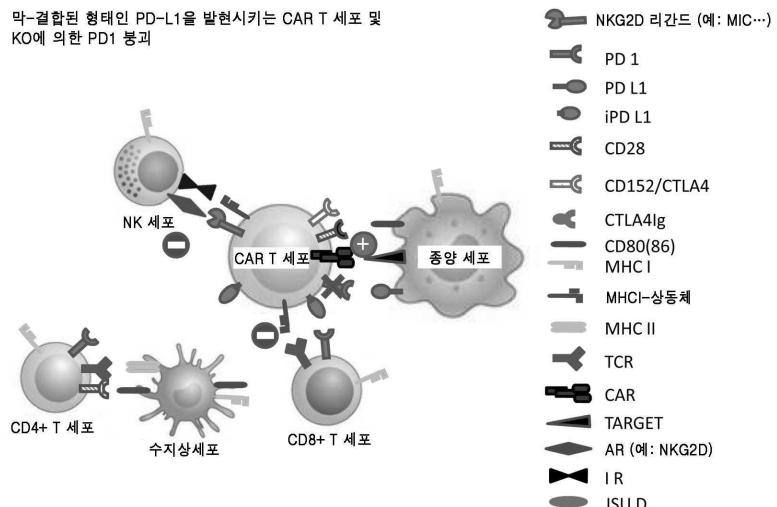
전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 그들을 지속을 증가시키기 위한 동종이계 T 세포의 조작 및/또는 환자들 내로 이식 방법들

### (57) 요 약

본 발명은 숙주 생물에서 지속 및/또는 이식의 더 높은 잠재성을 갖는 면역요법을 위한 T-세포들과 같은 조작된 면역 세포들을 개발하는 방법들에 대한 것이다. 특히, 이 방법은 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드와의 접촉 단계와 결합된, 자가/비 자가 인식에 수반되는 적어도 하나의 유전자 의 불활성화를 수반한다. 본 발명은 표준적이며 입수 가능한 입양 면역요법을 위한 가능성을 가능하게 하며, 이로써 GVH의 위험이 감소된다.

### 대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류

**C12N 5/0006** (2013.01)

*A61K 2039/5156* (2013.01)

*A61K 2039/5158* (2013.01)

*C12N 2501/48* (2013.01)

*C12N 2501/51* (2013.01)

*C12N 2501/599* (2013.01)

*C12N 2510/00* (2013.01)

(72) 발명자

**발통, 줄리안**

미합중국 뉴욕 10009, 뉴욕, 이스트 12번가 533

**포이로, 로랭**

프랑스 파리 75020, 루 드 라 레유니온 10

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기를 포함하는, 숙주 면역 세포들의 존재 하 동종이계 면역 세포들의 지속 및/또는 이식을 증가시키는 방법:

- a) 동종이계 세포들을 제공하는 단계;
- b) 자가 및 비-자가 항원 인식에 대항하는 반응에 수반되는 폴리펩타이드를 코드하는 적어도 하나의 내생의 유전자를 불활성화시킴으로써 상기 세포들을 변형시키는 단계;  
및;
- c) 상기 숙주 면역 세포들을 그것들이 동종이계 면역 세포들과 상호작용을 하는 것을 방지하는 효과를 갖는 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,

단계 b)의 상기 폴리펩타이드는 TCR, 클래스 I 요소의 MHC 클래스, b-2 마이크로글로불린 (B2M), TAP1 및 큰 다중기능적 프로테아제 2 중에서 선택되는 방법.

#### 청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

단계 c)의 상기 면역억제 폴리펩타이드는 막-결합된 형태로 그리고/또는 분비되는 형태로 존재하는 방법.

#### 청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 c)는 상기 면역 세포들의 막 표면에 결합되는 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드를 코드하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되는 방법.

#### 청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역 세포들의 막 표면에 결합되는 상기 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 PD-L1 리간드인 방법.

#### 청구항 6

제 5항에 있어서,

발현되는 막-결합된 형태인, PD-L1 리간드를 코드하는 핵산 분자는 서열번호:18과 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.

#### 청구항 7

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 면역억제 폴리펩타이드는 분비되는 형태로 존재하는 방법.

#### 청구항 8

제 1항 내지 제 3항 또는 제 7항 중 어느 한 항에 있어서,  
단계 c)는 상기 면역 세포들에서 분비되는 형태인 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드를 코드하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되는 방법.

#### 청구항 9

제 8항에 있어서,  
발현되는 CTLA-4 면역글로불린들을 코드하는 핵산 분자는 서열번호: 16-17과 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.

#### 청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서,  
단계 c)는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드 PD-L1 리간드 및 CTLA-4 면역글로불린들 둘 다와 상기 숙주 면역 세포들을 접촉시킴으로써 수행되는 방법.

#### 청구항 11

제 10항에 있어서,  
단계 c)는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드 PD-L1 리간드 및 CTLA-4 면역글로불린들 둘 다의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되는 단계 c)에 의하여 수행되는 방법.

#### 청구항 12

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,  
적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드의 상기 분비는 분비되는 형태인 PD-L1 리간드인 방법.

#### 청구항 13

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 막-결합된 형태인 PD-L1 리간드 및 상기 동종이계 면역 세포들에서 발현되는 CTLA-4 면역글로불린들을 코드하는 핵산 분자들은 서열번호: 18 및 서열번호: 16-17과 각각 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.

#### 청구항 14

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 면역 세포들은 일차 세포들인 방법.

#### 청구항 15

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서,  
단계 c)는 PD-1 유전자의 발현의 불활성화를 추가적으로 포함하는 방법.

#### 청구항 16

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 c)는 막-결합된 형태인 PD-L1 리간드를 코드하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되고, 상기 동종이계 세포들의 추가의 변형은 PD-1 유전자의 발현의 불활성화에 의하여 수행되는 방법.

#### 청구항 17

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 c)는 CTLA4 Ig의 분비로 향하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되고, 상기 동종이계 세포들의 추가의 변형은 PD-1 유전자의 발현의 불활성화에 의하여 수행되는 방법.

#### 청구항 18

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 c)는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드 PD-L1 리간드 and CTLA-4 면역글로불린들 둘 다의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되는 단계 c)에 의하여 수행되고, 상기 동종이계 면역 세포들의 추가의 변형은 PD-1 유전자의 발현의 불활성화에 의하여 수행되는 방법.

#### 청구항 19

제 15항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서,

PD-1 유전자의 불활성화는 서열번호 11-12 및 13-14의 TALE-뉴클레아제들을 코드하는 폴리뉴클레오타이드를 이용함으로써 수행되는 방법.

#### 청구항 20

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 c)의 상기 폴리펩타이드는 PD-L1, CTLA-4, 바이러스 MHC 상동체, NKG2D 리간드, 바이러스 외피(env) 면역 억제 도메인 (ISU) 또는 바이러스 FP 단백질 중에서 선택되는 방법.

#### 청구항 21

제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 b)는 B2M의 불활성화에 의하여 수행되고, 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에서 PD-L1 리간드의 발현

에 의하여 수행되는 방법.

#### 청구항 22

제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 b)는 TCR의 불활성화에 의하여 수행되고, 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에 의한 PD-L1 리간드의 발현에 의하여 수행되는 방법.

#### 청구항 23

제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 b)는 B2M의 불활성화에 의하여 수행되고, 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에 의한 NKG2G 리간드의 발현에 의하여 수행되는 방법.

#### 청구항 24

제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 b)는 B2M의 불활성화에 의하여 수행되고, 단계 c)는 동종이계 면역 세포들에 의한 바이러스 MHC 상동체 UL18 단백질의 발현에 의하여 수행되는 방법.

#### 청구항 25

제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 b)는 TCR의 불활성화에 의하여 수행되고, 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에 의한 바이러스 MHC 상동체 UL18 단백질의 발현에 의하여 수행되는 방법.

#### 청구항 26

제 1항 내지 제 25항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 c)는 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드에서 상기 면역(immune)의 배양에 의하여 수행되는 방법.

#### 청구항 27

제 26항에 있어서,

상기 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 항-CD80 또는 항-CD86 mAbs인 방법.

#### 청구항 28

제 1항 내지 제 27항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 b)에서 유전자 불활성화는 TAL-뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 징크-핑거 뉴클레아제 (ZFN), 또는 RNA 가이드된 엔도뉴클레아제를 이용하여 수행되는 방법.

### 청구항 29

제 28항에 있어서,  
단계 b)에서 유전자 불활성화는 TAL-뉴클레아제를 이용하여 수행되는 방법.

### 청구항 30

제 2항, 제 22항 또는 제 25항에 있어서,  
단계 b)에서 유전자 불활성화는 TCR을 코드하는 유전자의 발현을 억제하는 핵산 분자를 이용하여 수행되는 방법.

### 청구항 31

제 30항에 있어서,  
TCR 유전자의 불활성화는 서열번호 52-53, 55-56, 62-63 및 65-66의 TALE-뉴클레아제들을 이용하여 수행되는 방법.

### 청구항 32

제 2항 또는 21항 내지 제 24항 중 어느 한 항에 있어서,  
단계 b)에서의 불활성화 유전자는 B2M을 코드하는 유전자의 발현을 억제하는 핵산 분자를 이용하여 수행되는 방법.

### 청구항 33

제 32항에 있어서,  
B2M 유전자의 불활성화는 서열번호 2-3, 5-6 및 8-9의 TALE-뉴클레아제들을 이용하여 수행되는 방법.

### 청구항 34

제 1항 내지 제 33항 중 어느 한 항에 있어서,  
d) 악성 또는 감염된 세포의 표면에서 발현되는 적어도 하나의 항원에 대항하여 항하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코드하는 뉴클레오파이드 서열을 포함하는 외인성 핵산 분자를 상기 T-세포 내로 도입하는 단계  
의 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 35

제 34항에 있어서,  
상기 키메라 항원 수용체는 서열번호 67 (CD19 항원), 서열번호 68 (CD38 항원), 서열번호 69 (CD123 항원), 서  
열번호 70 (CS1 항원), 서열번호 71 (BCMA 항원), 서열번호 72 (FLT-3 항원), 서열번호 73 (CD33 항원), 서  
열번호 74 (CD70 항원), 서열번호 75 (EGFR-3v 항원) and 서열번호 76 (WT1 항원)과 80% 동일성이 넘는, 바람직  
하게는 90%를 넘는, 그리고 더욱 바람직하게는 95%를 넘는, 항원 타겟 서열을 갖는 scFv (VH 및 VL 체인들)을  
포함하는 방법.  
40. 제 1항 내지 제 4470항 중 어느 한 항에 있어서,

e) 그 결과인 조작된 T-세포를 확장시키는 단계  
의 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 36

제 1항 내지 제 35항 중 어느 한 항에 따른 방법을 이용하여 수득가능한, 조작된, 바람직하게는 분리된, T-세포.

### 청구항 37

제 36항에 있어서,  
의약으로서 사용을 위한 조작된 T-세포.

### 청구항 38

제 36항 또는 제 37항에 있어서,  
암 또는 바이러스 감염의 치료에의 사용을 위한 조작된 T-세포.

### 청구항 39

제 36항 내지 제 38항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 T-세포는 치료되는 환자로부터 유래하는 조작된 T-세포.

### 청구항 40

제 36항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 T-세포는 기증자로부터 유래하는 조작된 T-세포.

### 청구항 41

제 36항 내지 제 40항 중 어느 하나에 따른 적어도 하나의 조작된 T-세포를 포함하는 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 면역요법을 위한 조작된 비(non)-동종반응성(alloreactive) T-세포들을 개발하는 방법들, 그리고 더욱 특이적으로 동종이계 면역 세포들의 이식 및/또는 지속을 증가시키기 위한 방법들에 대한 것이다. 이 방법은 적어도 바람직하게는 특정 희귀-절단 엔도뉴클레아제의 사용에 의하여 자기/비(non)-자기인식의 원인임을 시사하는 유전자의 불활성화 단계, 및 뒤이어 (D-L1 리간드 및/또는 CTLA-4 Ig와 같은) 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드와 상기 조작된 면역 세포들의 접촉 단계를 수반한다. 이 발명은 또한 조작된 면역 세포들 및 그것들의 기능적 유도체들, 키메라(Chimeric) 항원(Antigen) 수용체(Receptor) (CAR), 멀티체인(multichain) CAR 및 면역요법의 효율을 증강시키기 위한 그것들의 용도에 대한 것이다. 본 발명은 이식편대숙주 질환 GvHD의 위험을 감소시킴으로써 더 안전한 전략으로의 길을 열고, 알맞은 입양 면역요법을 가능하게 한다.

## 배경 기술

[0002]

엑스 비보(ex vivo)에서 만들어진 자가조직의(autologous) 항원-특이적 T 세포들의 이동(transfer)을 수반하는 입양 면역요법은 바이러스 감염들 및 암을 치료하는 유망한 전략이다. 입양 면역요법에 사용되는 T 세포들은 유전적 조작을 통한 T 세포들의 방향전환 또는 항원-특이적 T 세포들의 확장에 의하여 만들어질 수 있다 (Park, Rosenberg et al. 2011). 바이러스 항원 특이적 T 세포들의 이동은 이식 관련 바이러스 감염들 및 희귀한 바이러스-관련 악성종양들의 치료에 사용되는 잘 정립된 절차이다. 유사하게 종양 특이적 T 세포들의 분리 및 이동은 흑색종에서 성공적으로 보여 왔다.

[0003]

T 세포들에서 신규 특이성들은 키메라 항원 수용체들 (CARs) 또는 유전자이식(transgenic) T 세포 수용체들의 유전적 이동을 통하여 성공적으로 만들어져 왔다 (Jena, Dotti et al. 2010). CAR들은 단일 융합 분자에서 하나 이상의 신호전달(signaling) 도메인들과 관련된 타겟팅 모이어티로 구성되는 합성 수용체들이다. 일반적으로, CAR의 결합 모이어티(moietiy)는 가요성(flexible) 링커에 의하여 연결된 가벼운 그리고 가변 단편들을 포함하는 단일(single)-체인(chain) 항체(antibody) (scFv)의 항원-결합 도메인으로 구성된다. 수용체 또는 리간드 도메인들에 기초한 결합 모이어티들 또한 성공적으로 사용되어 왔다. 일 세대 CAR들을 위한 신호전달(signaling) 도메인들은 CD3제타(zeta) 또는 Fc 수용체 감마 체인들의 세포지리 영역으로부터 유래된다. 일 세대 CAR들은 T 세포 세포독성으로 성공적으로 방향전환(redirec)하는 것으로 보여져 왔으나, 그것들은 체내에서 항-종양 활성 및 연장된 확장을 제공하는데 실패하였다. CD28, OX-40 (CD134), and 4-1BB (CD137)를 포함하는 공(co)-자극(stimulatory) 분자들로부터의 신호전달(signaling) 도메인들이 CAR 변형된 T 세포들의 생존을 향상시키고 증식을 증가시키기 위하여 단독으로 (이 세대) 또는 조합하여 (삼 세대) 첨가되어 왔다. CAR들은 T 세포들이 림프종들 및 고형 종양들을 포함하는 여러가지 악성종양들로부터의 종양 세포들의 표면에서 발현되는 항원들에 대항하여 방향전환되는 것을 성공적으로 가능하게 해왔다 (Jena, Dotti et al. 2010).

[0004]

입양 면역요법을 이용한 환자들의 치료를 위한 현재의 프로토콜은 자가조직의(autologous) 세포 이동에 기초한다. 이 접근에서, T 림프구들은 환자들에게서 회수되고, 유전적으로 변형되거나 또는 엑스 비보에서 선택되고, 필요 시 최종적으로 환자에게 주입되기 위하여 세포들의 수를 증식시키기 위하여, 시험관 내에서 배양되었다. 림프구 주입(infusion)에 추가하여, 숙주는 (IL-2와 같은) 림프구 성장 인자들의 투여 및 예컨대 (방사선 또는 화학요법으로) 프리-컨디셔닝인, T 세포들의 이식 또는 그것들의 면역 반응에의 참여를 지지하는 다른 방법들로 조작될 수 있다. 각각의 환자는 환자 자신의 림프구들 (즉 자가조직(autologous) 치료)을 이용하여 개별적으로 가공된 치료를 받는다. 자가조직 요법들은 실질적 적용까지 상당한 기술적 및 논리적(logistic) 장애들에 직면하였는데, 그것들의 제조는 비싸고 복잡한 시설들 및 전문 인력들을 요구하고, 그것들은 환자의 진단 후 빠른 시간 내에 만들어져야 하고, 많은 경우에 환자들의 전치료(pretreatment)는 저하된 면역 기능을 야기하여, 환자의 림프구들이 기능이 낮아지고 매우 적은 수가 존재한다. 이러한 장애물들 때문에, 각 환자의 자가조직의(autologous) 세포 제조는 효과적으로 새로운 제품이며, 약효 및 안전성에 상당한 변화를 야기한다. 이상적으로, 동종이계(allogeneic) 치료적 세포들이 미리 제조되고, 상세하게 특성화되고, 환자들에게 즉시 투여가 가능한 표준화된 요법을 사용하고 싶을 것이다. 동종이계에 의하여 동일한 종이지만 유전적으로 다른 개체로부터 수득되는 세포들이 의미된다. 그러나 동종이계 세포들의 사용은 현재 많은 결점들을 갖는다. 면역적격(immune-competent) 숙주들에서 동종이계 세포들은 급히 거부되는데, 이는 숙주대(host versus) 이식편(grat) 거부(rejection) (HvG)로 명명된 과정으로, 이것은 이동된 세포들의 약효를 상당히 제한한다. 면역부적격(immune-incompetent) 숙주들에서, 동종이계 세포들은 이실되는 것은 가능하나, 그것들의 내생의 TCR 특이성들이 숙주 조직을 외래의 것으로 인식하여, 심각한 조직 손상 및 사망을 이끌 수 있는 이식편대(grat versus) 숙주(host) 질병(disease) (GvHD)을 야기한다. 동종이계 세포들을 효과적으로 이용하기 위하여 이를 문제점을 둘다 극복되어야 한다.

[0005]

면역적격 숙주들에서 동종이계 세포들은 숙주 면역 체계에 의하여 급하게 거부된다. 방사선조사되지 않은 혈액제품들에 존재하는 동종이계 백혈구들이 5 내지 6일 넘게 지속되지 않는다는 것이 입증되어 왔다 (Boni, Muranski et al. 2008). 그러므로, 동종이계 세포들의 거부를 예방하기 위하여 호스트의 면역 체계는 효과적으로 억제되어야 한다. 글루코코르티코이드 스테로이드들(glucocorticoidsteroid)은 면역억제를 위하여 치료적으로 널리 사용된다 (Coutinho and Chapman 2011). 이 종류의 스테로이드 호르몬들은 T 세포들의 시토졸(cytosol)에 존재하는 글루코코르티코이드 수용체 (GR)에 결합하여 핵으로의 자리 이동 및 면역 공정에 관여되는 다수의 유전자들의 발현을 조절하는 특정 DNA 모티프들의 결합을 야기한다. 글루코코르티코이드 스테로이드들과 T 세포들의 치료는 T 세포 활성화의 방해 및 T 세포 결핍(anergy)을 이끄는 사이토카인 생산의 감소된 수준을 야기한다. CAMPATH1-H으로도 알려진 알렘투주맙은 12 아미노산 글리코실포스파티딜

(glycosylphosphatidylinositol)-이노시톨(inositol)- (GPI) 연결된 당단백질인 CD52을 타겟팅하는 인간화된 단일클론 항체이다 (Waldmann and Hale 2005). CD52는 T 및 B 램프구들에서 높은 수준으로 그리고 단핵구에서 낮은 수준으로 발현되는 반면 과립구 및 골수 전구체들에서는 없다. 알렘투주맙(Alemtuzumab)으로 하는 치료, CD52에 대항하여 항해지는 인간화된 단일클론 항체, 는 순환 램프구들 및 단핵구들의 급한 소모를 유도하는 것으로 보여져 왔다. 이식의 컨디셔닝(conditioning) 요법(regimen)의 부분들로서 특정 경우들 및 T 세포 램프종들의 치료에서 흔히 사용된다. 그러나 입양 면역요법의 경우 면역억제 약물들의 사용은 또한 도입된 치료적 T 세포들에 해로운 영향을 가질 것이다. 그러므로 이러한 조건들에서 입양 면역요법 접근을 효과적으로 이용하기 위하여, 도입된 세포들은 면역억제 치료에 내성일 필요가 있을 것이다.

[0006]

반면, T 세포 수용체들 (TCR)은 항원의 제시에 대응하여 T 세포들의 활성화에 참여하는 세포 표면 수용체들이다. TCR은 일반적으로 헤테로다이머를 형성하기 위하여 조립되는 알파 및 베타, γ δ 개의 체인들로 만들어지며, 세포 표면에 존재하는 T-세포 수용체 복합체를 형성하기 위하여 CD3-형질도입하는(transducing) 서브 유닛들(subunits)과 어울린다. TCR의 각 알파 및 베타 체인은 면역글로불린-유사 N-말단 가변(variable) (V) 및 불변(constant) (C) 영역, 소수성 막관통 도메인, 및 짧은 세포질 영역으로 구성된다. 면역글로불린 분자들에 대하여 알파 및 베타 체인들의 가변 영역은 V(D)J 재조합에 의하여 만들어지며, T 세포들의 군집 내 항원 특이성들에 많은 다양성을 만들어낸다. 그러나 온전한 항원을 인식하는 면역글로불린들과는 대조적으로, T 세포들은 MHC 분자와 관련하여 가공된 웹타이드 단편들에 의하여 활성화되어, MHC 제한으로 알려진, T 세포들에 의한 항원 인식에 추가의 차원(dimension)을 도입한다. T 세포 수용체를 통한 기증자 및 받는 사람(recipient) 사이의 MHC 차이들의 인식은 T 세포 증식 및 GVHD의 잠재적인 발달을 이끈다. TCR의 정상적인 표면 발현은 복합체의 일곱개의 요소들 모두의 협조된 합성 및 조립에 의존하는 것이 보여져 왔다 (Ashwell and Klusner 1990). TCR알파(alpha) 또는 TCR베타(beta)의 불활성화는 동종항원의 인식을 방지하는 T 세포들의 표면으로부터 TCR의 제거, 및 이로써 TCR을 야기할 수 있다. 그러나 TCR 붕괴는 CD3 신호전달(signaling) 요소의 제거를 야기하고 추가의 T 세포 확장의 수단들을 변화시킨다.

[0007]

입양 면역 반응은 많은 세포 요소들이 상호작용하는 복잡한 생물학적 시스템이다. 전문적인 항원(Antigen) 제시(Presenting) 세포들(Cells) (APC)은 이를질들을 가공하고 MHC 클래스(Class) II 분자들의 맥락에서 헬퍼 T 세포들에게 그것들을 노출시킬 수 있다. 활성화된 헬퍼 T 세포들은 결국 B 세포들 반응 및 세포독성 T (CTL) 세포들 반응을 자극할 것이다. CTL은 MHC 클래스 I 분자들에 의하여 제시되는 외래 웹타이드들을 인식하나, 동종인식편반응의 경우, 외래 MHC 클래스 I을 지닌 세포들을 죽인다. MHC 클래스 I 분자들은 2 개의 독립체들로 이루어진다 : 매우 다형적인, 막관통 중쇄 및 작은 불변(invariant) 폴리웹타이드, B2M 유전자에 의하여 코드되는 β2-마이크로글로불린(β2-m). 세포 표면에서 MHC 클래스 I 중쇄의 발현은 그것의 β2-m과의 관계를 요구한다. 이런 이유로, CAR T 세포들에서 β2-m 발현의 폐기는 MHC 클래스 I 발현을 손상시키고 그것을 숙주 CTL에 보이지 않게 만들 것이다. 그러나 MHC 클래스 I 결핍 CAR T 세포들은 숙주 NK 세포들에 의한 세포용해(lysis)에 민감한데, 이는 MHC 클래스 I 분자들이 부족한 세포들을 타겟으로 한다. [Ljunggren HG et al.(1990), Immunol Today. 11:237-244].

[0008]

NK 세포들은 다른 단일형 또는 다형성 수용체들을 통하여 그것들이 받은 활성화 및 억제 신호들 사이의 균형에 기초하여 상호작용하는 세포들을 향하여 세포독성 기능을 행한다. 인간 NK 세포들에 대한 하나의 가장 중요한 활성화시키는 수용체는 NKG2D이고 그것의 리간드들은 MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3과 같은 단백질들을 포함한다 [Raulet DH, (2003), Nature Reviews Immunology 3 (10): 781-79]. 반면, 억제 신호는 MHC 클래스 I 분자들 및 LIR-1/ILT2와 같은 NK 수용체들 사이의 상호작용을 통하여 매개된다 [Ljunggren HG et al.(1990), Immunol Today. 11:237-244]. 사이토메갈로바이러스들(cytomegaloviruses)과 같은 몇몇 바이러스들은 NK 세포 매개 면역 감시를 피하기 위하여 요구되는 메커니즘들을 수득해왔다. HCMV 계놈은 MHC 클래스 I 표면 발현을 방지할 수 있는 단백질들을 코드하는 반면 (즉 US2, US3, US6 and US11), NK-매개 세포 세포용해를 차단하는 유인으로서 작용하는 MHC 클래스 I 상동체(homolog) 단백질 (UL18)을 발현시킨다 [Kim, Y et al. (2008), PLOS Pathogens. 4: e1000123, and Wilkinson G. et al. (2010). J Clin Virol. 41(3):206-212]. 게다가, HCMV는 NKG2D 리간드들에 결합하고 그것들의 표면 발현을 방지할 수 있는 단백질을 분비함으로써 NKG2D 경로를 방해한다. [Welte SA et al. (2003), Eur J Immunol 33 (1): 194-203]. 종양 세포들에서, 몇몇 메커니즘들은 ULBP2, MICB 또는 MICA와 같은 NKG2D 리간드들을 분비함으로써 NKG2D 반응을 피하도록 수반되어 왔다 (Waldhauer I, Steinle A (2003). 종양 세포들로부터 가용성 UL16-결합 단백질 2 의 단백질분해성 방출.Cancer Res 2006; 66(5): 2520-2526; Salih HR et al. (2006), Hum Immunol. 2006 Mar;67(3):188-95; Salih HR et al. (2003) Blood. 2003 Aug 15;102(4):1389-96; Salih HR et al. (2002) J Immunol.;169(8):4098-102].

[0009]

많은 전략들이 숙주 면역 체계를 피하기 위하여 바이러스들에 의하여 사용된다. 레트로바이러스 외피를 발현시키는 종양 세포들은 생체 내에서 면역 거부를 피한다. [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]. 렌티바이러스들(lentiviruses) (HIV 1 및 HIV 2)와 더불어 몰로니(Moloney) 뮤린 백혈병 바이러스와 같은 레트로바이러스들이 그것들의 외피 단백질 gp41를 통하여 면역억제 활성을 가한다는 것이 보여져 왔다 [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]. 이 바이러스 단백질의 일차 기능이 바이러스 및 세포 막 사이의 융합을 촉진하는 것임에도 불구하고, gp41의 다른 도메인들이 T 세포 활성화 및 증식을 억제할 수 있다. (ImmunoSuppressive Unit을 위하여) ISU로 명명된 첫 번째 것은 gp41의 N-나선 반복의 C-말단 부분에 위치된다 (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). 그것의 작용 모드는 잘 정립되지 않았지만 칼슘 유입 및 PKC (단백질(protein) 키나아제(Kinase) C) 기능을 방해하는 것으로 보인다. FP (융합(fusion) 웨타이드(peptide))로 명명된 두 번째 것은 단백질의 N 말단 부분에 위치하며, TCR알과 체인과 직접적으로 상호작용하여 TCR 복합체 조립을 방지한다 [Cohen T et al (2010), PLOS Pathogens. 6:e1001085; Faingold O et al, (2012), J. Biol. Chem. 287:33503]. ISU 및 FP 둘 다 전체 단백질 막관통 단백질, 끝이 잘린(truncated) 막관통 단백질 또는 합성 웨타이드들로서 면역억제제로 보여져 왔다.

[0010]

면역력에 의하여 매개되는 T-세포는 면역력 반응 미세하게 조정하는 억제 신호들 및 공-자극 사이의 균형에 의하여 조절되는 복수의 순차적인 단계들을 포함한다. 면역 체크포인트들로 불리는 억제 신호들은 면역-매개된 부수적인 조직 손상을 제한하고 자가내성의 유지에 결정적이다. 면역 체크포인트들 단백질의 발현은 종양들에 의하여 하향조절될 수 있다. 이를 억제 경로들을 함께(co)-택하는 종양들의 능력은 면역 내성에서 중요한 메커니즘을 나타내며 면역요법의 성공을 제한한다. 치료적 T-세포 면역 반응을 활성화시키는 유망한 접근들 중 하나는 이를 면역 체크포인트들의 봉쇄이다 (Pardoll 2012). 면역 체크포인트들은 암에서 기능적 세포 면역의 활성화에 대한 중요한 장벽을 나타내며, CTLA4 및 프로그램된(programmed) 죽음(death)-1 (PD-1)을 포함하는 T 세포들 상 억제 리간드들에 특이적인 길항제(antagonistic) 항체들은 임상에서 평가되는 타겟인 제제들의 예들이다.

[0011]

세포독성(Cytotoxic)-T-림프구(lymphocyte)-관련(associated) 항원 4 (CTLA-4; CD152로도 알려짐)은 세포 활성화의 진폭을 하향조절하며 길항제 CTLA4 항체들 (이필리무맙(ipilimumab))으로 하는 치료는 흑색종 환자들에게서 생존 이익을 보였다 (Robert and Mateus 2011). 프로그램된 세포 사망 단백질 1 (PD1 또는 CD279로도 알려진 PDCD1)은 면역요법의 매우 유망한 또다른 타겟을 나타낸다 (Pardoll and Drake 2012; Pardoll 2012). CTLA-4와는 대조적으로, PD1은 자가면역력을 제한하기 위하여 그리고 감염에 대한 염증 반응의 시기에 말초 조직에서 T 세포 효과기(effector) 기능을 제한한다. PD1 항체로 하는 첫 번째 임상 시험은 종양 퇴화의 몇몇 경우들을 보인다 (Brahmer, Drake et al. 2010). 복수 개의 추가적인 면역 체크포인트 단백질은 최근 연구에 기초한 치료적 봉쇄를 위한 유망한 타겟들을 나타낸다.

[0012]

WO2013/173223A 출원은 PD-1-PD-L1 경로가 PD-1 및/또는 PD-L1에 대항한 항체들의 투여에 의하여 방해되는, 면역요법을 위한 방법을 기재한다. 이 억제 면역조절기(immunoregulator)는 가이드 치료상(on-treatment) 관리 및 환자 선택을 가능하게 하기 위한 바이오마커로서 사용된다.

[0013]

Pegram et al. (2012)는 인터페론 IL-12를 분비하도록 변형된 종양-타겟된 T 세포들이 방사선조사, 림프격감(lymphodepleting) 화학요법 및/또는 추가적인 사이토카인 지원과 같은 전(prior) 컨디셔닝의 필요 없이, 뮤린 모델에서 전신적인 종양들을 뿌리뽑을 수 있다는 것을 보였다.

[0014]

Rong et al. (2014)는 CTLA-4 Ig 및 PD-L1 둘다의 발현이 그 중 어느 것도 그것들 자신에게 충분하지 않기 때문에 면역 보호를 부여하기 위하여 인간 배아 줄기 세포들 (hESCs)에서 요구된다는 것을 입증하였다. 이 접근은 마우스들 내로 인간 배아 줄기 세포들의 동종이식편을 지지하는데 사용되어 왔다.

[0015]

상기 선행문헌들 세 개 모두에서 (WO2013/173223A, Pegram et al., 및 Rong Z et al.), TCR과 같은 자가-인식 시스템은 기능적으로 유지되었는데, 이는 숙주 내로 이식된 세포들의 지속을 제한하였다. 그러나 암 면역요법에서 또는 다른 정후들에서, 치료로서 동종이식 CAR T 세포들을 사용하기 위하여, 환자에 의한 치료적 세포들의 거부 위험과 더불어 이식편대 숙주 질환 (GvHD)의 위험을 완화시켜야 한다. 타생(allogeenic) 세포들은 림프격감요법(regimen)을 받은 환자들에게서 생존할 수 있지만, 그것들의 치료적 활성을 림프격감 지속에 의하여 제한된다.

[0016]

그것들의 생존을 확장하고 그것들의 치료적 활성을 향상시키기 위하여, 본 발명자들은 치료적 동종이계 T 세포들의 거부를 예방하고, 반면 환자의 면역 체계는 여전히 활성일 수 있는 방법을 여기에 기재한다. 이 방법은 세포 막을 통하여 또는 거기에서 면역억제 폴리펩타이드들을 분비 및/또는 전위성으로(ectopically) 발현시키기 위한 치료적 세포들을 조작함으로써 국소적 면역 보호를 만드는 것으로 구성된다. 그들은 바이러스 외피 또는 NKG2D 리간드로부터 유래되거나 또는 이러한 폴리펩타이드들 특히 면역 체크포인트들의 항체들의 여러가지 패널(panel)이 숙주 내로 동종이계 면역 세포들의 이식 및/또는 지속을 향상 시킬 수 있다는 것을 발견하였다. 더 좋은 약효를 위하여 이 국소적 면역억제 효과는 자가/비-자가 인식에 관여되는 유전자의 불활성화에 의하여 완성되며, 이식을 위한 이를 조작된 면역 세포를 기성품인 제품으로 이용가능하게 만든다.

### 도면의 간단한 설명

[0017]

도면들 및 표들의 간단한 설명

상기에 추가하여, 본 발명은 첨부된 도면들과 더불어, 하기의 설명들로 드러내어지는 특징들을 더 포함한다. 동일한 것이 하기 기재된 설명과 함께 하기 특징들을 참조로 하여 더 잘 이해되게 되기 때문에, 본 발명의 완전한 이해 및 그것의 많은 수반되는 이점들을 쉽게 얻을 것이다.

#### 특징들의 범례들

도 1: 동종이계 CAR T 세포와 다양한 숙주 면역 세포들 (CD8+ 및 CD4+ T 세포, 수지상 세포와 같은 APC 및 NK 세포)의 잠재적 상호작용들의 도식적 표시, CAR T 세포는 추가적인 유전적 변형을 갖지 않는다. 표시 (+)는 활성화를, 표시 (-)는 억제를 나타낸다. CAR T 세포는 CAR의 scFvs에 의하여 인식되는 항원 세포 표면을 보여주는 타겟된 종양 세포를 맞닥뜨림으로써 활성화된다. 동종이계 CAR T 세포 및 숙주 NK 세포 사이의 상호작용은 NK 세포의 억제제에 의한 MHC I의 인식에 의하여 억제된다. 숙주 세포독성 T 세포 (CD8+ T 세포)의 활성화는 CAR T 세포의 MHC I 요소들의 TCR에 의하여 결합됨으로써 발생된다. 또한 동종이계 T CAR 세포 상 숙주 NK 세포의 작용은 MHCI 인식을 거쳐 억제된다.

도 2: 동종이계 CAR T 세포와 다양한 숙주 면역 세포들 (CD8+ 및 CD4+ T 세포, 수지상 세포와 같은 APC 및 NK 세포)의 잠재적 상호작용들의 도식적 표시; 분비된 CTLA-4 Ig들을 발현시키는 CAR T 세포. 표시 (+)는 활성화를, 표시 (-)는 억제를 나타낸다. CAR T 세포는 CAR의 scFv들에 의하여 인식되는 항원 세포 표면을 보이는 타겟된 종양 세포를 보임으로써 활성화된다. NK 세포 및 CAR T 세포 사이의 상호작용이 변하지 않고 남아 있다. 분비된 CLTA-4 Ig들은 APC 세포 및 종양 세포의 표면 상 CD80/CD86 항원에 결합되며, 그러므로 (여기에서 수지상 세포와 같은) APC 세포 및 CAR T 세포 사이의 상호작용을 불활성화시킨다. 그러므로, CLTA-4 Ig들의 분비는 국지적인 면역 보호를 만들어낸다.

도 3: 동종이계 CAR T 세포와 다양한 숙주 면역 세포들 (CD8+ 및 CD4+ T 세포, 수지상 세포와 같은 APC 및 NK 세포)의 잠재적 상호작용들의 도식적 표시; 그 PD-1 유전자가 KO에 의하여 불활성화되고 막-결합된 PD-L1을 발현시키는 CAR T 세포. 표시 (+)는 활성화를, 표시 (-)는 억제를 나타낸다. 종양 세포로 CAR T 세포 사이의 잠재적 상호작용 및 NK 세포는 변화 없이 남아 있다. 동종이계 CAR T 세포에 의한 PD-L1의 발현은 그것을 숙주 CD8+ T 세포에 민감하게 만드는데, 이는 후자의 것의 PD-1 수용체에 대하여 PD-L1을 결합시키는 것 때문이다. 그러므로, PD-L1은 환자의 T 세포들에서 T 세포들 억제 경로를 촉발시키고, 동종이계의 PD-1 유전자가 불활성화될 때 이 효과는 더욱 확연하다.

도 4: 동종이계 CAR T 세포와 다양한 숙주 면역 세포들 (CD8+ 및 CD4+ T 세포, 수지상 세포와 같은 APC 및 NK 세포)의 잠재적 상호작용들의 도식적 표시; 그 PD-1 유전자가 KO에 의하여 불활성화되고 분비된 PD-L1을 발현시키는 CAR T 세포. 표시 (+)는 활성화를, 표시 (-)는 억제를 나타낸다. 종양 세포와 함께 CAR T 세포 사이의 잠재적 상호작용 및 NK 세포는 변화 없이 남아 있다. 동종이계 CAR T 세포에 의한 분비된 PD-L1은 그것들의 PD-1 수용체들에 의하여, 숙주 CD8+ 및 CD4+ T 세포에 결합할 수 있고, 이는 PD-L1/PD-1 경로를 억제한다. 그런 식으로, PD-L1은 환자의 T 세포들에서 T 세포들 억제 경로를 촉발시키고, 이 효과는 동종이계의 PD-1 유전자가 불활성화될 때 더욱 확연하다.

도 5: 동종이계 CAR T 세포와 다양한 숙주 면역 세포들 (CD8+ 및 CD4+ T 세포, 수지상 세포와 같은 APC 및 NK 세포)의 잠재적 상호작용들의 도식적 표시; 바이러스 외피(env) 면역억제(immunosuppressive) 도메인 (ISU)을 발현시키는 CAR T 세포. 표시 (+)는 활성화를, 표시 (-)는 억제를 나타낸다. 종양 세포와 함께 CAR T 세포 사이의 잠재적 상호작용 및 NK 세포는 변화 없이 남아 있다. 바이러스 ISU의 발현은 숙주 T 세포들에 의한 동종이계 CAR T 세포의 인식을 억제하는 것으로 나타나고, APCs 세포들은 IL-10 인터루킨의 감소된 생산에 의하여 일

수 있고, 그러므로 면역억제 효과를 만들어낸다.

도 6: 동종이계 CAR T 세포와 다양한 숙주 면역 세포들 (CD8+ 및 CD4+ T 세포, 수지상 세포와 같은 APC 및 NK 세포)의 잠재적 상호작용들의 도식적 표시; KO에 의하여 불활성화된 그것의 B2M 유전자를 갖는 CAR T 세포. 표시 (+)는 활성화를, 표시 (-)는 억제를 나타낸다. 종양 세포와 함께 CAR T 세포 사이의 잠재적 상호작용이 변화하지 않고 남아 있다. MCHI의 한 요소인 B2M 유전자의 불활성화는 후자를 NK 세포와 숙주 세포독성 T 세포 (CD8+)의 상호작용들에 대하여 비-기능적으로 만든다. 그 다음에, NK 세포는 NKG2D/NKG2D 리간드와 같은 활성인자 경로를 통하여 동종이계 CAR T 세포 상에서 그것의 활성화를 가할 수 있다.

도 7: 동종이계 CAR T 세포와 다양한 숙주 면역 세포들 (CD8+ 및 CD4+ T 세포, 수지상 세포와 같은 APC 및 NK 세포)의 잠재적 상호작용들의 도식적 표시; KO에 의하여 불활성화된 그것의 B2M 유전자를 갖고 바이러스 MHCI 상동체를 발현시키는 CAR T 세포. 표시 (+)는 활성화를, 표시 (-)는 억제를 나타낸다. 종양 세포를 갖고 CAR T 세포 사이의 잠재적 상호작용이 변하지 않고 남아 있다. 앞선 특징에 대하여 말하자면 (B2M KO 만), CAR T 세포 및 숙주 CD8+ T 세포 사이의 상호작용이 완화된다. 이 경우에, 바이러스 MHCI 상동체의 발현이 NK 세포와의 상호작용을 MHCI/억제인자 수용체를 통하여 작동하지 않게(inoperative) 만든다. 바이러스 MHCI 상동체의 발현과 결합된 B2M의 KO에 의한 동종이계 CAR T 세포들의 이중 유전적 변형이 그것들의 면역억제 보호를 강화시킨다.

도 8: 동종이계 CAR T 세포와 다양한 숙주 면역 세포들 (CD8+ 및 CD4+ T 세포, 수지상 세포와 같은 APC 및 NK 세포)의 잠재적 상호작용들의 도식적 표시; KO에 의하여 불활성화되는 그것의 B2M 유전자를 갖고 가용성 (soluble) NKG2D 리간드를 발현시키는 CAR T 세포. 표시 (+)는 활성화를, 표시 (-)는 억제를 나타낸다. 종양 세포를 갖는 CAR T 세포 사이의 잠재적 상호작용이 변하지 않고 남아 있다. 앞선 도면 (B2M KO만)에 대하여 말하자면, CAR T 세포 및 숙주 CD8+ T 세포 사이의 상호작용이 완화된다. 가용성 NKG2D 리간드의 발현은 NK 세포와의 상호작용을 불활성화시키는 또 다른 방법이다. 이 경우에서, 억제적 경쟁을 가하는 CAR T 세포의 NKG2D 리간드와 대조적으로, 가용성 NKG2D 리간드는 NK 세포 상 NKG2D 수용체에 결합할 수 있으나 영향을 가하지 않는다. 가용성 NKG2D 리간드의 발현과 결합된 B2M의 KO에 의한 동종이계 CAR T 세포들의 이중 유전적 변형은 그것들의 면역억제 보호를 강화시킨다.

도 9: 잠재적 숙주대 이식편 반응 (HvG)을 보여주는 동종이계 CAR T 세포 입양 면역요법의 일반적인 도식. 여기에 급성 림프아구성(lymphoblastic) 백혈병 (ALL)으로 고통받는 환자들을 치료하는 것을 목표로 하는 항-CD19 키메라 항원 수용체 (CAR)로 하는 예가 나타내어진다. 건강한 기증자로부터의 동종이계 T 세포들의 정제, 그것들의 활성화 및 확장, CAR 형질도입(transduction) 및 최종적으로 ALL 환자 내로 그것들의 주입 단계들 후, 이를 동종이계 CAR T 세포들에 대항한 숙주 면역 공격 (HvG)의 높은 위험이 있다.

도 10: 동종이계 CAR T 세포들 입양 이동 후 숙주 환자에서 발생하는 HvG 반응을 방지하기 위한 PD-L1의 재발현을 기재하는 도식. A. 일차 T 세포들의 세포 표면에서 PD-L1의 재발현을 통한 HvG 반응 방지의 도식. B. PD-L1 발현의 부재 하 HvG 반응의 도식.

도 11: 동종이계(allogeneic) T 세포들의 존재 하 그것들의 활성화에 수반되는 수용체들의 명칭들에 따른 숙주 T 세포들 및 숙주 항원 제시 세포들 (APC)을 포함하는 HvG 반응을 설명하는 도식. A. HvG 반응의 도식. B. 동종이계 T 세포들에 의한 CTLA4-Ig의 분비에서 HvG 방지의 도식.

도 12: 유동세포 분석법에 의한 CAR 도구 T 세포들 또는 T 세포들의 표면에서 PD-L1의 발현의 A, B & C 특성화.

도 13: 관련된 그리고 관련 없는 종양 세포들 (각각 Daudi 및 K562 세포들)에 대한 PD-L1을 발현시키는 조작된 CAR T 세포의 특이적 세포 세포용해 활성. A 및 B는 다른 혈액 기증자들을 가리킨다.

도 14: 배양 배지에서 CAR T 세포들에 의한 CTLA4a Ig 및 CTLA4b Ig 분비의 ELISA 검출. A. 배양 배지에서 CTLA4 Ig의 양의 정량화를 하는데 사용되는 표준 곡선. B. CTLA4a Ig 또는 CTLA4b Ig을 코드하는 mRNA 10 또는 20 µg으로 형질주입된 조작된 CAR T 세포들의 배양 배지 상청액에서 CTLA4 a 및 b Ig의 검출.

도 15: 관련된 또는 관련되지 않은 종양 세포들 (각각 Daudi 및 K562 세포들)에 대한 CTLA4a Ig를 발현시키는 조작된 CAR T 세포의 특지이적 세포 세포용해 활성.

도 16: T 세포들에서 β2-m 발현의 FACS 분석. 형질주입되지 않은 (윗쪽) 및 형질주입된 T 세포들 (중간 및 아래쪽)이 생존능력 (윗쪽) 및 β2-m 발현 (오른쪽)에 대하여 FACS에 의하여 분석된다.

도 17: MOI 5에서 PD-L1 및 CTLA4Ig LV로 공동 형질도입된 또는 대조군 LV (PD-L1), CTLA4Ig LV 단독으로 형질

도입된 조작된 CAR T 세포들의 배양 배지 상청액에서 CTLA4Ig의 검출. 14일 배양 된 상청액들이 1/1000e 희석 (벳금친 막대) 또는 1/5000e 희석 (어두운 막대)에서 ELISA에 의하여 테스트된다. 희색 막대는 희석 둘 다로부터의 평균 적정(titer)를 나타낸다.

도 18: 기증자 1으로부터의 CFSE 음성 T 세포들의 정량화 (희색 막대들), 표시된 자극들에 대한 반응에서 CD3+ T 세포들 (검은 막대들) 및 T 세포들 생존능력들 (벳금친 막대들)의 정량화에 대한 혼합된 램프구들 반응. D1 및 D2는 각각 기증자 1 및 기증자 2에 대응한다. 왼쪽부터 오른쪽으로: (a) 어떠한 치료가 없는 기증자 1으로부터의 PBMC들이 단독으로 배양되었다; (b) PHA (피토헤마글루티닌 -10 µg/ml, a T 세포 미토겐)의 증가되는 농도로 치료되어 온 기증자 1으로부터의 PBMC들이 단독으로 배양된다; (c) 기증자 1으로부터의 PBMC들이 기증자 2로부터의 형질도입되지 않은 T 세포들과 공동-배양된다; (d) 기증자 1으로부터의 PBMC들이 기증자 2로부터의 PD-L1 형질도입된 T 세포들과 공동-배양된다; (e) 기증자 1으로부터의 PBMC들이 기증자 2로부터의 CTLA4Ig 형질도입된 T 세포들과 공동-배양된다; (f) 기증자 1으로부터의 PBMC들이 기증자 2로부터의 PD-L1 및 CTLA4Ig 공동-형질도입된 T 세포들과 공동-배양된다.

도 19: (그래프로 나타난 대로) 다르게 조작된 CAR T 세포들이 특정 타겟 세포들 (MOLM-13; CD123 항원을 발현시킴) 및 대조군 음성 세포들 (Daudi)과 4 시간 동안 10:1의 E:T 비율으로 배양되는 세포독성 분석. 타겟 세포 사망은 유동세포 분석법에 의하여 측정되고 비-특이적 죽이기 (Daudi)에 대하여 정규화된다.

도 20. (그래프로 나타낸 대로) 다르게 조작된 CAR T 세포들이 특정 타겟 세포들 (MOLM-13) 및 대조군 음성 세포들 (Daudi)과 4 시간 동안 10:1 (벳금친 막대), 5:1 (어두운 막대들) 및 1:1 (희색 막대들)의 E:T 비율에서 배양되는 세포독성 분석. 타겟 세포 사망은 유동세포 분석법에 의하여 측정되고 비-특이적 죽이기 (Daudi)에 대하여 정규화된다.

도 21. 생체 내 실험을 위한 개략적 도식. NOG 마우스들이 조작된 CAR T 세포들 주입 7일 전 MOLM-13 (luc/GFP) 종양 세포주로 처음 주사된다. 종양 진행은 생물발광 (Biolum.) 분석 및 전반적인 생존을 거쳐 모니터링된다.

도 22. 조작된 T 세포들은 유동세포 분석법에 의하여 CAR CD123 및 PD-L1 세포 표면 발현에 대하여 모니터링된다.

도 23. NOG 마우스들에서 종양들을 보여주는 D-1부터 D14까지의 생물발광 이미지. 사진들에서 어두운 점들은 종양들을 나타낸다. 마우스들 내로 주사된 T 세포들의 다른 그룹들은 하기와 같이 나타내어진다. 도 23A에서 : 형질주입되지 않은 T 세포들 (CAR T 세포들 없음) 또는 항-CD123 CAR에 의하여 형질주입된 T 세포들 (CAR T CD123). 도 23B에서 : 항-CD123 CAR에 의하여 형질주입되고 CTLA4Ig로 형질도입된 T 세포들 (CAR T CD123/CTLA4Ig); 항-CD123 CAR에 의하여 형질주입되고 PD-L1으로 형질도입된 T 세포들 (CAR T CD123/PDL1); 항-CD123 CAR에 의하여 형질주입되고 CTLA4Ig 으로 그리고 PD-L1으로 형질도입된 T 세포들 (CAR T CD123/PDL1/CTLA4Ig).

도 24: 하기 요소들과 다른 단일 체인 키메라 항원 수용체 CAR 아키텍처들 (V1 내지 V6)의 도식적 표시 : 항원 특이적 VH 및 VL 체인들, 헌지, 막판통 도메인 (TM), 공-자극 도메인 (4-1BB) 및, 선택적으로 링커(들)을 갖는, 신호전달(signaling) 전달(transduction) 도메인 (CD3제타).

표 1:  $\beta$  2m TALE-뉴클레아제들 서열들의 설명.

표 2: 2 개의 다른 PDC1 유전자 타겟들에 대하여 그리고 TALEN들의 2 쌍들의 폴리뉴클레오타이드 서열이 제시된다.

표 3: CLTA-4a, CTLA-4b 및 PD-L1을 발현시키는 플라스미드 구조체들의 폴리뉴클레오타이드 서열들.

표 4: 다양한 바이러스로부터의 ISU 도메인 변종들의 폴리펩타이드 서열들.

표 5: NKG2D 리간드들의 패널 및 바이러스 MHC 상동체 (UL18)의 폴리펩타이드 서열들.

표 6: 자연적인 그리고 인공적인 기원들로부터의 FP 폴리펩타이드의 아미노산 서열들.

표 7: 인간 대응하는 유전자들에서 TALE-뉴클레아제들 타겟 부위들의 서열들 및 TRAC 및 TRBC TALE-뉴클레아제들의 기재.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018]

### 본 발명의 개요

[0019]

본 발명은 T 세포들과 같은 면역 세포를 조작하여 그것들을 그것들의 지속을 증가시킴으로써 및/또는 숙주 생물에서 그것드르의 이식을 쉽게 함으로써 면역요법 목적들에 적합하게 그것들을 만들고, 이로써 이식편대(graft versus) 숙주(host) 질병(disease) (GvHD)의 위협이 감소되는 방법들을 개시한다. 더욱 특히, 본 발명은 자가 또는 비-자가 항원 인식에 관여되는 폴리펩타이드를 코드하는 적어도 하나의 내생의 유전자가 하나의 면역 세포들에서 불활성화되고, 뒤이어 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드과 상기 조작된 면역 세포들의 접촉이 이어지는 방법에 대한 것이다.

[0020]

한 측면에서, 불활성화는 TCR 및/또는 베타(beta)2M 유전자 상에서, 바람직하게는 TALE-뉴클레아제와 같은, 특정 히귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 수행된다.

[0021]

추가의 측면에서, 숙주-대-이식(host-versus-graft) (HvG)- 즉 그것들 동종이계 이동된 면역 세포들을 공격하는 숙주 면역 세포들-에 의하여 입양으로 이동된 동종이계 면역 세포들의 소모(depletion)를 방지하기 위하여, 접촉 단계는 면역 세포 스스로에 의하여 불활성인 PD1 및/또는 CTLA-4 리간드의 발현에 의하여 현실화된다. 본 발명에 따른 다른 대체들이 바이러스 MHC 상동체, NKG2D 리간드, 및/또는 바이러스 외피(env) 면역(immune) 억제(suppressive) 도메인 (ISU) 또는 the 바이러스 FP 단백질의 발현과 함께 제공한다.

[0022]

또한 여전히 본 발명의 범위 내에, 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드와 함께 조작된 면역 세포들의 배양은 면역억제 폴리펩타이드들의 발현 대신 사용될 수 있다. CD80/CD86 항체들이 상기 배양에 사용되는 면역 억제 폴리펩타이드로서 선호된다.

[0023]

면역요법에 관련된 변형된 면역 세포들은 특이적 세포 인식을 위한 키메라 항원 수용체들 (CAR)를 코드하는 외인성 재조합 폴리뉴클레오타이드들을 더 포함할 수 있다. 이 명세서에 기재된 임의의 단백질들, 폴리펩타이드들 또는 벡터들을 포함하는, 그 분리된 세포들 또는 세포주들은 치료적 제품들로서, 이상적으로는 연장된 수명 및 감소된 이식편대 숙주 질병 (GvHD)을 가진 "기성품인" 제품들로서, 사용을 위하여 바쳐진다.

[0024]

조작된 면역 세포들은 것을 투여함으로써 환자에게서 암 또는 감염을 치료 또는 예방하는 방법들이 또한 기재된다.

[0025]

### 본 발명의 자세한 기재

[0026]

여기에서 특이적으로 정의되지 않는 한, 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 유전자 치료, 생명화학, 유전학 및 분자생물학의 영역에서 당업자에 의하여 보통 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0027]

여기에 기재된 것들과 유사하거나 또는 동등한 모든 방법들 및 물질들은, 여기에 기재된 적합한 물질들 및 방법들과 함께 본 발명의 시험 또는 실시에 사용될 수 있다. 모든 문헌들, 특히 출원들, 특히들 및 여기에 언급된 다른 참고문헌들이 그 전체가 참고로서 포함된다. 모순되는 경우, 정의들을 포함하는 본 명세서가 우선될 것이다. 나아가 물질들, 방법들, 및 예들은 설명만을 위한 것이며, 다르게 특정하지 않는 한, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0028]

본 발명의 실시는, 다르게 표시하지 않는 한, 기술 내인 세포 생물학, 세포 배양, 분자 생물학, 유전자이식(transgenic) 생물학, 미생물학, 재조합 DNA, 및 면역학의 현재 기술들을 이용할 것이다. 이러한 기술들은 문헌에서 완전히 설명된다. 예컨대, 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 et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 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, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., New York), specifically, Vols.154 and 155 (Wu et al. eds.) and Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); and Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986) 참조.

- [0029] 일반적인 측면에서, 본 발명은 암 및 감염들을 치료하는 새로운 입양 면역요법 전략들을 위한 방법들에 대한 것이다.
- [0030] 본 발명은 하기 주된 예들에 대한 것이다:
- [0031] 1) 하기를 포함하는 동종이계 면역 세포들의 지속 및/또는 이식(engraftment)을 증가시키기 위한 방법:
  - [0032] a) 동종이계 세포들을 제공하는 단계;
  - [0033] b) 자가 및 비-자가(non-self) 항원 인식에 수반되는 폴리펩타이드를 코드하는 적어도 하나의 내생의 유전자를 불활성화시킴으로써 상기 세포들을 변형시키는 단계;
- [0034] 및;
- [0035] c) 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드와 상기 면역 세포들을 접촉시키는 단계.
- [0036] 2) 예 1에 있어서, 상기 면역 세포들은 조혈 세포들인 방법.
- [0037] 3) 예 1 또는 예 2에 있어서, 상기 면역 세포들은 일차 세포들인 방법.
- [0038] 4) 예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)에서의 접촉 또는 상기 발현은 T 조절 세포들을 특이적으로 억제하지 않는 방법.
- [0039] 5) 예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)에서의 접촉 또는 상기 발현은 CD8+ T 세포들을 특이적으로 억제하지 않는 방법.
- [0040] 6) 예 1 내지 예 5 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드의 분비를 향하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0041] 7) 예 1 내지 예 6 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 PD-1을 코드하는 유전자의 발현의 불활성화를 추가적으로 포함하는 방법.
- [0042] 8) 예 7에 있어서, PD-1 유전자의 불활성화는 서열번호 11-12 및 13-14의 TALE-뉴클레아제들을 코드하는 폴리뉴클레오타이드의 이용에 의하여 수행되는 방법.
- [0043] 9) 예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)에서의 상기 폴리펩타이드는 TCR, 클래스 I 요소의 MHC 클래스, b-2 마이크로글로불린(microglobulin) (B2M), TAP1 및 큰(large) 다중기능적(multifunctional) 프로테아제(protease) 2 중에서 선택되는 방법.
- [0044] 10) 예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)에서 상기 폴리펩타이드는 PDL-1, CTLA-4, 바이러스 MHC 상동체, NKG2D 리간드, 바이러스 외피(env) 면역 억제 도메인 (ISU) 또는 바이러스 FP 단백질 중에서 선택되는 방법.
- [0045] 11) 예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 B2M의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에서 불활성인 PDL-1 리간드의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0046] 12) 예 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)의 추가적인 변형은 상기 동종이계 면역 세포들에서 CTLA-4 면역글로불린들의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0047] 13) 예 12에 있어서, 발현되는 CTLA-4 면역글로불린들을 코드하는 핵산 분자는 서열번호: 16-17과 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.
- [0048] 14) 예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 TCR의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에 의한 불활성인 PDL-1 리간드의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0049] 15) 예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 바이러스 FP 단백질 또는 FeLV, MLV, HERV로부터 선택되는 바이러스 외피(env) 면역 억제 도메인 (ISU)을 발현시킴으로써 수행되는 방법.
- [0050] 16) 예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 B2M의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에 의한 바이러스 외피(env) 면역 억제 도메인 (ISU)의 발현에 의하여 수행되는 방법.

- [0051] 17) 예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 TCR의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이  
계 면역 세포들에 의한 바이러스 외피(env) 면역 억제 도메인 (ISU)의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0052] 18) 예 16 또는 17에 있어서, 발현되는 바이러스 외피(env) 면역 억제 도메인 (ISU)를 코드하는 핵산 분자는 서  
열번호: 19-38와 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.
- [0053] 19) 예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 B2M의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이  
계 면역 세포들에 의한 바이러스 FP 단백질의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0054] 20) 예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 TCR의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이  
계 면역 세포들에 의한 바이러스 FP 단백질의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0055] 21) 예 19 또는 20에 있어서, 발현되는 바이러스 FP 단백질을 코드하는 핵산 분자는 서열번호: 48-50과 적어도  
80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.
- [0056] 22) 예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 B2M의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 동종이계 면  
역 세포들에 의한 NKG2G 리간드의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0057] 23) 예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 TCR의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이  
계 면역 세포들에서 NKG2G 리간드의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0058] 24) 예 22 또는 23에 있어서, 발현되는 NKG2G 리간드를 코드하는 핵산 분자는 서열번호: 40-47과 적어도 80%,  
바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.
- [0059] 25) 예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 단계 b) ii)에서 바이러스 MHC 상동체는 UL18인 방법.
- [0060] 26) 예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 B2M의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이  
계 면역 세포들에 의한 바이러스 MHC 상동체 UL18 단백질의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0061] 27) 예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 TCR의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이  
계 면역 세포들에 의한 바이러스 MHC 상동체 UL18 단백질의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0062] 28) 예 26 또는 27에 있어서, 발현되는 바이러스 MHC 상동체 UL18을 코드하는 핵산 분자는 서열번호: 39와 적어  
도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.
- [0063] 29) 예 1 내지 5 또는 예들 8-9 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩  
타이드에서 상기 면역(immune)의 배양에 의하여 수행되는 방법.
- [0064] 30) 예 29에 있어서, 상기 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 항-CD80 또는 항-CD86 mAbs인 방법.
- [0065] 31) 예 1 또는 30에 있어서, 단계 b)에서 유전자 불활성화는 TAL-뉴클레아제, 메가뉴클레아제(meganuclease, 징  
크(zing)-핑거(finger) 뉴클레아제 (ZFN), 또는 RNA 가이드된 엔도뉴클레아제의 이용에 의하여 수행되는 방법.
- [0066] 32) 예 1 또는 31에 있어서, 단계 b)에서의 유전자 불활성화는 TAL-뉴클레아제를 이용하여 수행되는 방법.
- [0067] 33) 예 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)에서의 유전자 불활성화는 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제들을  
이용함으로써 수행되는 방법.
- [0068] 34) 예 33에 있어서, RNA-가이드된 엔도뉴클레아제는 Cas9인 방법.
- [0069] 35) 예 1-10, 11-15, 17-18, 20-21, 23-25 또는 27-34 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)에서의 유전자 불활성화  
는 TCR을 코드하는 유전자의 발현을 억제하는 핵산 분자를 이용함으로써 수행되는 방법.
- [0070] 36) 예 32에 있어서, TCR 유전자의 불활성화는 서열번호 52-53, 55-56, 62-63 및 65-66의 TALE-뉴클레아제들을  
이용함으로써 수행되는 방법.
- [0071] 37) 예들 1-12, 13-16, 18-19, 21-22, 24-26 또는 28-34 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)에서의 불활성화 유전  
자는 B2M을 코드하는 유전자의 발현을 억제하는 핵산 분자를 이용함으로써 수행되는 방법.
- [0072] 38) 예 32에 있어서, B2M 유전자의 불활성화는 서열번호 2-3, 5-6 및 8-9의 TALE-뉴클레아제들을 이용함으로써  
수행되는 방법.
- [0073] 39) 예 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서,

- [0074] d) 악성 또는 감염된 세포의 표면에서 발현되는 적어도 하나의 항원에 대항하여 항해지는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코드하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 외인성 핵산 분자를 상기 T-세포 내로 도입시키는 단계
- [0075] 를 더 포함하는 방법.
- [0076] 40) 예 39에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 서열번호 67 (CD19 항원), 서열번호 68 (CD38 항원), 서열번호 69 (CD123 항원), 서열번호 70 (CS1 항원), 서열번호 71 (BCMA 항원), 서열번호 72 (FLT-3 항원), 서열번호 73 (CD33 항원), 서열번호 74 (CD70 항원), 서열번호 75 (EGFR-3v 항원) 및 서열번호 76 (WT1 항원)과 80% 넘는 동일성, 바람직하게는 90% 넘는, 그리고 더욱 바람직하게는 95% 넘는 항원 타겟 서열을 갖는 scFv (VH 및 VL 체인들)을 포함하는 방법.
- [0077] 41) 예 1 내지 40 중 어느 하나에 있어서,
- [0078] d) 그 결과인 조작된 T-세포를 확장시키는 단계
- [0079] 의 단계를 더 포함하는 방법.
- [0080] 42) 예 1 내지 41 중 어느 하나에 따른 방법을 이용함으로써 수득가능한, 조작된, 바람직하게는 분리된, T-세포.
- [0081] 43) 의약으로서 사용을 위한 예 42의 조작된 T-세포.
- [0082] 44) 암 또는 바이러스 감염의 치료에의 사용을 위한 예 42 또는 예 43의 조작된 T-세포.
- [0083] 45) 예 42 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 림프종의 치료에의 사용을 위한 조작된 T-세포.
- [0084] 46) 예 42 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 상기 T-세포는 치료되는 환자로부터 유래되는 조작된 T-세포.
- [0085] 47) 예 42 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 상기 T-세포는 기증자로부터 유래되는 조작된 T-세포.
- [0086] 48) 예 42 내지 47 중 어느 하나에 따른 적어도 하나의 조작된 T-세포를 포함하는 조성물.
- [0087] 본 발명은 더욱 특히 하기 예들에 대한 것이다:
- [0088] 1) 하기를 포함하는 숙주 면역 세포들의 존재 하 동종이계 면역 세포들의 지속 및/또는 이식을 증가시키기 위한 방법:
- [0089] a) 동종이계 세포들을 제공하는 단계;
- [0090] b) 자가 및 비-자가 항원 인식에 대항하는 반응에 수반되는 폴리펩타이드를 코드하는 적어도 하나의 내생의 유전자를 불활성화시킴으로써 상기 세포들을 변형시키는 단계;
- [0091] 및;
- [0092] c) 상기 숙주 면역 세포들을 그것들이 동종이계 면역 세포들과 상호작용하는 것을 방지하는 효과를 갖는 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계.
- [0093] 2) 예 1에 있어서, 단계 b)의 상기 폴리펩타이드는 TCR, 클래스 I 요소의 MHC 클래스, b-2 마이크로글로불린 (B2M), TAP1 및 큰 다중기능적 프로테아제 2로부터 선택되는 방법.
- [0094] 3) 예 1 또는 2에 있어서, 단계 c)의 상기 면역억제 폴리펩타이드는 막-결합된 형태 및/또는 분비된 형태로 존재하는 방법.
- [0095] 4) 예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 상기 면역 세포들의 막 표면에 결합된 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드를 코드하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0096] 5) 예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역 세포들의 막 표면에 결합된 상기 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 PD-L1 리간드인 방법.
- [0097] 6) 예 5에 있어서, 발현되는 막-결합된 형태의 PD-L1 리간드를 코드하는 핵산 분자는 서열번호:18과 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.
- [0098] 7) 예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역억제 폴리펩타이드는 분비된 형태로 존재하는 방법.

- [0099] 8) 예 1 내지 3 또는 예 7 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 상기 면역 세포들에서 분비되는 형태인 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드를 코드하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0100] 9) 예 8에 있어서, 발현되는 CTLA-4 면역글로불린들을 코드하는 핵산 분자는 서열번호: 16-17과 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.
- [0101] 10) 예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드 PD-L1 리간드 및 CTLA-4 면역글로불린들 둘 다와 상기 숙주 면역 세포들을 접촉시킴으로써 수행되는 방법.
- [0102] 11) 예 10에 있어서, 단계 c)는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드 PD-L1 리간드 및 CTLA-4 면역글로불린들 둘 다의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0103] 12) 예 11에 있어서, 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드의 상기 분비는 분비되는 형태인 PD-L1 리간드인 방법.
- [0104] 13) 예 9 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 상기 동종이계 면역 세포들에서 발현되는 CTLA-4 면역글로불린들 및 막-결합된 형태인 PD-L1 리간드를 코드하는 핵산 분자들은 서열번호: 18 및 서열번호: 16-17과 각각 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.
- [0105] 14) 예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역 세포들은 일차 세포들인 방법.
- [0106] 15) 예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)에서의 접촉 또는 상기 발현은 T 조절 세포들을 특이적으로 억제하지 않는 방법.
- [0107] 16) 예 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)에서의 접촉 또는 상기 발현은 숙주 CD8+ T 세포들을 특이적으로 억제하지 않는 방법.
- [0108] 17) 예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 PD-1 유전자의 발현의 불활성화를 추가적으로 포함하는 방법.
- [0109] 18) 예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 막-결합된 형태인 PD-L1 리간드를 코드하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되고 상기 동종이계 세포들의 추가의 변형은 PD-1 유전자의 발현의 불활성화에 의하여 수행되는 방법.
- [0110] 19) 예 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 CTLA4 Ig의 분비를 향하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되고 상기 동종이계 세포들의 추가의 변형은 PD-1 유전자의 발현의 불활성화에 의하여 수행되는 방법.
- [0111] 20) 예 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드 PD-L1 리간드 and CTLA-4 면역글로불린들 둘 다의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되고 상기 동종이계 면역 세포들의 추가의 변형은 PD-1 유전자의 발현의 불활성화에 의하여 수행되는 방법.
- [0112] 21) 예 20에 있어서, PD-1 유전자의 불활성화는 서열번호 11-12 및 13-14의 TALE-뉴클레아제들을 코드하는 폴리뉴클레오타이드를 이용함으로써 수행되는 방법.
- [0113] 22) 예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)에서의 상기 폴리펩타이드는 PD-L1, CTLA-4, 바이러스 MHC 상동체, NKG2D 리간드, 바이러스 외피(env) 면역 억제 도메인 (ISU) 또는 바이러스 FP 단백질 중 선택되는 방법.
- [0114] 23) 예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 B2M의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에서 PD-L1 리간드의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0115] 24) 예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 TCR의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에 의한 PD-L1 리간드의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0116] 25) 예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 바이러스 FP 단백질 또는 FeLV, MLV, HERV로부터 선택되는 바이러스 외피(env) 면역 억제 도메인 (ISU)을 발현시킴으로써 수행되는 방법.
- [0117] 26) 예 1 내지 4 또는 예 25 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 B2M의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에 의한 바이러스 외피(env) 면역 억제 도메인 (ISU)의 발현에 의하여 수행되는 방법.

- [0118] 27) 예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 TCR의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에 의한 바이러스 외피(env) 면역 억제 도메인 (ISU)의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0119] 28) 예 26 또는 27에 있어서, 발현되는 바이러스 외피(env) 면역 억제 도메인 (ISU)을 코드하는 핵산 분자는 서열번호: 19-38과 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.
- [0120] 29) 예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 B2M의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에 의한 바이러스 FP 단백질의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0121] 30) 예 1 내지 4 또는 예 29 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 TCR의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에 의한 바이러스 FP 단백질의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0122] 31) 예 29 또는 30에 있어서, 발현되는 바이러스 FP 단백질을 코드하는 핵산 분자는 서열번호: 48-50과 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.
- [0123] 32) 예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 B2M의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 종이계 면역 세포들에 의한 NKG2G 리간드의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0124] 33) 예 1 내지 4 또는 예 32 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 TCR의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에 의한 NKG2G 리간드의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0125] 34) 예 32 또는 33에 있어서, 발현되는 NKG2G 리간드를 코드하는 핵산 분자는 서열번호: 40-47과 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.
- [0126] 35) 예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 단계 b) ii)의 바이러스 MHC 상동체는 UL18인 방법.
- [0127] 36) 예 1 내지 4 또는 예 35 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 B2M의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에 의한 바이러스 MHC 상동체 UL18 단백질의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0128] 37) 예 1 내지 4 또는 예 36 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)는 TCR의 불활성화에 의하여 수행되고 단계 c)는 상기 동종이계 면역 세포들에 의한 바이러스 MHC 상동체 UL18 단백질의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0129] 38) 예 36 또는 37에 있어서, 발현되는 바이러스 MHC 상동체 UL18을 코드하는 핵산 분자는 서열번호: 39와 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 방법.
- [0130] 39) 예 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드에서 상기 면역(immune)의 배양에 의하여 수행되는 방법.
- [0131] 40) 예 39에 있어서, 상기 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 항-CD80 또는 항-CD86 mAbs인 방법.
- [0132] 41) 예 1 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)에서의 유전자 불활성화는 TAL-뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 징크-핑거 뉴클레아제 (ZFN), 또는 RNA 가이드된 엔도뉴클레아제를 이용함으로써 수행되는 방법.
- [0133] 42) 예 41에 있어서, 단계 b)에서의 유전자 불활성화는 TAL-뉴클레아제를 이용함으로써 수행되는 방법.
- [0134] 43) 예 41에 있어서, 단계 b)에서의 유전자 불활성화는 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제들을 이용함으로써 수행되는 방법.
- [0135] 44) 예 43에 있어서, RNA-가이드된 엔도뉴클레아제는 Cas9인 방법.
- [0136] 45) 예들 1-18, 20-22, 24-25, 27-28, 30-32 또는 34-41에 있어서, 단계 b)에서의 유전자 불활성화는 TCR을 코드하는 유전자의 발현을 억제하는 핵산 분자를 이용함으로써 수행되는 방법.
- [0137] 46) 예 45에 있어서, TCR 유전자의 불활성화는 서열번호 52-53, 55-56, 62-63 및 65-66의 TALE-뉴클레아제들을 이용함으로써 수행되는 방법.
- [0138] 47) 예들 1-17, 20-2, 25-26, 28-29, 31-33 또는 35-41에 있어서, 단계 b)의 불활성화 유전자는 B2M을 코드하는 유전자의 발현을 억제하는 핵산 분자를 이용함으로써 수행되는 방법.
- [0139] 48) 예 47에 있어서, B2M 유전자의 불활성화는 서열번호 2-3, 5-6 및 8-9의 TALE-뉴클레아제들을 이용함으로써 수행되는 방법.
- [0140] 49) 예 1 내지 48 중 어느 하나에 있어서,

- [0141] d) 악성 또는 감염된 세포의 표면에서 발현되는 적어도 하나의 항원에 대항하여 항해지는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코드하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 외인성 핵산 분자를 상기 T-세포 내로 도입시키는 단계
- [0142] 의 단계를 더 포함하는 방법.
- [0143] 50) 예 49에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 서열번호 67 (CD19 항원), 서열번호 68 (CD38 항원), 서열번호 69 (CD123 항원), 서열번호 70 (CS1 항원), 서열번호 71 (BCMA 항원), 서열번호 72 (FLT-3 항원), 서열번호 73 (CD33 항원), 서열번호 74 (CD70 항원), 서열번호 75 (EGFR-3v 항원) 및 서열번호 76 (WT1 항원)와 80% 넘는 동일성, 바람직하게는 90% 넘는, 그리고 더욱 바람직하게는 95% 넘는 항원 타겟 서열을 갖는 scFv (VH 및 VL 체인들)을 포함하는 방법.
- [0144] 51) 예 1 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 CTLA-4 면역글로불린들 및/또는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드 PD-L1 리간드의 상기 동종이계 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되고, 상기 동종이계 면역 세포들은 항-CD123 키메라 항원 수용체의 발현에 의하여 더 변형되는 방법.
- [0145] 52) 예 51에 있어서, 상기 동종이계 면역 세포들의 추가의 변형은 PD-1 유전자의 발현의 불활성화에 의하여 수행되는 방법.
- [0146] 53) 예 1 내지 52 중 어느 하나에 있어서,
- [0147] d) 그 결과인 조작된 T-세포를 확장시키는 단계
- [0148] 의 단계를 더 포함하는 방법.
- [0149] 54) 예 1 내지 53 중 어느 하나의 방법을 이용함으로써 수득가능한, 조작된, 바람직하게는 분리된, T-세포,
- [0150] 55) 의약으로서 사용을 위한 예 54의 조작된 T-세포.
- [0151] 56) 암 또는 바이러스 감염의 치료에의 사용을 위한 예 54 또는 예 55의 조작된 T-세포.
- [0152] 57) 림프종 또는 백혈병의 치료에의 사용을 위한 예 54 내지 56 중 어느 하나의 조작된 T-세포.
- [0153] 58) 예 54 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 상기 T-세포는 치료되는 환자로부터 유래되는 조작된 T-세포.
- [0154] 59) 예 54 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 상기 T-세포는 기증자로부터 유래되는 조작된 T-세포.
- [0155] 60) 예 54 내지 59 중 어느 하나에 따른 적어도 하나의 조작된 T-세포를 포함하는 조성물.
- [0156] 본 발명의 상기 측면들에 대한 더 자세한 내용들은 하기 기재에서 제공된다.
- [0157] 면역요법을 위한 비(non) 동종반응성이고 매우 지속성인 T 세포들
- [0158] 본 발명의 첫 번째 측면에 따라, 본 발명자들은 몇몇 유전자들이, 그것들이 동종이계 면역 세포들에서 발현될 때, 더 좋은 약효를 위한 숙주 생물에서 그것들의 지속성을 증가시키게 할 수 있다는 것을 보였다.
- [0159] 본 발명은 :
- [0160] i) 동종이계 세포들을 제공하는 단계;
- [0161] ii) 자가 및 비-자가 항원 인식에 대항하는 반응에 수반되는 폴리펩타이드를 코드하는 적어도 하나의 내생의 유전자를 불활성화시킴으로써 상기 세포들을 변형시키는 단계;
- [0162] 및;
- [0163] iii) 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드와 상기 숙주 면역 세포들을 접촉시키는 단계
- [0164] 를 포함하는, 바람직하게는 숙주 면역 세포들의 존재 하, 동종이계 면역 세포들의 이식 및/또는 지속성을 증가시키는 방법에 대한 것이다.
- [0165] 상기 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 숙주 면역 세포들이 동종이계 면역 세포들과의 상호작용을 하는 것을 방지하는 효과를 가질 것으로 예상된다.
- [0166] "지속"은 거부에 저항하거나 생체 내에서 시간이 경과함 (예컨대, 일, 주, 달, 년)에 따라 수가 유지 및/또는 증가하는 세포들의 능력을 가리킨다. 일반적으로, 본 발명의 조작된 면역 세포들은 상기 환자 내로 주입 적어도 10 일, 바람직하게는 적어도 20 일, 더욱 바람직하게는 적어도 25 일 그리고 더욱 더 바람직하게는 적어도 30

일 후에 환자의 혈액에서 발견될 수 있다.

[0167] "이식(engraftment)"는 생체 내에서 세포 접촉 및 관심있는 기존의 부위 내로 및 편입의 과정을 가리킨다.

[0168] "증가되는 지속성 및/또는 이식"에 의하여, 환자에게 비-조작된 것(즉 비 지속성)이 투여되는 경우에 비하여, 지속성을 주도록 조작된 동종이계 면역 세포들의 수가 치료의 과정 중 더 높게 남아 있는 것이 의미된다. 환자에게 주사되는 동종이계 면역 세포들에서 이러한 개선된 지속성 및/또는 이식 (예컨대 T 세포들)은 상기 면역 세포들에 대한 숙주 면역 체계의 무반응을 기재하는 면역학적 내성 (또는 "관용(tolerisation)")의 부분인 반면, 상기 면역 세포들은 면역 반응을 끌어내는 능력을 보유한다.

[0169] 자가 및 비-자가 항원 인식에 수반되는 유전자의 불활성화

[0170] "자가 및 비-자가 항원 인식"에 의하여 세포 면역 체계에 의하여 수행되는 스크리닝이 의도되고, 이로써, 펩타이드들이 세포를 외래 생물들에 의하여 감염되는 경우 평가하기 위한 주요(Major) 조직적합성 (Histocompatibility) 복합체(Complex) (MHC) 분자들에 의하여 제시된다. 이 스크리닝은 예컨대 TCR, 또는 TAP1/TAP2 또는 프로테아제 2와 같은 다른 막관통 구조체들을 수반한다.

[0171] 유전자를 불활성화시킴으로써 관심있는 유전자가 기능적 단백질 형태로 발현되지 않는 것이 의도된다. 특정 예에서, 방법의 유전적 변형은, 조작하기 위하여 제공된 세포들에서, 하나의 희귀-절단 엔도뉴클레아제의 발현에 의존하여, 상기 희귀-절단 엔도뉴클레아제는 하나의 타겟인 유전자에서 절단을 특이적으로 촉매화하여, 이로써 상기 타겟인 유전자를 불활성화시킨다. 희귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 야기되는 핵산 가닥 손상(breaks)들은 상동 재조합 또는 비상동(non-homologous) 말단(end) 결합(joining) (NHEJ)의 구별되는 메커니즘들을 통하여 보통 수선된다. 그러나 NHEJ은 절단 부위에서 DNA 서열의 변화들을 가끔 야기하는 불완벽한 수선 공정이다. 메커니즘들은 직접적인 재(re)-라이게이션(ligation)을 통한 (Critchlow and Jackson 1998) 또는 소위 마이크로상동-매개된 말단 결합을 통한 (Ma, Kim et al. 2003) 두 DNA 말단들의 남아있는 것들의 재연결(rejoining)을 수반한다. 비상동(non-homologous) 말단(end) 결합(joining) (NHEJ)을 통한 수선은 작은 삼입들 또는 결실들을 자주 야기하며, 특이적 유전자 네아웃들(knockouts)을 만드는데 사용될 수 있다. 상기 변형은 적어도 하나의 뉴클레오파이드의 치환, 결실 또는 첨가일 수 있다. 절단-유도된 돌연변이유발 이벤트 - 즉 NHEJ 이벤트에 연이은 돌연변이유발-이 발생하는 세포들은 업계에서 잘 알려진 방법에 의하여 확인 및/또는 선택될 수 있다.

[0172] 엔도뉴클레오파이드(endonucleolytic) 손상들은 상동 재조합의 속도(rate)를 자극하는 것으로 알려져 있다. 이런 식으로, 또 다른 예에서, 방법의 유전적 변형 단계는 적어도 타겟 핵산 서열의 부분에 상동인 서열을 포함하는 외인성 핵산의 세포들 내로의 도입 단계를 더 포함하여, 상동 재조합은 타겟 핵산 서열 및 외인성 핵산 사이에서 발생한다. 특정 예들에서, 상기 외인성 핵산은 각각 타겟 핵산 서열의 5' 및 3' 영역에 상동인 첫 번째 및 두 번째 부분들을 포함한다. 이들 예들에서 상기 외인성 핵산은 또한 타겟 핵산 서열의 5' 및 3' 영역들과 상동성(homology)을 포함하지 않는 첫 번째 및 두 번째 부분 사이에 위치하는 세 번째 부분을 포함한다. 타겟 핵산 서열의 절단 후, 상동 재조합 이벤트는 타겟 핵산 서열 및 외인성 핵산 사이에서 자극된다. 바람직하게는 적어도 50 bp의, 바람직하게는 100 bp보다 많은, 그리고 더욱 바람직하게는 200 bp보다 많은 상동 서열들이 상기 기증자 매트릭스 내에서 사용된다. 그러므로, 외인성 핵산은 바람직하게는 200 bp부터 6000 bp까지, 더욱 바람직하게는 1000 bp부터 2000 bp까지이다. 과연, 공유되는 핵산 상동성들은 손상 부위의 측면에 위치하는 업스트림 및 다운스트림 영역들에 위치되고, 도입되는 핵산 서열은 두 개의 팔들(arms) 사이에 위치되어야 한다.

[0173] 선호되는 예에 따라, 유전자 불활성화는 바람직하게는 Argonaute 또는 Cas9, Cpf1와 같은 RNA/DNA 가이드된 엔도뉴클레아제, 또는 TAL-뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 징크-핑거 뉴클레아제 (ZFN)를 이용함으로써 수행된다.

[0174]

[0175] 더 선호되는 예에 따라, 자가 및 비-자가 항원 인식에 수반되는 상기 유전자의 불활성화는 TALE-뉴클레아제들을 이용하여 수행된다. 이것은 특정 TALE-뉴클레아제에 의하여 타겟되는 정확한 게놈 위치에서 달성되며, 이때 상기 특정 TALE-뉴클레아제는 절단을 촉매화하고 이때 상기 외인성 핵산은 상기 언급된 군으로부터 선택되는 하나의 타겟인 유전자를 불활성화시키기 위한 서열 및 적어도 상동성의 영역을 연속적으로 포함한다. 몇몇 유전자들은, 각각 몇개의 TALE-뉴클레아제들을 이용하여 그리고 몇몇 특이적인 하나의 정의된 유전자를 특이적으로 타겟팅함으로써 연속적으로 또는 동시에 불활성화될 수 있다. TALE-뉴클레아제에 의하여 핵산 target 서열을 절단하기 위한 하나의 뉴클레아제 촉매적 도메인 및 전사(Transcription) 활성인자(Activator) 유사(Like) 효과기 (Effector) (TALE)로부터 유래하는 DNA-결합 도메인으로 구성되는 융합 단백질이 의도된다. (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; Morbitzer, Romer et al. 2011; Mussolini, Morbitzer 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).

[0176] 또다른 선호되는 예에 따라, 자가 및 비-자가 항원 인식에 수반되는 상기 유전자의 불활성화는 WO2014189628에 기재된 기술들에 기초한 Argonaute와 같은, DNA-가이드된 엔도뉴클레아제 또는 Cas9와 같은 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제에 의하여 수행된다.

[0177] 본 발명은 자가/비-자가 인식에 수반되는 적어도 하나의 유전자의 불활성화의 단계를 포함하는 동종이계 세포들의 지속 및/또는 이식을 증가시키는 방법에 대한 것이다.

[0178] "자가/비-자가 인식에 수반되는 유전자"에 의하여 면역 체계에 의한 동종이계 세포들의 감지 및 파괴에 필요한 것으로 여겨지는 외부 수용체 또는 리간드의 구조적인 부분인 폴리펩타이드를 코드하는 유전자가 의미된다. 이러한 유전자들은 바람직하게는 TCR의 적어도 하나의 요소, MHC, 특히 클래스 I MHC, 베타-2 마이크로글로불린 (B2M), TAP1 또는 큰 다중기능적 프로테아제 2를 코드한다.

[0179] 바람직한 예에서, 불활성화되는 유전자는 TCR 또는 B2M, 더욱 바람직하게는 TCR이다.

[0180] 본 발명에서 새로운 TALE-뉴클레아제들은 입양 면역요법 전략들을 위한 관련 유전자들을 정확하게 타겟팅하기 위하여 설계되었다. 본 발명에 따른 선호되는 TALE-뉴클레아제들은 서열번호 52-53, 55-56, 62-63 및 65-66. (TCR). 및  $\beta$ 2m의 불활성화를 위하여 서열번호: 2-3, 5-6 및 8-9로 구성되는 군으로부터 선택되는 타겟 서열을 인식하고 절단하는 것들이다.

[0181] 인간  $\beta$ 2m을 절단하는 TALE-뉴클레아제들

[0182] 인간  $\beta$ 2m 유전자의 엑손들을 타겟팅하는 TALE-뉴클레아제들을 코드하는 mRNA가 Cellectis Bioresearch (8, rue de la Croix Jarry, 75013 PARIS)로부터 주문되었다. 하기 표 1은 15-bp 스페이서에 의하여 분리된 (반(half) 타겟들이라 불리는) 두 개의 17-bp 길이 서열들로 구성되는 타겟 서열들 사이에 결합하고 절단하도록 조작된 반복 서열을 각각 포함하는 (반(half) TALE-뉴클레아제들로 불리는) 두 개의 독립적인 독립체들에 의하여 절단되는 타겟 서열들을 가리킨다.

[0183]

丑 1

[0184]

		CCATGCCAGCAATGGCGGCGCAGGCCGGCGCTGGAGAGCATTGTCGCCAGTT ATCTGCCCTGATCCGGCGTGTGGCCGCTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCCTGG CCTGCCTGGCGGGCTCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGATCC TATCAGCCCTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAAGAAATCGAGTTG AGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCC GGAACAGCACCCAGGACCGTATCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTCATGAA GGTGTACGGTACAGGGCAAGCACCTGGCGGCCAGGAAGCCGACGGCGC CATCTACACCGTGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGTGACGACCCAAGGCCT ACTCCGGCGTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCAGAATGCAAGGGTACGT GGAGGAGAACCAAGCAGGAACAAGCACATCAACCCAACGAGTGGGAAGGT GTACCCCTCAGCGTGAACCGAGTTCAAGGTTCTGTGTCGGCCACTTCAAGG GCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCAACTCACCAACTGCAACGGCGC GTGCTGTCCGGAGGGCTCTGATCGCGGCCAGATGATCAAGGCCGGACCC TGACCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACACGGCGAGATCAACTCGCG CCGACTGATAA
T01 TALEN 베타 2 M 오른쪽	3	ATGGCGATCTAAAAAGAAACGTAAGGTACATCGATAAGGAGACCGCCGCTGCCA AGTTGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGATATCGCGATTCAGCACGCTCG CTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGGTTCGTTGACAGTGGCG CAGCACACAGGAGCAGTGGCGCACGGGTTAACACCGCAGCATCGTGCCTT AAGCCAACACCCGGCAGCGTAGGGGACCGCTCGCTGCAAGTATCAGGACATGATC GCAGCGTTGAGGAGGACACAGCAAGCGATCGTGGCGTGGCAAACAGTGGT CCGGCACCGCCTGGAGGCTTGTCAAGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGT ACCGTTACAGTTGGACACAGCCAACCTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGCGTGA CCGCAGTGGAGGAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAA CTTGACCCGGAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTGCAGGCCTGTGGCCGGTGTGCCCCACGGCTGACCC CCCAGCAGGTGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTTGGCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAG GTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGG CCATCGCCAGCCACGATGGCGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGG GCCGGTGTGCGCAGGCCACGGCTTGACCCCCACGGCTGGAGACGGTGGCCATGCC AGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCGGCTGAG CTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGCCATGCCAGCCAGG ATGGCGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCGGCTGTGCGA GGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGC AAGCAGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCGGCTGTGCGCAGGCCACG GCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGC GCTGGAGACGGTGCAGGCCTGTGCCGGTGTGCGGCCAGGCCACGGCTTGACCC CCCAGCAGGTGGTGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGA CGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTGTGCGCAGGCCACGGCTGACCCCCAGCAG GTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGGC GGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGG CATGCCAGCCACGATGGCGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTG CGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGCCATGCCA GCCACGATGGCGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTGTG GTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATT

[0185]

		GGTGGCAAGCAGGCCCTGGAGACGGTGCAGGCCGTGTCGCCGTGCTGTGCCAG GCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCA AGCAGGCCGTGGAGACGGTCCAGGCCGTGTCGCCGTGCTGTGCCAGGCCACGG CTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCC CTGGAGACGGTGCAGGCCGTGTCGCCGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCC CTCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGGCAGGCCGGCTGGAGA GCATTGTTGCCAGTTATCTGCCCTGATCCGGCTGGCCGCTTGCAGCAACGAC CACCTCGTCGCTGGCTGCCCTGCCGGCGTCTGCGCTGGATGCAGTGAAGAAA GGGATTGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTAAGTCCGAGCTGGAGGA AAGAAATCGAGTTGAGGACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGC TGATCGAGATGCCCGAACAGCACCCAGGACCGTATCTGGAGATGAAGGTGAT GGAGTCTCATGAAGGTGACGGCTACAGGGCAAGCACCTGGCGCTCCAGG AAGCCGACGGGCCATCAGCCGTTCCAGCTGGAGTCAAGTCTGTGTC GGCACCAAGGCCACTCAGCCGCTACAACCTGCCATGCCAGGCCAGCAA ATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCAACG AGTGGTGAAGGTGACCCCTCAGCGTACCGAGTTCAAGTCTGTGTC GGCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACACATCACCA CTGCAACGGCGCCGTGCTGCGTGGAGGAGCTCTGATCGCGGGAGATGATC AAGGCCGGCACCTGACCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACACGGCGAG ATCAACTTCGCGGCCACTGATAA
T02 비타 2 M 타겟	4	TCCAAAGATTCAAGTTACTCACGTACATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAA
T02 TALEN 비타 2 M 왼쪽	5	ATGGCGATCTAAAAAGAAACGTAAGGTACATCGATTACCCATACGATGTTCCAGA TTACGCTATCGATATGCCATCTACGCACGCTCGCTACAGGCCAGCACAGG AGAAGATCAAACCGAAGGTTGTCGACAGTGGCGCAGCACACGAGGCACTGGT CGGCCACGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGT TAGGGACCGTCGCTGCAAGTACAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGAC ACACGAAGCGATGTTGGCGTCGCAAACAGTGGCCGGCAGCGCTCTGGAG GCCTTGCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTGGACACAG GCCAACTCTCAAGATTGCAAACAGTGGCGGCGTGAACCGCAGTGGAGGCACTGCA TGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCGCTCAACTGACCCGGAGCAGGTG GTGGCCATCGCAGGCCACGATGGCGCAAGCAGGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGG CTGTTGCCGGTGTGTCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCA TCGCCAGCACGATGGCGCAAGCAGGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGC GGTGTGTCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCAATGCCAGC AATATTGGTGGCAAGCAGGGCTGGAGACGGTGCAGGGCTGTTGCCGGTGTGT GCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCAATGCCAGCAATAATTGG TGGCAAGCAGGGCTGGAGACGGTGCAGGGCGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCAATGCCAGCAATAATTGGTGGCAAGC AGGGCTGGAGACGGTGCAGGGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCCACGGCTT GACCCCCAGCAGGGTGGCCAATGCCAGCAATAATTGGTGGCAAGCAGGGCTG GAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGG AGCAGGGTGGTGGCCAATGCCAGCAATAATTGGTGGCAAGCAGGGCTGGAGACGG TGCAGGGCCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGGT GGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGGCTGGAGACGGTCCAGCG

[0186]

		GCTGTTGCCGGTGTGCCCCACGGCTTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCC ATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTG CGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAG CCACGATGGCGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTG TGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATTG GTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTGCAGGCCTGTTGCCGGTCTGTCAG CCCACGGCTTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCA GCAGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTCAGGCCACGGC TTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGC TGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTCAGGCCACGGCTTGACCC CCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTCAGGCCACGGCTGACCCCGCAGCAG GTGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTCTGTCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGG CCATGCCAGCAATGGCGGCGCAGGCCAGGCTGGAGACGATTGTCAG ATCTCGCCCTGATCCCGCTTGGCCCGTGTGACCAACGACCACCTCGTCGCTTGG CCTGCTCGGCCGGCTCTGCGCTGGATGCACTGAGCTGGAGGAGAAGAAATCGAGTT TATCAGCCGTTCCACAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCGAGTT AGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGAGATGCC GGAACAGCACCCAGGACCGTATCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTCATGAA GGTGTACGGTACAGGGCAAGCACCTGGCGGCTCCAGGAAGGCCGACGGC CATCTACACCGTGGGCTCCACACTACGGCGTGTGTCGGACACCAAGGC ACTCCGGCGCTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCAGAATGCAAGAGGTACGT GGAGGAGAACAGACAGGAACAAGCACATCAACCCAACGAGTGGTGGAGG GTACCCCTCCAGCGTACCGAGTTCAAGTCTGTTCTGTCGGGACTTCAGG GCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCATCACCAACTGCAACGGC GTGCTGTCGGAGGAGGAGCTCTGATCGGCCGGAGATGATCAAGGCCGACCC TGACCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACACGGCGAGATCAACTCGCG CCGACTGATAA
T02 TALEN 베타 2 M 오른쪽	6	ATGGCGATCTAAAAAGAAACGTAAGGTACATCGATAAGGAGACGCCGCTGCC AGTTGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGATATGCCGATCTACGACGCTCG CTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCTGTCAGCTGG CAGCACCAGAGGCACTGGCGGCCACGGGTTACACCGCAGCACATCGTGC AAGCCAACACCGCGAGCGTAGGGACACAGGAAGCAGTCTGTCAGTATCAG GCAGCGTTGCCAGAGGCACACAGGAAGCAGTCTGGCGCTGGCAAACAGTGG CCGGCGACCGCTGGAGGCTTGTCTACGGTGGCGGGAGAGGTTGAGAGGT ACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAATTCTCAAGATTGCAAACAGTGGCG CCGAGCTGGAGGAGCTGATGCACTGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCG CTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGTGCCGGTCTGTCAGGCCACGGCTTGAC CGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGC CGGTGAGGCGCTGGCCAGGCCACGGCTGCTGTCAGGCCACGGCTGAC GGTGGTGGCCATGCCAGGCCACGGCTGCTGTCAGGCCACGGCTGAC GCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCG TTGCCGGTCTGTCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCG CAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGGCCACGG GCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAAT

[0187]

		GGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGTGTC CAGGCCACGGCTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCATGCCAGCACGATGGCG GCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGTGTCAGGCCA CGGTTGACCCGGAGCAGGTGGCATGCCAGCACGATGGCGCAAGCAG GCGTGGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGTGTCAGGCCA CCCCGAGCAGGTGGCATGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCCTGA GACGGTGCAGCGCTGTTGCCGTGTCAGGCCA CAGGTGGTGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGAGCGGTC CAGCGCTGTTGCCGTGTCAGGCCA TGGCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGAGCGGTCAGCGC TGTGCCGGTGTGTCAGGCCA CGCCAGCACGATGGCGCAAGCAGGCCTGAGCGGTCAGGCCA GGTGTGTCAGGCCA AATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGAGCGGTCAGGCCA GCCAGGCCACGGCTGACCCGGAGCAGGTGGCATGCCAGCACGATGG CGGCAAGCAGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCAGGCCA CACGGCTGACCCGGAGCAGGTGGCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGC AGGCCTGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTCAGGCCA GACCCCTCAGCAGGTGGTGCCATGCCAGCAATGGCGGCGAGGCCGCTG GAGAGCATTGTTGCCAGTTCTGCCCTGATGCCGTTGCCCGTGTGACCAA CGACCACCTCGTCGCCCTGGCTGCCCTGGCGGCTCTGCCGCTGGATGCA AAAAGGGATTGGGGATCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGTGAAGTCCGAGCTGA GGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCACGAGTACATC GAGCTGATCGAGATGCCCGAACAGCACCCAGGACCTGAGTGAAGG TGATGGAGTTCTCATGAAGGTGACGGCTACAGGGCAAGCACCTGGCGCTC CAGGAAGCCGACGGCGCATCTACACCGTGGGCTCCCATGACTACGGCGT ATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGCTACACCTGCCATCGGCAGGCCA CGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACAGCACAGGAAACAGCACATCA AACAGAGTGGAGGTAACCTCCAGCGTGAACGGAGTTCAAGTCTGTTGT GTCCGCCACTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCA CCAECTGAAACGGCGCGTGCTCCGTGGAGGAGCTGTGACGGCGAGAT GATCAAGGCCGACCCCTGACCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACACGG CGAGATCAACTCGCGGCGACTGATAA
T03 비타 2 M 타겟	7	TTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTCTGGCCTGGAGGCTATCCA
T03 TALEN 비타 2 M 왼쪽	8	ATGGCGATCTAAAAAGAAACGTAAGGTATCGATTACCCATACGATGTTCCAGA TTACGCTATCGATATGCCGATCTACGCACGCTGGCTACAGCCAGCACAGG AGAAGATCAAACCGAACGGTTCGTCGACAGTGGCGCAGCACACGAGGACTGGT CGGCCACGGGTTACACACGCGCACATCGTTCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGT TAGGGACCGTCGCTGCAAGTATCAGGACATGATGCCGAGCGTGGCGAGAGGCGAC ACACGAAAGCGATCGTGGCGTCGCAAACAGTGGTCCGGCGACCGCCTGGAG GCCTTGTCTACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCAACCGTTACAGTTGGACACAG GCCAACTCTCAAGATTGCAAACCGTGGCGCGTGACCGCAGTGGAGGAGCTGCA TGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACTGACCCGGAGCAGGTG GTGGCCATGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCCTGAGACGGTGCAGCG

[0188]

		CTGTTGCCGGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCAT CGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCC ACGATGGCGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGCTGTTGCCGGTGTG GCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATGCCGG TGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGTGTTGCCGGTGTGCCCAGGCC CACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGC AGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGTGTTGCCGGTGTGCCCAGGCCAGGGCTG GACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATGCCGGTGGCAAGCAGGCCTG GAGACGGTCCAGCGGTGTTGCCGGTGTGCCCAGGCCACGGCTTGACCCCC AGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGG TCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCCAGGCCACGGCTGACCCCCGGAGCAGGT GGTGGCCATGCCAGGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTGTGCCCAGGCCACGGCTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCC ATGCCAGCAATGCCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGGCCGTTG CGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAG CCACGATGGCGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGTGTTGCCGGTGTG TGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATG GTGGAAGCAGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGTGTTGCCGGTGTGCCCAGGC CACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGGCAAG CAGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGTGTTGCCGGTGTGCCCAGGCCACGGCT TGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCCT GGAGACGGTCCAGCGGTGTTGCCGGTGTGCCCAGGCCACGGCTGACCCCC GAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCCTGGAGACG GTCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCCAGGCCACGGCTGACCCCCAGCAGGT GGTGGCCATGCCAGCAATGCCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTGTGCCCAGGCCACGGCTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCC ATGCCAGCAATGCCGGCAGGCCAGGGCGCTGGAGAGACATTGTTGCCAGTT CTGCCCTGATCCGGCGTGGCGCTGGATGCACTGAAAAAGGGATTGGGGATCCTA TGCCCTGGCGGGCGTCTGCCGTGGATGCACTGAGTGGAGATTTCTCATGAAGG TCAGCCGTTCCCAGCTGGTAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAG GCACAAGCTGAAGTACGTGCCAACGAGTACATCGAGCTGAGATCGCCGG AACAGCACCCAGGAGCGTATCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTCATGAAGG TGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGCGCTCCAGGAAGGCCGACGGCGCCAT CTACACCGTGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGTGAGGACACCAAGGCCTACT CCGGCGGCTACAAACCTGCCCATCGGCCAGGCCACGAAATGAGGTACGTGGA GGAGAACAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCAAACGAGTGGAGAGGTGTAC CCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTCTGTTGTCCGGCACTTCAAGGGCAA CTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCATCACCAACTGCAACGGCGCCGTG TGTCCGTGGAGGAGCTCTGATCGGCCGGAGATGATCAAGGCCGGACCCCTGAC CTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTCGCGGCCGA CTGATAA
--	--	---

[0189]

[0190]		<p>T03 TALEN 베타 2 M 오른쪽</p> <p>9</p> <pre>ATGGGCGATCCTAAAAAGAACGTAAGGTATCGATAAGGAGACGCCGCTGCCA AGTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGATATGCCGATCTACGCACGCTCGG CTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAAGATCAAACCGAAGGTTGTTGACAGTGGCG CAGCACCCAGGAGGACTGGTCGGCACGGTTTACACACGCGCACATCGTGGCTT AAGCCAAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTCAAGTATCAGGACATGATC GCAGCGTGGCCAGAGGCAGCACACAGGAAGCGATCGTGGCGTGGCAACAGTGGT CCGGCGCACCGCAGCTGGAGGCCCTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTC ACCGTTACAGTGGACACAGGCCACTCTCAAGATGCAAACAGTGGCGGCTGAA CCGAGTGGAGGAGTGCATGGCGCAATGCACACTGACGGTGCCCCGCTCAA CTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGGC CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTCAGGCCAGGCCCAGGCTTGACCC CCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGGCTGGAGAC GGTCAAGGGCTGTTGCCGGTGTGTCAGGCCAGGCCCACGGCTTGACCCGGAGCAG GTGGTGGCATGCCAGCAATAATTGGTGGCAAGCAGGGCTGGAGACGGTGCAG GCGCTGTTGCCGGTGTGTCAGGCCAGGCCCACGGCTGGAGACGGTCCAGGGCTGTT GCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCC AGCAATAATTGGTGGCAAGCAGGGCTGGAGACGGTCCAGGGCTGTTGCCGGTGC TGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAAT GGTGGCAAGCAGGGCTGGAGACGGTCCAGGGCTGTTGCCGGTGTGTCAG GCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGGACATGGCGGCA AGCAGGGCCTGGAGACGGTCCAGGGCTGTTGCCGGTGTGTCAGGCCAGGCCCACGG CTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGGCCAGGACATGGCGGCAAGCAGGG CTGGAGACGGTCCAGGGCTGTTGCCGGTGTGTCAGGCCAGGCCCACGGCTGACCC CTCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGGGGAGCAGGGCTGGAGA GCATTGTTGCCAGTTATCTGCCCTGATCCGGCTGGCCGCTGGCGTGGACCAACGAC CACCTCGTCGCTTGGCTGCCCTGGCGGGCTCTGCGCTGGATGCACTGGAGTGGAAAAA GGGATTGGGGGATCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAG AAGAAATCGAGTTGAGGACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGC TGATCGAGATGCCCGAACAGCACCCAGGACCGTATCTGGAGATGAAGGTGAT GGAGTTCTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGCGGCTCCAGG AAGCCCGACGGGCCATCACCCGGTGGCTCCAGCTGACTACGGCGTGTGCGT GGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTAACCTGCCATCGGCCAGGCCAGGAA ATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACAGACAGGAACAGCACATCAACCCAAACG AGTGGTGGAGGTGTACCCCTCCAGCGTGAACCGAGTTCAAGTTCTGTTGTC GGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAA</pre>
--------	--	--

		<pre>CTGCAACGGCGCCGTGCTGCCGTGGAGGAGCTCTGATCGCGGGGAGATGATC AAGGCCGGACCTGACCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAAACGGCGAG ATCAACTTGCAGGCCAGCTGATAA</pre>
--	--	---

[0191]

[0192]

표 1:  $\beta$  2m TALE-뉴클레아제들 서열들의 기재

[0193]

인간 PD-1 유전자를 절단하는 TALE-뉴클레아제들

[0194]

자가 및 비-자가 항원 인식에 수반되는 상기 유전자의 불활성화에 추가하여, 추가의 유전적 조작이 WO2014/184744에 기재된 대로의 면역 체크포인트들을 코드하는 하나 또는 몇몇의 유전자들의 불활성화와 같은 것에 추구될 수 있다.

[0195] 선호되는 예에서, 자가/비 자가 인식에 수반되는 적어도 하나의 유전자의 불활성화에 대하여, 추가적인 불활성화가 PD-1을 코드하는 유전자 상에서 수행된다. PD-1은 (PDCD1 또는 CD279로도 알려진, RefSeq accession number: 인간 유전자에 대한 NM\_005018) 인간 프로그램된(Programmed) 사망(Death) 1에 대응한다. 바람직하게는 TALEN-매개 봉괴에 의한, 이 PD-1 억제는 동종이계 면역 세포들을 (CD274 또는 B7 상동체 1 (B7-H1)로도 알려지고, 인간 유전자에 대한 RefSeq N° NM\_001267706를 가진) PD-L1에 의한 상호간의 또는 그것들 스스로의 억제에 내성으로 만드는 것을 목적으로 갖는다.

[0196] 선호되는 예에 따라, PD-1 유전자의 상기 불활성화는 하기 표 2에 제시된 대로 TALE-뉴클레아제들을 코드하는 폴리뉴클레오타이드를 이용함으로써 수행된다.

## 표 2

타겟	타겟 서열	발 TALE-뉴클레아제
PDCD1_T01	TTCTCCCCAGGCCCTG CT cgtggtgaccgaagg GGACAAACGCCACCTTCA (서열번호: 10)	PDCD1_T01-L TALEN (서열번호: 11)
		PDCD1_T01-R TALEN (서열번호: 12)
PDCD1_T03	TACCTCTGTGGGGC CAT ctccctggcccccaa GGCGCAGATCAAAGAGA (서열번호: 13)	PDCD1_T03-L TALEN (서열번호: 14)
		PDCD1_T03-R TALEN (서열번호: 15)

[0197]

표 2: TALEN들의 2 쌍들의 폴리뉴클레오타이드 서열들이 2 개의 다른 PDC1 (또는 PD-1) 유전자 타겟들에 대하여 제시된다.

[0199] 본 발명의 한 예에 따라, 그 방법의 상기 단계 c)는 막에 결합된 PD-L1 리간드를 코드하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되고, 상기 동종이계 세포들의 추가의 변형은 PD-1 유전자의 발현의 불활성화에 의하여 수행된다.

[0200] 본 발명의 또 다른 예에 따라, 상기 단계 c)는 분비된 CTLA4 면역글로불린들에 대응하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드를 상기 면역 세포들에서 발현시킴으로써 수행되고, 그리고 상기 동종이계 세포들의 추가의 변형이 PD-1을 코드하는 유전자의 발현의 불활성화에 의하여 수행된다.

[0201] 본 발명의 선호되는 예에 따라, 상기 단계 c)는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드 PD-L1 리간드 및 CTLA-4 면역글로불린들 둘 다의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되는 단계 c)에 의하여 수행되고 상기 동종이계 면역 세포들의 추가의 변형은 PD-1을 코드하는 유전자의 발현의 불활성화에 의하여 수행된다.

### 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드의 발현

[0203] 선호되는 예에 따라, 본 발명의 방법의 상기 단계 c)는 상기 면역 세포들의 막에 결합된 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드를 코드하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행된다.

[0204] 한 예에 따라, 상기 내생이 아닌(non endogenous) 면역억제 폴리펩타이드는 분비되는 형태로 및/또는 막-결합된 형태로 존재한다.

[0205] "내생이 아닌(non-endogenous) 폴리펩타이드"에 의하여 기증자의 면역 세포에 의하여 정상적으로 발현되지 않는 폴리펩타이드, 바람직하게는 면역(immune)의 세포 계놈 내로 들여온 외인성 폴리뉴클레오타이드에 의하여 발현되는 폴리펩타이드가 의미된다. 예를 들어, IL12는 여기에서 내생이 아닌 폴리펩타이드로 고려되지 않는데, 그

것이 기증자의 면역 세포로부터의 기존의 유전자로부터 발현되기 때문이다.

[0206] "자연적으로 발현되지 않는"에 의하여 상기 폴리펩타이드를 코드하는 폴리뉴클레오타이드 서열이 면역 세포 (예컨대: CTLA4 Ig)의 계놈에 원래 존재하지 않거나, 또는 계놈에 존재하지만, 폴리펩타이드가 원래의 (즉 조작되지 않은) 면역 세포에서 훨씬 낮은 수준으로 - 동일한 실험적 또는 치료 조건들에서 조작된 면역 세포 내로 관찰되는 발현 수준보다 일반적으로 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 100% 그리고 더욱 더 바람직하게는 200% 더 낮게 - 발현되는 것이 의미된다.

[0207] "면역억제"에 의하여 상기 내생이 아닌 폴리펩타이드의 발현이 기증자의 면역 세포들에 대항하는 환자 숙주의 면역 반응을 완화시키는 효과를 갖는다는 것이 의미된다.

[0208] 본 발명의 선호되는 측면에 따라, 상기 내생이 아닌(non endogenous) 면역억제 폴리펩타이드가 PD-L1, CTLA-4-Ig, 바이러스 MHC 상동체, NKG2D 리간드, 바이러스 외피(env) 면역 억제 도메인 (ISU) 또는 바이러스 FP 단백질 중에서 선택된다.

[0209] 한 예에 따라, 그 방법은 단계 c) 내생이 아닌 분비된 면역억제 폴리펩타이드에 대응하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드의 면역 세포들에서의 발현을 포함한다.

[0210] 더 선호되는 예에 따라, 상기 면역 세포들의 막에 결합되는 상기 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 막-결합된 형태인 PD-L1 리간드이다.

#### **CTLA-4-Ig의 발현**

[0212] 한 예에 따라, 상기 동종이계 면역 세포들에서 발현되는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 CTLA-4 단백질의 리간드, 바람직하게는 CTLA4 면역글로불린이다. 세포독성(Cytotoxic) T-림프구(Lymphocyte) 항원(Antigen) 4 (CTLA-4)는 CD152로도 알려져 있다 GenBank accession number AF414120.1).

[0213] 선호되는 예에 따라, 상기 동종이계 면역 세포들에서 발현되는 CTLA-4 면역글로불린에 대응하는 폴리펩타이드는 서열번호: 16 (CTLA-4a) 또는 서열번호: 17 (CTLA4b)을 포함하거나, 또는 서열번호: 16 또는 서열번호: 17과 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95% 동일성을 공유한다.

[0214] 동종이계 T 세포 및 숙주 면역 세포들 사이의 상호작용은 도 1의 상황에 관하여 (발현 없음) 도 2에 도식적으로 나타내어진다 (CTLA4-Ig의 발현).

[0215] 하나의 선호되는 예에 따라, 발현되는 CTLA-4a Ig 및 CTLA-4b Ig를 코드하는 핵산 분자는 각각 하기 표 3에 제시되는 대로 서열번호: 16 및 서열번호: 17과 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유한다.

## 표 3

구조체 명칭	발현	서열 번호:	폴리펩타이드 서열
pCLS27068	CTLA4a 발현 플라스미드	16	MGGVLLTQRTLSSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLOSSRGIAFVCEYAS PGKATEVRVTVLRQADSQTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVN LTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSS DKTHTSPSPAPAEELLGGSSVLFPPPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPNENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGS
pCLS27066	CTLA4b 발현 플라스미드	17	MGGVLLTQRTLSSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLOSSRGIAFVCEYAS PGKYTEVRVTVLRQADSQTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVN LTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSS DKTHTSPSPAPAEELLGGSSVLFPPPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPNENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGS
pCLS27069	PD-L1 발현 플라스미드	18	MGRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTPV рКДЛYVEYGSNMNTIECKFPVEKQLDLA ALIVYWEМEDKNIIQFVHGЕEDLKVKHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDV KLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAРYNKINQRILVVDPVTEHELTСQA EGYPKAЕVIWTSSDHQVLSGKTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTNEIFYCTFR RLDPEENHTAELVPIELPLAHPPNERTHЛVILGAИLLCLGVАLTIFRLRKGRMM DVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEETGS

[0216]

[0217] 표 3: CLTA-4a, CLTA-4b 및 PD-L1을 발현시키는 플라스미드 구조체들의 폴리뉴클레오타이드 서열들.

[0218] 한 예에 따라, 조작된 면역 세포들이 항-CD80 또는 항-CD86 mAbs인 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드와 배양된다.

#### PD-L1의 발현

[0220] PD-L1 (다른 명칭들: CD274, 프로그램된 세포 사망 1 리간드; 인간 폴리펩타이드 서열 Q9NZQ7에 대한 ref. UniProt Q9NZQ7)은 Ig V-유사 도메인, Ig C-유사 도메인, 소수성 막판통 도메인 및 30 아미노산들의 세포질 꼬리로 구성되는 290 아미노산들의 타입 I 막판통 단백질을 코드한다.

[0221] 본 발명의 선호되는 예에 따라 상기 동종이계 면역 세포들에서 발현되는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 PD-L1의 리간드, 더욱 특히 막-결합된 형태이다.

[0222] PD-L1 리간드의 이러한 막-결합된 형태는 예컨대, 세포내 도메인의 제거에 의하여, 또는 하나 이상의 돌연변이 (들)로, 와 같은 길이를 줄인 형태 또는 원래의 형태(야생형)로 본 발명에서 의미된다. PD1은 본 발명에 따른 PD-L1 리간드의 막-결합된 형태로 고려되지 않는다 (Wang S et al, 2003, J Exp Med. 2003; 197(9): 1083-1091).

[0223] 더 선호되는 예에 따라, 발현되는 막-결합된 형태인 PD-L1 리간드를 코드하는 핵산 분자는 서열번호:18이고, 또는 (PDL1-리간드의 야생형에 대응되는) 서열번호:18과 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유한다.

[0224] 또 다른 예에 따라, 상기 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 분비되는 형태인 PD-L1 리간드이다. 이러한 재조합 분비된 PD-L1 (또는 가용성 PD-L1)는 면역글로불린의 Fc 부분에 대하여 PD-L1의 세포외 도메인을 융합함으로써 만들어질 수 있다 (Haile ST et al, 2014, Cancer Immunol Res. 2(7): 610-615 ; Song MY et al, 2015, Gut. 64(2):260-71). 이 재조합 PD-L1은 PD-1을 중화시키고 PD-1-매개된 T-세포 억제를 없앤다 (abrogate).

[0225] 동종이계 T 세포 및 숙주 면역 세포들 사이의 상호작용은 도 1의 상황에 대하여 (발현 없음) 도 3에 도식적으로

나타나 있다 (막-결합된 PD-L1의 발현). 도 3은 PD-1 유전자가 K0에 의하여 붕괴될 때 상황을 또한 보여준다.

[0226] 선례에 대한 대체에 따라, 상기 동종이계 면역 세포들에서 발현되는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 분비되는 형태인 PD-L1 리간드이다. 동종이계 T 세포 및 숙주 면역 세포들 사이의 상호작용은 도 1의 상황에 대하여 (발현 없음) 도 4에 도식적으로 나타나 있다 (분비된 PD-L1 리간드의 발현). 도 4는 또한 PD-1 유전자가 K0에 의하여 붕괴될 때 상황을 나타낸다.

[0227] 하나의 선호되는 예에 따라, 핵산 분자는 서열번호: 18의 것으로 발현되는 막-결합된 PD-L1를 코드하거나, 또는 서열번호: 18과 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유한다.

[0228] CTLA4 Ig와의 PD-L1 리간드의 공(co)-발현

[0229] 본 발명은 또한 숙주 면역 세포들의 존재 하 동종이계 면역 세포들의 지속 및/또는 이식을 증가시키는 방법에 대한 것으로, 이때 단계 c)는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드 PD-L1 리간드 및 CTLA-4 면역글로불린들 둘 다와 상기 숙주 면역 세포들을 접촉시킴으로써 수행된다.

[0230] 선호되는 예에 따라, 그 방법의 단계 c)는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드 PD-L1 리간드 및 CTLA-4 면역글로불린들 둘 다의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행된다.

[0231] 선호되는 예에 따라, 핵산 분자들은 상기 동종이계 면역 세포들에서 그 방법의 단계 c) 동안 발현되는 CTLA-4 면역글로불린들, 그리고 막-결합된 형태인 PD-L1 리간드를 코드하고, 상기 PD-L1 리간드 및 CTLA-4 Ig는 각각 서열번호: 18 및 서열번호: 16-17을 갖거나, 또는 각각 서열번호: 18 및 서열번호: 16-17과 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유한다.

#### ISU 도메인의 발현

[0233] 또 다른 예에 따라, 상기 동종이계 면역 세포들에서 발현되는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 예컨대 HIV-1, HIV-2, SIV, MoMuLV, HTLV-I, -II, MPMV, SRV-1, Syncitin 1 또는 2, HERV-K 또는 FELV로부터 유래되는, 바이러스 외피(env) 면역억제(immusuppressive) 도메인 (ISU)이다.

[0234] 동종이계 T 세포 and 숙주 면역 세포들 사이의 상호작용은 도 1의 상황에 대하여 (발현 없음) 도 5에 도식적으로 나타내어진다 (바이러스 ISU 도메인의 발현).

[0235] 하기 표 4는 본 발에서 발현될 수 있는 다양한 바이러스로부터의 ISU 도메인의 변종들을 보여준다.

**표 4**

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

[0237] 표 4: 다양한 바이러스들로부터의 ISU 도메인 변종들

[0238] 따라서, 특정 예들에서, 상기 동종이계 면역 세포들에서 발현되는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 서열번

호 19-38의 ISU 도메인이다.

[0239] **바이러스 MHC 상동체의 발현**

[0240] 또다른 예에 따라, 상기 동종이계 면역 세포들에서 발현되는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 예컨대 UL18과 같은 바이러스 MHC 상동체이다.

[0241] 한 예에서, 상기 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 서열번호 39의 키메라 베타2m -UL18을 포함하거나, 또는 각각 서열번호:39와 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 MHC 상동체이다.

[0242] 동종이계 T 세포 및 숙주 면역 세포들 사이의 상호작용은 도 6의 상황과 관련하여 (발현 없음) 도 7에 도식적으로 나타나 있다 (바이러스 MHC 상동체의 발현). 도면들 둘 다에서 MHC 클래스 I은 베타2M 유전자를 봉괴시킴 (KO)으로써 불활성화된다.

[0243] **NKG2D 리간드의 발현**

[0244] 사이노메갈로바이러스들과 같은 몇몇 바이러스들은 그것들의 표면 발현을 방지하고 NKG2D 리간드들에 결합할 수 있는 단백질을 분비함으로써 NKG2D 경로를 방해하고 NK 세포 매개 면역 감시(surveillance)를 피하기 위한 메커니즘들을 요구하여 왔다 (Welte, S.A.; Sinzger, C.; Lutz, S.Z.; Singh-Jasuja, H.; Sampaio, K.L.; Eknigk, U.; Rammensee, H.G.; Steinle, A. 2003 "Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein". Eur. J. Immunol., 33, 194-203). 종양들 세포들에서, 몇몇 메커니즘들은 ULBP2, MICB 또는 MICA와 같은 NKG2D 리간드들을 분비함으로써 NKG2D 반응을 피하기 위하여 수반되어 왔다.

[0245] 또다른 예에 따라, 상기 동종이계 면역 세포들에서 발현되는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 NKG2D 리간드이다. 동종이계 T 세포 및 숙주 면역 세포들 사이의 상호작용은 도 6의 상황에 대하여 (발현 없음) 도 8에 도식적으로 나타내어져 있다 (가용성(soluble) NKG2D 리간드의 발현). 도면들 둘 다에서, MHC 클래스 I은 베타2M 유전자를 봉괴시킴 (KO)으로써 불활성화된다.

[0246] 하기 표 5는 본 발명에 따라 발현되는 그것들의 폴리펩타이드 서열 및 NKG2D 리간드들의 패널 및 바이러스 MHC 상동체 (UL18)를 나타낸다.

## 표 5

	서열번호	폴리펩타이드 서열
키메라 B2M-UL18	39	MALPV TALLPL ALLLHAARPSRSVALA LLSGLEAIQ RTPKIQVYSRHPAENGKSNFLN CYVSGFHP PSDIEVDLLKNGERIEKVEHS DLSFSKDW SFYLLYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLS QPKIVKWD RDMGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM TMWCLTFVLWMLRVVGMHVLRY GYTGIFDDTSHMTLVGIFDGQHFFT YHVNSDKASSRANGTISWMANVSAAYPTYLGE RAKGDLIFNQTEQNLEI ALGYRSQS VLTWTHECN TTENGSFVAGYEGFGWDGETLMEK DNLTLWTPGPNEYISWLKQNKTYIDGKIKNISEGDTT IQRNLYLGNCTQWSVIVSFGQTPVTH PVVKGGVRNQNDNRAEAFCTS YGFPGEINITFIHYGNKAPD DSEPQCNPLLTFDGT FHQG CYVAIFCNCNYTCRVTHGNWTV EIPISVTS PDDSSSEV PDPHTANKR YNTMTI SSVLL ALLL CALLFAFALHYFTTLKQYLRNLAF AWRYRKVRS
SP-MICAed	40	MGGVLLT QRTLSSVL ALLFPSMASM EPHSLR YNLMVLSQDES VQSGFL TEVHDGQPFLRC DRQKCRAKPQGQWAEDV LGNKT WDRTRD LTGNGKDLR MTLA HKDQKEGLHSLQ EIRV CEIHEDNSTRSSQH FYYDGE LFLSQNLET KEWTMPQSSRA QTLMVN RVNFL KEDAMKTKT YHAMHADCLQELRRY LKSGV VLRTVPPMVNVTR SEASEG NITVTCRAS GYF PWN ITLSWR QDG VSL SHDTQQWGDV LPD GN GTYQTW VATRIRQ GEEQ RFT CYMEHSGN HSTHPVPSG KVLV LQSQ RTD
SP-MICBed	41	MGGVLLT QRTLSSVL ALLFPSMASM EPHSLR YNLMVLSQDES VQSGFL TEA GHLDGQPFL RYDRQKRAK P QGQWAEDV LGAKT WDTETE DL TENGQDLR RTLTHI DQKGG LHSLQ EIR VCEIHEDS STRGSRH FYYDGE LFLSQNLET QESTV PQSSRA QTLMVN TVN FWK EDAM KTKT HYRAM QADCLQKLQ RYLKSGV AIRT VPPMVNVTC SEVSEG NITVTCRAS S FYP RN ITL TW QDG VSL SHDTQQWGDV LPD GN GTYQTW VATRIRQ GEEQ RFT CYMEHSGN HSTHPVPSG KVLV LQSQ RTD
SP-ULBP1ed	42	MGGVLLT QRTLSSVL ALLFPSMASM GMWV DTHCL CYD ITV PKF RP GPRW CAVQ GQV DEKT FLHYDCGNKTVTPVSPLGKLN VTTAWKAQNP VLREV VDILTEQLRD IQLEN YTPK EPLT LQA RMSC EHEA GHGRGSWQ FNGQKF LLFDSE KRMWTTVHPGARKMKEK WEND KV VAMS FHYF S MGDCIGW LEDFL MGMD STLEPSAG
SP-ULBP2ed	43	MGGVLLT QRTLSSVL ALLFPSMASM GRADPHSLC YD ITV PKF RP GPRW CAVQ GQV DEKT FLHYDCGNKTVTPVSPLGKLN VTTAWKAQNP VLREV VDILTEQLRD IQLEN YTPK EPLT LQA RMSC EHEA GHGRGSWQ FNGQKF LLFDSE KRMWTTVHPGARKMKEK WEND KV VAMS FHYF S MGDCIGW LEDFL MGMD STLEPSAG
SP-ULBP3ed	44	MGGVLLT QRTLSSVL ALLFPSMASM DAHS L WYNFTI IHL PRHG QQW CEVQ SQV DKNFL SYDCGS DKV L SMGH LEEQ LYATDAWG KQ LEM LREVG QRLR L EADTE LEDFTPSG PLT LQV RMSC EADG YIRG SWQ FSD GRK FLL FDSE NNRK WT VHPGARKMKEK WEND KDS GLTT FK MVS MRDCK SWL RD FLM HRKK R LEPT
SP-N2DL4ed	45	MGGVLLT QRTLSSVL ALLFPSMASM HSLCFNFTIKSLRPG QWPCEAQVFLNKNLF LQYNS DN NMV KPLG L GKKV YAT STW GEL T QTL GEV GRD LRM LLLCDIKPQIK TS DP STL QV E MFQ REAERTG ASWQ F ATGE KSLF DAMN M TWT VHE ASIKI KETW KK DRG L EK YFR KLSKG DCDHW LREFL GHWE AMPE PT VSPV NASDIH WSSS LPD
SP-RET1Ged	46	MGGVLLT QRTLSSVL ALLFPSMASM GLADPHSLC YD ITV PKF RP GPRW CAVQ GQV DEKT LHYDCGS KTVTPVSPLGKLN VTTAWKAQNP VLREV VDILTEQLRD IQLEN YTPK EPLT LQAR MSCEQKAEGHGS GS WQLSFDG QF LLFDSE NR MWTTVHPGARKMKEK WEND KDM TMS FHYISM GDCTG WLEDFL MGMD STLEPSAG A PPT MSSG TA QPR
SP-RAET1Led	47	MGGVLLT QRTLSSVL ALLFPSMASM RRD PHSLC YD ITV PKF RP GPRW CAVQ GQV DEKT FLHYDCGNKTVTPVSPLGKLN VTTMAWKAQNP VLREV VDILTEQLRD IQLEN YTPK EPLT LQ ARMSC EQKAEGHGS GS WQFSIDG QFT LLFDSE KRMWTTVHPGARKMKEK WEND KDV AM SFHYISM GDCTG WLEDFL MGMD STLEPSAG

[0247]

[0248] 표 5: NKG2D 리간드들의 패널 및 바이러스 MHC 상동체 (UL18)의 폴리펩타이드 서열.

[0249]

따라서, 특정 예들에서, 조작된 면역 세포들에서 발현되는 상기 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 서열번호 40-47의 NKG2D 리간드를 포함하거나 또는 이로 구성되거나, 또는 서열번호:40-47과 각각 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유한다.

[0250]

FP 폴리펩타이드의 발현

[0251]

또다른 예에 따라, 상기 동종이계 면역 세포들에서 발현되는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드가 gp41과 같은 FP 폴리펩타이드이다. 하기 표 6은 천연의 그리고 인공적인 기원들로부터의 몇몇 FP 폴리펩타이드를 나타낸다.

표 6

	위치									기원
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
서열번호 48	G	A	L	F	L	G	F	L	G	HIV-1 gp41
서열번호 49	A	G	F	G	L	L	L	G	F	합성
서열번호 50	A	G	L	F	L	G	F	L	G	합성

[0252]

[0253] 표 6: 천연의 그리고 인공적인 기원들로부터의 FP 폴리펩타이드의 아미노산 서열들

[0254] 따라서, 특정 예들에서, 조작된 면역 세포들에서 발현되는 상기 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 서열번호 48-50로 구성되는, 또는 각각 서열번호:48-50와 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유하는 FP 폴리펩타이드이다.

[0255] b)(non) 동종반응성 및 면역억제 내성 T 세포들

#### 유전자 발현과 유전자 불활성화의 조합

[0257] 본 발명자들은 여기에서 일련의 유전적 변형들이 수행될 수 있는, 동종이계 면역 세포들 상에 적용하기 위한 지속 및/또는 이식을 증가시키는 방법을 제시한다. 그것들 중에, 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드의 적어도 하나의 발현 및 자가/비 자가-인식에 관여하는 적어도 하나의 불활성화 유전자 둘 다의 다양한 조합들이 포함된다.

[0258] 선호되는 예에 따라, 유전적 변형들이 예컨대 UL18과 같은 NKG2G 리간드 바이러스 MHC 상동체 및/또는 바이러스 FP 단백질 및/또는 바이러스 외피(env) 면역 억제 도메인 (ISU) 및/또는 CTLA-4 면역글로불린들 및/또는 PD-L1 리간드의 상기 동종이계 면역 세포들의 발현과 조합된 B2M 및/또는 TCR 유전자의 불활성화에 의하여 수행된다.

[0259] 또한 본 발명의 범위에는 본 발명에 따른 전술된 히귀-절단 엔도뉴클레아제들을 코드하는 폴리뉴클레오타이드들, 벡터들이 포함된다.

[0260] 본 발명의 범위에는 또한 세포들을 조작하기 위한 상기 방법에 의하여 수득되기에 민감한 분리된 세포들 또는 세포주들, 특히 T 세포들과 같은 동종이계 면역 세포들이 포함되고, 이때 자가 및 비-자가 항원 인식에 관여되는 폴리펩타이드를 코드하는 적어도 하나의 내생의 유전자는 불활성화되고 적어도 하나의 내생이 아닌(non-endogenous) 면역억제 폴리펩타이드가 상기 모든 동종이계 면역 세포들과 접촉하는 것이 가능하게 된다.

[0261] 특정 측면에서, 본 발명은 T-세포들과 같은 면역 세포들을 조작하는 방법, 특히 면역요법에 대한 것이다.

[0262] 특정 예에서, 그 방법은:

[0263] i) 동종이계 세포들을 제공하는 단계;

[0264] ii) 자가 및 비-자가 항원 인식에 수반되는 폴리펩타이드를 코드하는 적어도 하나의 내생의 유전자를 불활성화 시킴으로써 상기 세포들;

[0265] 및;

[0266] iii) 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드와 상기 면역 세포들을 접촉시키는 단계

[0267] 를 포함한다.

[0268] 또다른 특정 측면에서, 본 발명은 T-세포들과 같은 면역 세포들을 조작하는 방법, 특히 면역요법에 대한 것이다.

[0269] 특정 예에서,

[0270] 그 방법은:

- [0271] i) 동종이계 세포들을 제공하는 단계;
- [0272] ii) 자가 및 비-자가 항원 인식에 수반되는 폴리펩타이드를 코드하는 적어도 하나의 내생의 유전자를 불활성화 시킴으로써 상기 세포들을 변형시키는 단계;
- [0273] 및;
- [0274] iii) 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드를 상기 면역 세포들에서 발현시키는 단계
- [0275] 를 포함한다.
- [0276] T 세포-매개 면역은 다수의 효과기(effectector) 면역 세포들을 위한 항원 특이적 세포들의 클론 선택, 이차 림프 조직에서 그것들의 활성화 및 증식, 항원 및 염증의 부위로의 그것들의 이송(trafficking), 직접적인 효과기 기능의 실행 및 (사이토카인들 및 막 리간드들을 통한) 도움의 제공을 수반하는 복수 개의 순차적인 단계들을 포함한다. 이를 단계들 각각은 반응을 미세조정하는 자극 및 억제 신호의 균형을 잡음으로써 조절된다.
- [0277] 예를 들어, CTLA-4는 특정 CD4 및 CD8 T 세포들에서 발현되는 세포-표면 단백질이다; 항원 제시 세포들 상에서 그것의 리간드들 (B7-1 및 B7-2)에 의하여 참여되면서, T-세포 활성화 및 효과기 기능이 억제된다. 그러므로, 본 발명은, 면역 체크-포인트에 관여되는 적어도 하나의 단백질, 특히 PD1 및/또는 CTLA-4, 을 불활성화시킴으로써 T-세포들을 유전적으로 변형시키는 단계를 포함하는, T-세포들을 조작하는 방법, 특히 면역요법에 대한 것이다.
- [0278] 또다른 예에서, 그 방법의 유전적 변형 단계는 둘보다 많은 유전자들의 불활성화에 의존한다. 유전적 변형은 바람직하게는 엑스-비보(ex-vivo)에서 작동한다.
- [0279] 인간 TCR 유전자들을 절단하는 TALE-뉴클레아제들 (TRAC 및 TRBC)
- [0280] 인간 계놈은 두 개의 기능적 T-세포 수용체 베타 체인들 (TRBC1 및 TRBC2)을 포함한다. 알파/베타 T 림프구들의 발달 동안, 이들 두 불변 체인들 중 하나가 TCR-베타의 가변 영역으로 슬라이스되기 위하여 각 세포에서 선택되고 기능적 전장 베타 체인을 형성한다. 2 TRBC 타겟들이 TRBC1 및 TRBC2 사이에서 보존된 서열들에서 선택되어, 대응하는 TALE-뉴클레아제가 동시에 TRBC1 및 TRBC2 둘 다를 절단할 것이었다.
- [0281] 인간 TCR 유전자들이 WO WO2013176915에 교시된 대로 동종이계 면역 세포들에서 붕괴될 수 있음에도 불구하고, 본 발명은 이러한 불활성화가 전술한 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드의 전위성(ectopic) 발현 및 자가/비-자가 인식 유전자들의 앞서 말한 불활성화 중 임의의 것과 결합될 때의 상황을 포함한다.
- [0282] 하기 표 7은 5 TRAC 및 2 TRBC 타겟들에 대한 뉴클레오파이드 서열들 및 그것들의 대응하는 왼쪽 및 오른쪽 TALEN을 나타낸다. 추가의 서열들은 출원 WO2014/184741 and WO2014/184744에서 찾을 수 있다.

## 표 7

타겟	타겟 서열	반 TALE-뉴클레아제
TRAC_T00	TGATCCTCTTGTCCCCACAGATATCC  Agaaccctgaccctg	TRAC_T00-L TALEN (서열번호: 52)
	CCGTGTACCAGCTGAGAGA  (SEQ ID NO 51)	TRAC_T00-R TALEN (서열번호: 53)
TRAC_T01	TTGTCCCACAGATATCC  Agaaccctgaccctg	TRAC_T01-L TALEN (서열번호: 55)
	CCGTGTACCAGCTGAGA (서열번호: 54)	TRAC_T01-R TALEN (서열번호: 56)
TRAC_T02	TTTAGAAAGTTCCCTGTG  atgtcaagctggtcg  AGAAAAGCTTGAAACA (서열번호: 57)	
TRAC_T03	TCCAGTGACAAGTCTGT  ctgcctattcaccga  TTTGATTCTCAAACAA (서열번호: 58)	
TRAC_T04	TATATCACAGACAAAC  tgtgcttagacatgag  GTCTATGGACTTCAAGA (서열번호: 59)	
TRAC_T05	TGAGGTCTATGGACTTC  aagagcaacagtgct  GTGGCCTGGAGCAACAA (서열번호: 60)	
TRBC_T01	TGTGTTTGAGCCATCAG  aagcagagatctccc	TRBC_T01-L TALEN (서열번호: 62)
	ACACCCAAAAGGCCACA (서열번호: 61)	TRBC_T01-R TALEN (서열번호: 63)
TRBC_T02	TTCCCACCCGAGGTCGC  tgtgttgagccatca	TRBC_T02-L TALEN (서열번호: 65)
	GAAGCAGAGATCTCCA (서열번호: 64)	TRBC_T02-R TALEN (서열번호: 66)

[0283]

[0284] 표 7: 인간 대응하는 유전자들에서 TALE-뉴클레아제들 타겟 부위들의 서열들 및 TRAC 및 TRBC TALE-뉴클레아제들의 기재

[0285] 단일 체인 CAR

[0286] 본 발명의 한 측면에 따라, 그 방법은 악성 또는 감염된 세포의 표면에서 발현되는 적어도 하나의 항원에 대항하여 항해지는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코드하는 뉴클레오파이드 서열을 포함하는 외인성 핵산 분자를 상기 T-세포 내로 도입하는 단계를 포함한다. 그것들은 단일-체인 또는 멀티-체인 아키텍처들에 따라 설계되었다.

[0287] 한 예에서, 키메라 항원 수용체 (CAR)는 단일-체인 CAR이다.

[0288] 선호되는 예에서, 상기 세포의 리간드-결합 도메인은 scFv이다. scFv 외 다른 결합 도메인은 또한 제한되지 않는 예들로서, 낙타과 단일-도메인 항체 단편들 또는 혈관 내피 성장 인자 폴리펩타이드 같은 수용체 리간드들, 인테그린-결합 웹타이드, 헤레구린(heregulin) 또는 an IL-13 뮤테인(mutein), 항체 결합 도메인들, 항체 초가변 루프들(loops) 또는 CDR들과 같은 림프구들의 미리 정해진 타겟팅에 사용될 수 있다.

[0289] 본 발명에 따른 scFv의 선호되는 예들로서, VH 및 VL 체인들은 서열번호 67 (CD19 항원), 서열번호 68 (CD38 항원), 서열번호 69 (CD123 항원), 서열번호 70 (CS1 항원), 서열번호 71 (BCMA 항원), 서열번호 72 (FLT-3

항원), 서열번호 73 (CD33 항원), 서열번호 74 (CD70 항원), 서열번호 75 (EGFR-3v 항원) 및 서열번호 76 (WT1 항원)와 80% 넘는 동일성, 바람직하게는 90% 넘는, 그리고 더욱 바람직하게는 95% 넘는, 항원 타겟 서열을 갖는다. 타겟되는 종양 세포들의 표면 항원들의 다른 예들은 CLL1, Hsp70, CD22, MUC16, PRAME, TSPAN10, ROR1, GD3, CT83 및 메소텔린(mesothelin)이다.

[0290] 예에 따라, 본 발명은 전술한 방법에 대한 것으로, 이때 단계 c)는 CTLA-4 면역글로불린들 및/또는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드 PD-L1 리간드의 상기 동종이계 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되는 단계 c)에 의하여 수행되고 상기 동종이계 면역 세포들은 항-CD123 키메라 항원 수용체의 발현에 의하여 추가로 변형된다.

[0291] 선호되는 예에 따라, 동종이계 면역 세포들에서 발현되는 상기 항-CD123 CAR/PD-L1 리간드/CTLA-4 Ig는 PD-1 유전자의 발현의 불활성화를 겪기 위하여 그 방법의 단계 c) 동안 더 변형된다.

[0292] a)의 상기 폴리펩타이드는 상기 세포와 리간드-결합 도메인 및 상기 막관통 도메인 사이의 스토크(stalk) 영역을 더 포함할 수 있다. 여기에서 사용되는 용어 "스토크 영역"은 일반적으로 세포와 리간드-결합 도메인에 대하여 막관통 도메인을 연결하는 기능을 하는 임의의 올리고- 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 특히 스토크 영역은 세포와 리간드-결합 도메인에 대한 더한 유연성(flexibility) 및 접근성을 제공하기 위하여 사용된다. 스토크 영역은 300 아미노산들까지, 바람직하게는 10 내지 100 아미노산들 그리고 가장 바람직하게는 25 내지 50 아미노산들을 포함할 수 있다. 스토크 영역은 CD8, CD4 또는 CD28의 세포와 영역의 모든 또는 부분으로부터, 또는 항체 불변 영역의 모든 또는 부분으로부터와 같은, 자연적으로 발생하는 분자들의 모든 또는 부분으로부터 유래될 수 있다. 대체하여, 스토크 영역은 자연적으로 발생하는 스토크 영역에 대응하는 합성 서열일 수 있고, 또는 완전히 합성인 스토크 영역일 수 있다.

[0293] 상기 폴리펩타이드는 적어도 하나의 신호-전달(transducing) 도메인을 더 포함할 수 있다. 가장 선호되는 예에서, 상기 신호-전달(transducing) 도메인은 CD28, OX40, ICOS, CD137 및 CD8로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0294] Fc ε RI 알파, 베타 및/또는 감마 체인 단편의 상기 C-말단 세포질 꼬리는 TNFR-관련(associated) 인자(Factor) 2 (TRAF2) 결합 모티프들을 더 포함한다. 가장 선호되는 예에서, Fc ε RI 알파, 베타 및/또는 감마 체인의 상기 C-말단 세포질 꼬리는 공자극(costimulatory) TNFR 맴버 패밀리의 세포질내의 꼬리에 의하여 대체된다. 공자극 TNFR 패밀리 맴버의 세포질 꼬리는 주요(major) 보존된 모티프 (P/S/A)(Q/E)E 또는 마이너한(minor) 모티프 (PXQXXD)로 구성되는 TRAF2 결합 모티프들을 포함하는데, 이때 X는 임의의 아미노산이다. TRAF 단백질들은 수용체 트리머화(trimmerization)에 대한 대응에서 많은 TNFR들의 세포내 꼬리들에 구성된다.

[0295] Fc ε RI 알파, 베타 및/또는 감마 체인의 상기 세포질내의 도메인은 (CD3 제타라고도 명명된) TCR 제타(zeta) 체인의 세포질내의 도메인에 의하여 대체된다. 또 다른 선호되는 예에서, Fc ε RI 알파, 베타 및/또는 감마 체인의 상기 세포질내의 도메인은 적어도 하나의 추가적인 면역수용체(immunoreceptor) 티로신(tyrosine)-기반의 (based) 활성화 모티프 (ITAM)을 포함한다. ITAM들은 syk/zap70 클래스 티로신 키나아제들에 대한 결합 부위들로서 작용하는 여러가지 수용체들의 세포질내의 꼬리에서 발견되는 잘 정의된 신호전달(signaling) 모티프들이다. 본 발명에서 사용되는 ITAM의 예들은 TCR제타, FCR감마, FCR베타, CD3감마, CD3델타, CD3엡실론(epsilon), CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로부터 유래되는 것들을 포함한다.

[0296] 예를 들어, 단일-체인 CAR의 예는 서열번호: 77에 의하여 묘사된다.

[0297] 선호되는 예에서, 상기 위의 CAR는 항-CD123 단일-체인 CAR, 항-CS1 단일-체인 CAR, 항-CD38 단일-체인 CAR, 항-CLL1 단일-체인 CAR, 항-Hsp70 단일-체인 CAR, 항-EGFRvIII 단일-체인 CAR, 항-BCMA 단일-체인 CAR, 항-CD33 단일-체인 CAR, 항-FLT3 단일-체인 CAR, 항-CD70 단일-체인 CAR, 항-WT1 단일-체인 CAR, 항-MUC16 단일-체인 CAR, 항-PRAME 단일-체인 CAR, 항-TSPAN10 단일-체인 CAR, 항-ROR1 단일-체인 CAR, 항-GD3 단일-체인 CAR, 항-CT83 단일-체인 CAR 및 메소텔린(mesothelin) 단일-체인 CAR로 구성되는 군으로부터 선택되는 단일-체인 CAR이고;

[0298] - 면역 세포에서 발현되는 상기 CAR는 도 24에 기재된 대로 V1, V3 또는 V5로부터 선택되는 폴리펩타이드 구조체 중 하나를 갖고;

[0299] - 상기 구조체는:

[0300] o 각각 항-CD123 mAb, 항-CS1 mAb, 항-CD38 mAb, 항-CLL1 mAb, 항-Hsp70 mAb, 항-EGFRvIII mAb, 항-BCMA mAb, 항-CD33 mAb, 항-FLT3 mAb, 항-CD70 mAb, 항-WT1 mAb, 항-MUC16 mAb, 항-PRAME mAb, 항-TSPAN10 mAb, 항-ROR1 mAb, 항-GD3 mAb, 항-CT83 mAb 및 항-메소텔린(mesothelin) mAb으로 구성되는 군으로부터 선택되는 단일클론

항체로부터의 VH 및 VL 을 포함하는 세포외 리간드 결합-도메인;

- [0301] o CD8알파, FcERIII감마 및 IgG1로 구성되는 군으로부터 선택되는 헌지;
- [0302] o CD8 α 막관통 도메인;
- [0303] o CD3 제타 신호전달(signaling) 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및;
- [0304] o 4-1BB 공-자극 도메인.

을 포함한다.

- [0306] 막관통 도메인 (즉 CD8 αTM), 공-자극 도메인 (즉 4-1BB), 헌지 (CD8알파, FcERIII감마, IgG1), 세포질 신호전달(signaling) 도메인 (ITAM CD3zeta)을 포함하는 CAR의 아키텍처에서 선택된 모든 다른 요소들은 위의 WO2015140268 및 WO2015121454 출원들에 이미 기재된 것들일 수 있다.

- [0307] 예들로서, VH 및 VL은 출원들 항-CD123에 대한 WO2015140268, 항-CS1 및 항-CD38에 대한 WO2015121454에 기재된 것들일 수 있다.

#### 멀티-체인 키메라 항원 수용체 (CAR)

- [0309] 또다른 예에서, 본 발명은 특히 본 발명의 T-세포들과 같은, 조작된 면역 세포들의 생산 및 확장에 적응된, 멀티-체인 키메라 항원 수용체 (CAR)에 대한 것이다. 하기 요소들 중 적어도 둘을 포함하는 멀티-체인 CAR:

- [0310] a) 세포외 리간드-결합 도메인 및 Fc ε RI 알파 체인의 막관통 도메인을 포함하는 하나의 폴리펩타이드,
- [0311] b) Fc ε RI 베타 체인의 막관통 도메인 및 N- 및 C-말단 세포질 꼬리의 부분을 포함하는 하나의 폴리펩타이드 및 /또는
- [0312] c) Fc ε RI 감마 체인의 막관통 도메인 및 세포질내의 꼬리의 부분을 각자 포함하여, 이로써 다른 폴리펩타이드들이 다이머, 트리머 또는 테트라머 CAR를 형성하기 위하여 자발적으로 멀티미화하는, 두 개의 폴리펩타이드들.

- [0313] 본 발명의 CAR는 또한 전술한 바와 같이, "멀티-체인 CAR들"일 수 있고, 이는 세포외 결합 도메인 및 신호전달(signaling) 도메인들이 바람직하게는 다른 폴리펩타이드 체인들 상에 위치되는 반면, 공-자극 도메인들은 동일하거나 또는 세 번째 폴리펩타이드 상에 위치될 수 있는 것을 의미한다. 이러한 멀티-체인 CAR들은 scFv와 같은 세포외 리간드-결합 도메인에 의하여 Fc ε RI 알파 체인의 높은 친화성(affinity) IgE 결합 도메인을 대체함으로써 Fc ε RI로부터 유래될 수 있는 반면 (Ravetch et al, 1989), Fc ε RI 베타 및/또는 감마 체인들의 N 및/또는 C-말단 꼬리들은 각각 신호 전달(transducing) 도메인들 및 공-자극 도메인들에 융합된다. 세포외 리간드 결합 도메인은 세포 타겟들을 향한 T-세포 특이성의 방향전환의 역할을 갖는 반면, 신호 전달(transducing) 도메인들은 면역 세포 반응을 활성화시키거나 또는 감소시킨다. Fc ε RI로부터의 알파, 베타 및 감마 폴리펩타이드들로부터 유래되는 다른 다른 폴리펩타이드들이 막인접(juxtapamembrane) 위치에 있는 막관통 폴리펩타이드라는 사실은 CAR들에 더 유연한 아키텍처를 제공하고, 이는 면역 세포들의 배경 활성화를 감소시키고, 타겟인 분자를 향한 특이성을 개선시킨다. 멀티-체인 아키텍처들은 더욱 특히 WO2014039523에 개시되어 있다.

- [0314] 또다른 예에서, 앞서 기재된 대로 면역 세포에서 발현되는 상기 CAR는 항-CD123 멀티-체인 CAR, 항-CS1 멀티-체인 CAR, 항-CD38 멀티-체인 CAR, 항-CLL1 멀티-체인 CAR 또는 항-Hsp70 멀티-체인 CAR로 구성되는 군에서 선택된다.

- [0315] 또다른 선호되는 예에서, 상기 위의 CAR는 항-CD123 멀티-체인 CAR, 항-CS1 멀티-체인 CAR, 항-CD38 멀티-체인 CAR, 항-CLL1 멀티-체인 CAR, 항-Hsp70 멀티-체인 CAR, 항-EGFRVIII 멀티-체인 CAR, 항-BCMA 멀티-체인 CAR, 항-CD33 멀티-체인 CAR, 항-FLT3 멀티-체인 CAR, 항-CD70 멀티-체인 CAR, 항-WT1 멀티-체인 CAR, 항-MUC16 멀티-체인 CAR, 항-PRAME 멀티-체인 CAR, 항-TSPAN10 멀티-체인 CAR, 항-ROR1 멀티-체인 CAR, 항-GD3 멀티-체인 CAR, 항-CT83 멀티-체인 CAR 및 메소텔린 멀티-체인 CAR로 구성되는 군으로부터 선택되는 멀티-체인 CAR이다.

- [0316] 이러한 멀티-체인 CAR는 참고로서 여기에 포함되는 WO2014/039523, 특히 도 2 내지 4, 그리고 14 내지 21 페이지들에 개시되어 있다.

- [0317]

- [0318] 여기에서 사용되는 용어 "의 부분"은 더 짧은 폴리펩타이드인 분자의 임의의 서브셋(subset)을 가리킨다. 대체하여 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 기능적 변종들은 폴리펩타이드를 코드하는 DNA에서 돌연변이에 의하여 제조될

수 있다. 이러한 기능적 변종들은, 예컨대, 아미노산 서열 내 잔기들로부터의 결실, 또는 삽입 또는 치환을 포함한다. 특히 특이적 항-타겟 세포 면역 활성을 보이기 위하여, 최종 구조체가 원하는 활성을 보유한다면, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합은 또한 최종 구조체에 도달하기 위하여 만들어질 수 있다.

[0319] 또한 본 발명의 범위에 본 발명에 따른 전술한 멀티-체인 CAR를 코드하는 폴리뉴클레오타이드들, 벡터들이 포함된다.

[0320] 특정 예에서, 본 발명은 상기 멀티-체인 CAR를 이루는 다른 폴리펩타이드들을 상기 T-세포들 내로 도입하는 단계 및 상기 세포들을 확장시키는 단계를 포함하는 면역요법을 위한 T-세포들과 같은 면역 세포들을 준비하는 방법에 대한 것이다.

[0321] 본 발명은 또한 세포들을 조작하기 위하여 상기 방법에 의하여 수득되기 쉬운 분리된 세포들 또는 세포주들에 대한 것이다. 특히 상기 분리된 세포는 상기 멀티-체인 CAR를 이루는 폴리펩타이드들을 코드하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 서열들을 포함한다.

#### 이중특이적(bispecific) 항체들

[0323] 추가의 예에 따라, 전술한 대로 다른 방법들에 의하여 수득되는 T 세포들과 같은 조작된 면역 세포들이 이중특이적 항체들로 더 노출될 수 있다. 상기 T-세포들은 생체 내에서 또는 환자에게 투여 전에 엑스 비보(ex vivo)에서 이중특이적 항체들에 노출될 수 있었다. 상기 이중특이적 항체들은 구별되는 항원 물성들을 가진 두 개의 가변 영역들을 포함하는데, 이는 타겟 항원에 가깝게 조작된 세포들을 가져가는 것을 가능하게 한다. 제한되지 않는 예로서, 상기 이중특이적 항체는 CD3와 같은 립프구 항원 및 종양 마커에 대항하여 향해지고, 종양들에 대항하여 임의의 순환 T 세포들을 다시 향하게 하고 활성화시키는 잠재력을 갖는다.

#### 전달 방법들

[0325] 전술한 다른 방법들은 세포 내로 선택적으로, 외인성 핵산 또는 DNA-말단 가공 효소로, pT알파(alpha) 또는 그 것의 기능적 변종들, 희귀 절단 엔도뉴클레아제, TALE-뉴클레아제, CAR 또는 멀티-체인 CAR를 도입하는 단계를 수반한다.

[0326] 제한되지 않는 예로서, 선택적으로 DNA-말단 가공 효소 또는 외인성 핵산으로 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드, CAR 또는 멀티-체인 CAR를 코드하는 유전자, TALE-뉴클레아제들, 희귀 절단 엔도뉴클레아제들이 하나에 의하여 또는 다른 다른 플라스미드 벡터들로서 코드되는 이식유전자들로서 도입될 수 있다. 다른 이식유전자들이 2A 웨პ타이드를 코드하는 서열과 같은 라이보좀 스킵 서열을 코드하는 핵산 서열을 포함하는 하나의 벡터 내에 포함될 수 있다. 피코르나바이러스들(picornaviruses)의 아프토바이러스(Aphthovirus) 서브그룹(subgroup)에서 확인된 2A 웨პ타이드들은 코돈들에 의하여 코드되는 두 아미노산들 사이의 웨პ타이드 결합의 형성 없이 하나의 코돈으로서 옆으로 라이보좀 "스킵"을 야기한다 (Donnelly et al., J. of General Virology 82: 1013-1025 (2001); Donnelly et al., J. of Gen. Virology 78: 13-21 (1997); Doronina et al., Mol. And. Cell. Biology 28(13): 4227-4239 (2008); Atkins et al., RNA 13: 803-810 (2007) 참조). "코돈"에 의하여 하나의 아미노산 잔기 내로 라이보좀에 의하여 번역되는 mRNA (또는 DNA 분자의 센스 가닥) 상 세 개의 뉴클레오타이드들이 의미된다. 그러므로, 폴리펩타이드들이 프레임이 완성된(in frame) 2A 올리고펩타이드 서열에 의하여 분리될 때, 두 개의 폴리펩타이드들이 mRNA 내 단일, 근접한 오픈 리딩 프레임 프레임으로부터 합성될 수 있다. 이러한 라이보좀 스킵 메커니즘들은 당업계에 잘 알려져 있고 단일 메신저 RNA에 의하여 코드되는 몇몇 단백질들의 발현을 위하여 몇몇 벡터들에 의하여 사용되는 것으로 알려져 있다. 본 발명에서, 제한되지 않는 예로서, 2A 웨პ타이드들은 멀티-체인 CAR의 다른 폴리펩타이드들 또는 DNA 말단-가공 효소 및 희귀-절단 엔도뉴클레아제를 세포 내에서 발현시키기 위하여 사용된다.

[0327] 상기 플라스미드 벡터는 상기 벡터를 받은 세포들의 확인 및/또는 선택을 위하여 제공되는 선택 마커를 포함할 수 있다.

[0328] 폴리펩타이드들은 세포 내로 상기 폴리펩타이드들을 코드하는 폴리뉴클레오타이드들의 도입의 결과로서 세포에서 인 시추(*in situ*)로 합성될 수 있다. 대체하여, 상기 폴리펩타이드들은 세포 밖에서 생산되고 그 다음에 거기로 도입될 수 있었다. 동물 세포들 내로 폴리뉴클레오타이드 구조체(construct)을 도입하는 방법들은 업계에 알려져 있으며, 제한되지 않는 예들로, 폴리뉴클레오타이드 구조체가 세포의 계놈 내로 통합되는 안정적인 형질전환(transformation) 방법들, 폴리뉴클레오타이드 구조체가 세포 계놈 내로 통합되지 않는 일시적인 형질전환(transformation) 방법 및 바이러스 매개 방법들을 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드들은 예를 들어, 재조합 바이러스 벡터들 (예컨대 레트로바이러스들, 아데노바이러스들), 리포좀(liposome) 등에 의하여 세포 내로 도입

될 수 있다. 예를 들어, 일시적 형질전환 방법들은 미세주입, 전기천공법 또는 입자 총을 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드들은 백터들, 더욱 특히 세포들에서 발현되는 관점에서 플라스미드들 또는 바이러스 내 포함될 수 있다.

[0329] - 전기천공

[0330] 본 발명에 따른 폴리펩타이드들을 코드하는 폴리뉴클레오타이드들은 예컨대 전기천공에 의하여 세포들 내로 직접적으로 도입되는 mRNA일 수 있다. 본 발명자들은 T-세포에서 mRNA 전기천공을 위한 최적의 조건을 결정하였다.

[0331] 본 발명자는 세포들 내로 물질의 전달을 위하여 살아있는 세포들을 일시적으로 투과성으로 만드는 것을, 펄스된 (pulsed) 전기장들의 이용에 의하여, 가능하게 하는 사이토펄스(cytoPulse) 기술을 사용하였다. PulseAgile (Celllectis property)의 이용에 기초한 그 기술, 전기천공 패형들은 펄스 기간(duration), 강도와 더불어 펄스들 간의 간격(interval)의 자세한 통제를 허락한다 (U.S. patent 6,010,613 및 International PCT application WO2004083379). 이들 파라미터들 모두는 최소 치사율(mortality)로 높은 형질주입(transfection) 효율을 위한 최고의 조건들에 도달하기 위하여 변형될 수 있다. 기본적으로, 첫 번째 높은 전기장 펄스들은 포어(pore) 형성을 가능하게 하는 반면, 그 다음의 더 낮은 전기장 펄스들은 세포 내로 폴리뉴클레오타이드를 읽기는 것을 가능하게 한다. 본 발명의 한 측면에서, 본 발명자는 T 세포들에서 다른 종류의 단백질들을 일시적으로 발현시키기 위한 전기천공 프로토콜의 사용, 및 T 세포들에서 mRNA의 >95% 형질주입 효율의 달성을 이끄는 단계들을 기재한다. 특히 본 발명은 RNA와 상기 T 세포를 접촉시키는 단계 및 하기로 구성되는 아질(agile) 펄스(pulse) 서열을 T 세포에 적용하는 단계를 포함하는, T 세포 형질전환(transforming) 방법에 대한 것이다;

[0332] (a) 단계 (a) 및 (b)의 전기적 펄스들 사이의 0.2 내지 10 ms의 펄스 간격 및 0.1 ms의 펄스 폭(width), 센티미터 당 2250 부터 3000 V까지인 전압 범위를 갖는 하나의 전기적 펄스(pulse);

[0333] (b) 단계 (c)의 첫 번째 전기적 펄스 및 단계 (b)의 전기적 펄스 사이의 펄스 간격 of 100 ms 및 펄스 폭 100 ms을 갖는 전압 범위 2250부터 3000 V까지를 갖는 하나의 전기적 펄스; 및

[0334] (c) 4 전기적 펄스들 각각의 사이의 펄스 간격 2 ms 및 펄스 폭 0.2 ms를 갖는 전압 325 V를 갖는 4 전기적 펄스들.

[0335] T 세포를 형질전환(transforming)시키는 방법은 상기 T 세포를 RNA와 접촉시키는 단계 및 하기로 구성되는 아질 펄스 서열을 T 세포에 적용하는 단계를 포함할 수 있다:

[0336] (a) 단계 (a) 및 (b)의 전기적 펄스들 사이의 펄스 간격 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 ms 및 펄스 폭 of 0.1 ms, 센티미터 당 전압 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 또는 3000V인 전압을 갖는 하나의 전기적 펄스;

[0337] (b) 단계 (b)의 전기적 펄스 및 단계 (c)의 첫 번째 전기적 펄스 사이의 펄스 간격 100 ms 및 펄스 폭 100 ms를 갖고 2250, of 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 또는 3000V로부터의 전압 범위를 갖는 하나의 전기적 펄스; 및

[0338] (c) 4 전기적 펄스들 각각 사이의 펄스 간격 2 ms 및 펄스 폭 0.2 ms 을 갖고 전압 325 V를 갖는 4 전기적 펄스들.

[0339] 상기 기재된 값 범위 내 포함되는 임의의 값들이 본 출원에 개시된다. 전기천공 배지(medium)는 당업계에 알려진 임의의 적합한 배지일 수 있다. 바람직하게는, 전기천공 배지는 0.01 내지 1.0 밀리지멘스(milliSiemens)에 걸치는 범위에서 전도성을 갖는다.

[0340] 제한되지 않는 예들로서, 상기 RNA는 희귀-절단 엔도뉴클레아제, 반(Half)-TALE-뉴클레아제와 같은 희귀-절단 엔도뉴클레아제의 하나의 모노머, 키메라 항원 수용체, 멀티-체인 키메라 항원 수용체의 적어도 하나의 요소, 외인성 핵산, 하나의 추가적 촉매적 도메인을 코드한다.

[0341] **면역 세포들의 활성화 및 확장**

[0342] T-세포들과 같은 면역 세포들의 유전적 변형 전 또는 후에, 면역 세포들은 예를 들어 U.S. 특허들 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; 및 U.S. 특허 출원 공개 No. 20060121005에 기재된 대로 방법들을 이용하여 일반적으로 활성화되고 확장될 수 있다. T-세포들은 인 비트로

또는 인 비보에서 확장될 수 있다.

[0343] 일반적으로, 본 발명의 T 세포들은 거기에 T 세포들의 표면 상에서 공-자극 분자를 자극하는 리간드 및 신호와 관련된 CD3 TCR 복합체를 자극하는 제제가 부착되는 표면과의 접촉에 의하여 확장된다.

[0344] 특히, T-세포 군집들(populations)과 같은 면역 세포들은 항-CD3 항체 또는 그것의 항원-결합 단편과의 접촉에 의한 것과 같이 인 비트로로, 또는 표면에 고정된 항-CD2 항체, 또는 칼슘 이노포어와 함께 단백질 키나아제 C 활성화제(activator) (예컨대, 브리오스타틴(bryostatin))과의 접촉에 의하여, 자극될 수 있다. T-세포들의 표면에서 악세서리(accessory) 분자의 공-자극을 위하여, 악세서리 분자에 결합되는 리간드가 사용된다. 예를 들어, 면역 세포들의 군집은 면역 세포들의 증식을 자극하기에 적합한 조건들 하, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. CD4+ T 세포들 또는 CD8+ T 세포들의 증식을 자극하기 위한, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체. 예를 들어, 각 신호를 제공하는 제제들은 용액이거나 또는 표면에 커플링될 수 있다. 당업자가 쉽게 이해하듯이, 입자들의 세포들에 대한 비율은 타겟 세포에 대한 상대적인 입자 크기에 의존할 수 있다. 본 발명의 추가의 예에서, T 세포들과 같은 세포들은 제제-코팅된 비드들과 결합하고, 비드들 및 세포들은 그 뒤에 분리되며, 그 다음에 세포들이 배양된다. 대체의 예에서, 배양 전, 제제-코팅된 비드들 및 세포들은 분리되지 않고 함께 배양된다. 세포 표면 단백질들은 거기에 항-CD3 및 항-CD28이 부착되는 (3x28 비드들) 상자성 비드들이 T 세포들과 접촉하게 함으로써 라이게이트(ligate)될 수 있다. 한 예에서 세포들 (예컨대, 4 내지 10 T 세포들) 및 비드들 (예컨대, 1:1의 비율의 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드들)이 버퍼, 바람직하게는 (칼슘 및 마그네슘과 같은 이가 양이온들이 없는) PBS에서 결합된다. 다시, 당업자들은 임의의 세포 농도가 사용될 수 있다는 것을 쉽게 인식할 수 있다. 그 혼합물은 몇 시간 (약 3 시간) 내지 약 14일 또는 그 사이의 임의의 시간 정수 동안 배양될 수 있다. 또 다른 예에서, 그 혼합물은 21일 동안 배양될 수 있다. T 세포 배양에 적합한 조건들은 혈청 (예컨대, 소태아 또는 인간 혈청), 인터루킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN-g, IL-4, IL-7, GM-CSF, -10, -2, IL-15, TGFp, 및 TNF- 또는 당업자에게 알려진 세포들의 성장을 위한 다른 임의의 첨가제들을 포함하는, 증식 및 생존 능력에 필요한 인자들을 포함할 수 있는, 적합한 배지(예컨대, 최소(Minimal) 필수(Essential) 배지 (Media) 또는 RPMI Media 1640 또는, X-vivo 5, (Lonza))를 포함한다. 세포들의 성장을 위한 다른 첨가제들은 계면활성제, 플라스마네이트(plasmanate) 및 N-아세틸-시스테인(cysteine) 및 2-머캅토에탄올(mercaptoethanol)과 같은 환원제들을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 배지는 RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 1, 및 X-Vivo 20, 및 첨가된 아미노산들과 함께, Optimizer, 나트륨(sodium) 피루비아이트(pyruvate) 및 비타민들, 혈청-없이, 또는 적합한 양의 혈청(또는 혈장)이 보충되어, 또는 호르몬들의 정의된 세트, 및/또는 T-세포들의 성장 및 확장에 충분한 양의 사이토카인(들)을 포함할 수 있다. 예컨대, 폐니실린 및 스트렙토마이신과 같은 항생제들이 실험 배양에만 포함되고, 대상에 주입되는 세포들의 배양에는 포함되지 않는다. 타겟 세포들은 성장을 지지하는데 필요한 조건들, 예컨대, 적당한 온도 (즉, 37 °C) 및 대기 (즉, 공기 플러스 5% CO<sub>2</sub>) 하 유지된다. 여러가지 자극 시간들에 노출되어 온 T 세포들과 같은 면역 세포들은 다른 특성을 보일 수 있다.

[0345] 또 다른 특정 예에서, 상기 세포들은 조직 또는 세포들과 공-배양함으로써 확장될 수 있다. 상기 세포들은 또한 인 비보, 예를 들어 대상 내로 상기 세포를 투여한 후 대상의 혈액에서 확장될 수 있다.

#### 조작된 면역 세포들 및 숙주 면역 세포들과 그것들의 상호작용

[0347] 본 발명의 범위 내에는 또한 전술한 방법들 중 어느 하나에 따라 수득되는 면역 세포가 포함된다. 본 발명에 따른 상기 면역 세포는 조혈 줄기 세포로부터 유래될 수 있다. 줄기 세포들은 성체 줄기 세포들, 배아 줄기 세포들, 더욱 특히 인간이 아닌 줄기 세포들, 제대혈 줄기 세포들, 간세포들, 골수 줄기 세포들, 유도 다능성(pluripotent) 줄기 세포들, 전능(totipotent) 줄기 세포들 또는 조혈 줄기 세포들일 수 있다.

[0348] 또 다른 예에서, 상기 면역 세포들은 조혈 세포들이고, 더욱 바람직하게는 일차 세포들이다.

[0349] 선호되는 예에 따라, 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드의 접촉 후 조작된 동종이계 면역 세포들은 T 조절 세포들의 억제를 특이적으로 유도하지 않는다.

[0350] 더 선호되는 예에 따라, 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드의 접촉 후, 조작된 동종이계 면역 세포들은 CD8+ T 세포들의 억제를 특이적으로 유도한다.

[0351] 본 발명의 세포들이 확장 및 유전적 변형 전, 세포들의 소스가 제한되지 않는 여러가지 방법들을 통하여 대상으로부터 수득될 수 있다. T 세포들과 같은 면역 세포들은 말초 혈액 단핵 세포들, 골수, 럼프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수(ascites), 흉막(pleural) 삼출액(effusion), 비장(spleen) 조직, 및

종양들을 포함하는 여러가지 제한되지 않는 소스들로부터 수득될 수 있다. 당업계에 알려지고 이용가능한 임의의 수의 면역 세포주들이 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 상기 세포는 건강한 기증자로부터, 암으로 진단받은 환자로부터 또는 감염으로 진단받은 환자로부터 유래될 수 있다. 상기 세포는 다른 표현형 특성을 제시하는 세포들의 혼합된 군집의 부분이다. 본 발명의 범위에 전술한 방법에 따른 T-세포와 같은 형질전환된 면역 세포로부터 수득되는 세포주가 또한 포함된다. 면역억제 치료에 내성이고 앞의 방법에 의하여 수득되기 쉬운 변형된 세포들이 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0352] 또 다른 예에서, 본 발명에 따른 상기 분리된 세포는 TCR와 같은 자가 및 비-자가 항원 인식에 수반되는 폴리펩타이드, 클래스 I 요소의 MHC 클래스, b-2 마이크로글로불린 (B2M), TAP1 및 큰 다중기능적 프로테아제 2를 코드하는 하나의 불활성화된 내생의 유전자를 포함한다. 게다가 상기 조작된 동종이계 면역 세포들은, 적어도 하나의 분비된 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드를 발현시킴으로써, 또는 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드와 상기 면역 세포들을 배양시킴으로써, 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드와 접촉된다.

#### 치료적 적용들

[0354] 또 다른 예에서, 전술한 상기 분리된 세포부터 유래되는 세포주 또는 다른 방법들에 의하여 수득되는 분리된 세포는 의약으로 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 상기 의약은 그것을 필요로 하는 환자에게서 암 또는 감염들을 치료하는데 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 상기 분리된 세포로부터 유래되는 세포주 또는 본 발명에 따른 상기 분리된 세포는 그것을 필요로 하는 환자에게서 암 또는 바이러스 감염의 치료를 위한 제조에 사용될 수 있다.

[0355] 또 다른 측면에서, 본 발명은 그것을 필요로 하는 환자들을 치료하는 방법들에 의존하는데, 상기 방법은 하기 단계들 중 적어도 하나를 포함한다:

[0356] (a) 전술한 방법들 중 임의의 하나에 의하여 수득가능한 T-세포와 같은 면역 세포를 제공하는 단계;

[0357] (b) 상기 환자에게 T-세포들과 같은 상기 형질전환된 면역 세포를 투여하는 단계,

[0358] 한 측면에서, 본 발명의 T 세포들과 같은 상기 면역 세포는 T 세포 확장과 같은 강력한(robust) 생체 내 면역 세포를 겪고 연장된 시간 동안 지속될 수 있다.

[0359] 상기 치료는 개선, 치유 또는 예방일 수 있다. 그것은 자가 면역요법의 일부 또는 동종이계(allogeic) 면역요법 치료의 일부일 수 있다. 자가에 의하여, 환자들을 치료하는데 사용되는 세포들, 세포주 또는 세포들의 군집이 상기 환자로부터 또는 인간(Human) 백혈구(Leucocyte) 항원(Antigen) (HLA) 양립성(compatible) 기증자로부터 유래된다는 것이 의미된다. 동종이계에 의하여, 환자들을 치료하는데 사용되는 세포들, 또는 세포들의 군집이 상기 환자가 아닌 기증자로부터 유래된다는 것이 의미된다.

[0360] 본 발명은 그것이 비-동종반응성 세포들 내로, 보통 기증자로부터 수득된, T-세포들과 같은 면역 세포들의 형질전환을 가능하게 하는 한, 타생(allogenic) 면역요법에 특히 적합하다. 이것은 표준 프로토콜 하 수행되고 필요한 만큼 많이 재생산될 수 있다. 그 결과인 변형된 면역 세포들은 풀(pool)로 만들어지고 하나 이상의 환자들에게 투여되고, "기성품인" 치료적 제품으로서 이용가능하게 만들어질 수 있다.

[0361] 공개된 방법들로 사용될 수 있는 세포들은 앞의 부분에서 기재된다. 상기 치료는 암, 바이러스 감염, 자가면역 장애들 또는 이식편대숙주 질병(GvHD)으로 진단된 환자들을 치료하는데 사용될 수 있다. 치료될 수 있는 암들은 혈관이 발달된 종양들과 더불어, 혈관이 발달되지 않거나 또는 혈관이 아직 많이 발달되지 않은 종양들을 포함한다. 암들은 (혈액 종양들, 예컨대, 백혈병들 및 림프종들과 같은) 비(non) 고형 종양들을 포함할 수 있고 또는 고형 종양들을 포함할 수 있다. 본 발명의 CAR로 치료되는 타입들의 암들은 암종(carcinoma), 아세포종(blastoma), 및 육종(sarcoma), 및 특정 백혈병 또는 림프구성 악성종양들, 양성 및 악성 종양들, 및 예컨대 육종들, 암종들 및 흑색종들인 악성종양들을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 성인 종양들/암들 및 소아 종양들/암들 또한 포함된다.

[0362] 그것은 항체들 치료, 화학요법, 사이토카인들 치료, 수지상 세포 치료, 유전자 치료, 호르몬 치료, 레이저 광 치료 및 방사선 요법의 군으로부터 선택되는 암에 대항한 하나 이상의 치료들과 조합인 치료일 수 있다.

[0363] 본 발명의 바람직한 예에 따라, 상기 치료는 면역억제 치료를 겪는 환자들에게 투여될 수 있다. 정말로, 본 발명은 바람직하게는 이러한 면역억제 제제와 같은 수용체를 코드하는 유전자의 불활성화 때문에 적어도 하나의 면역억제 제제에 내성으로 만들어진, 세포들 또는 세포들의 군집에 의존한다. 이 측면에서, 면역억제 치료는 선

택 및 환자 내에서 본 발명에 따른 T-세포들의 확장을 도와야 한다.

[0364] 본 발명에 따른 세포들 또는 세포들의 군집의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 투입(transfusion), 임플란트(implantation) 또는 이식(transplantation)을 포함하는, 임의의 종래 방식으로 수행될 수 있다. 여기에서 기재된 조성물들은 환자에게 피하로, 피내로, 종양내로, 절내로(intranodally), 척수내로(intramedullary), 근육내로, 정맥 또는 림프절(intralymphatic) 주사에 의하여, 또는 복강내로 환자에게 투여될 수 있다. 한 예에서, 본 발명의 세포 조성물들은 바람직하게는 정맥 주사에 의하여 투여된다.

[0365] 세포들 또는 세포들의 군집의 투여는 kg 체중 당  $10^4$ - $10^9$  세포들, 바람직하게는 그 범위 내 세포 수들의 모든 정수 값을 포함하는  $10^5$  내지  $10^6$  세포들/kg 체중의 투여로 구성될 수 있다. 세포들 또는 세포들의 군집은 하나 이상의 투여량으로 투여될 수 있다. 또 다른 예에서, 상기 효과적인 양의 세포들은 일회량으로 투여된다. 또 다른 예에서, 상기 효과적인 양의 세포들은 일정 시간의 기간 동안 한 복용량보다 많이 투여된다. 투여 타이밍은 담당 의사의 판단 내이며, 환자의 임상적 상태에 의존한다. 세포들 또는 세포들의 군집은 혈액 은행 또는 기증자와 같은, 임의의 소스로부터 수득될 수 있다. 개인의 필요들이 다른 반면, 당업계에서 특정 질병 또는 질환들에 대한 정해진 세포 타입의 효과적인 양의 최적 범위의 결정. 효과적인 양은 치료적 또는 예방적(prophylactic) 이점을 제공하는 양을 의미한다. 투여되는 복용량은 받는 사람(recipient)의 연령, 건강 및 무게, 함께 이루어지는 치료의 종류, 만약 있다면, 치료의 빈도 및 바람직한 효과의 특성에 의존할 것이다.

[0366] 또 다른 예에서, 상기 효과적인 양의 세포들 또는 그 세포들을 포함하는 조성물은 비경구로 투여된다. 상기 투여는 정맥 투여일 수 있다. 상기 투여는 종양 내로 주사에 의하여 직접적으로 이루어질 수 있다.

[0367] 본 발명의 특정 예들에서, 세포들은 항바이러스 치료, 시도포비르 및 인터루킨-2와 같은 제제들로 하는 치료, MS 환자들을 위한 나탈리지맙(natalizumab) 또는 시트라빈 (ARA-C로도 알려짐) 치료 또는 건선 환자들을 위한 에팔리즈티맙(efalizumab) 치료 또는 PML 환자들을 위한 다른 치료들을 포함하나 이에 제한되지 않는 많은 관련 치료 양식들과 함께 (예컨대, 그 전, 동시에 또는 그 후) 환자에게 투여된다. 추가의 예들에서, 본 발명의 T 세포들은 사이클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세트, 마이코페놀레이트(mycophenolate), 및 FK506, 항체들과 같은, 면역억제 제제들, 방사선, 화학요법, 또는 CAMPATH과 같은 다른 면역제거 제제들, 항-CD3 항체들 또는 다른 항체 요법들, 사이톡신, 플루다라빈, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신(rapamycin), 마이코프리에놀산(mycopienolic acid), 스테로이드들, FR901228, 사이토카인들, 및 방사선요법과 조합하여 사용될 수 있다. 이들 약물들은 칼슘 의존적 포스파타제 칼시뉴린 (사이클로스포린 및 FK506)을 억제하거나 또는 성장인자 유도된 신호전달에 중요한 p70S6 키나제 (라파마이신)을 억제한다 (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Citrr. Opin. mm n. 5:763-773, 1993). 추가의 예에서, 본 발명의 세포 조성물들은 플루다라빈과 같은 화학요법 제제들, 외부-빔 방사 요법(XRT), 사이클로포스파미드, 또는 CAMPATH 또는 OKT3와 같은 항체들을 이용한 T 세포 제거 요법, 골수 이식과 함께 (예컨대, 그 전, 동시에 또는 그 후) 환자에 투여된다. 또 다른 예에서, 본 발명의 세포 조성물들은 예컨대, 리툭산(Rituxan)인, CD20와 반응하는 제제들과 같은, B-세포 제거 요법 후 투여된다. 예를 들어, 한 예에서, 대상은 고용량 화학요법으로 표준 치료를 겪을 수 있고 뒤이어 말초혈액 줄기 세포 이식이 이어진다. 특정 예들에서, 이식 후, 대상은 본 발명의 확장된 면역 세포들의 주입을 받는다. 추가적인 예에서, 확장된 세포들은 수술 전 또는 후에 투여된다. 여기에 기재된 방법들 중 임의의 하나에 의하여 수득되는 상기 변형된 세포들은 숙주대이식편(Host versus Graft) (HvG) 거부 및 이식편대숙주(raft versus Host) 질병(Disease) (GvHD)에 대항하여 그것을 필요로 하는 환자들을 치료하기 위하여 본 발명의 특정 측면에서 사용될 수 있다; 그러므로 본 발명의 범위에는 불활성화된 TCR 알파 및/또는 TCR 베타 유전자들을 포함하는 효과적인 양의 변형된 세포들을 상기 환자에게 투여함으로써 상기 환자를 치료하는 단계를 포함하는, 숙주대이식편 (HvG) 거부 및 이식편대숙주 질병 (GvHD)에 대항하여 그것을 필요로 하는 환자들을 치료하는 방법이다.

#### 다른 정의들

- [0369] - 폴리펩타이드 서열에서 아미노산 잔기들은 한-문자 코드에 따라 여기에 설계되며, 여기에서 예를 들어, Q는 Gln 또는 글루타민(Glutamine) 잔기를 의미하고, R은 Arg 또는 알기닌(Arginine) 잔기를 의미하고 그리고 D는 Asp 또는 아스파르트산(Aspartic acid) 잔기를 의미한다.
- [0370] - 아미노산 치환은 하나의 아미노산 잔기의 또 다른 것으로의 대체를 의미하며, 예를 들어 웅타이드 서열에서 알기닌 잔기의 글루타민 잔기로의 대체는 아미노산 치환이다.
- [0371] - 뉴클레오타이드들은 하기와 같이 설계된다: 일-문자 코드가 뉴클레오사이드의 염기를 지시하는데 사용된다: a

는 아데닌, t는 티민, c는 사이토신 그리고 g는 구아닌이다. 축퇴된 뉴클레오타이드들에 대하여, r은 g 또는 a(퓨린 뉴클레오타이드들)을 나타내고, k는 g 또는 t를 나타내고, s는 g 또는 c를 나타내고, w는 a 또는 t를 나타내고, m은 a 또는 c를 나타내고, y는 t 또는 c(파리미딘 뉴클레오타이드들)를 나타내고, d는 g, a 또는 t를 나타내고, v는 g, a 또는 c를 나타내고, b는 g, t 또는 c를 나타내고, h는 a, t 또는 c를 나타내고, 그리고 n은 g, a, t 또는 c를 나타낸다.

[0372] - 여기에서 사용된 대로, "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드들"은 디옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA), 올리고뉴클레오타이드들, 폴리메라제 체인 반응 (PCR)에 의하여 만들어지는 단편들, 라이케이션, 분리 (scission), 엔도뉴클레아제 작용, 및 엑소뉴클레아제 작용 중 임의의 것에 의하여 만들어진 단편들과 같은, 뉴클레오타이드들 및/또는 폴리뉴클레오타이드들을 가리킨다. 핵산 분자들은 (DNA 및 RNA와 같은) 자연적으로-발생하는 뉴클레오타이드들, 또는 자연적으로-발생하는 뉴클레오타이드들 (예컨대, 자연적으로-발생하는 뉴클레오타이드들의 거울상이성질체 형태들), 또는 그 둘의 조합인 모노머들로 이루어질 수 있다. 변형된 뉴클레오타이드들은 당 모이어티들 및/또는 파리미딘 또는 퓨린 염기 모이어티들에서 변형을 가질 수 있다. 당 변형들은 예를 들어, 하나 이상의 하이드록실기들의 할로겐들, 알킬기들, 아민들, 및 아다이도(azido) 기들로의 대체를 포함하고, 또는 당들은 에테르 또는 에스터들과 같이 기능적일 수 있다. 게다가, 전체 당 모이어티는 아자(aza)-당들 및 카르복실 당 유사체들과 같은, 입체구조적으로 그리고 전기적으로 유사한 구조들로 대체될 수 있다. 염기 모이어티에서의 변형들의 예들은 알킬화된 퓨린들 및 파리미딘들, 아크릴화된 퓨린들 또는 파리미딘들, 또는 다른 잘 알려진 헤테로사이클릭 치환들을 포함한다. 핵산 모노머들은 포스포다이에스터 연결들 또는 이러한 연결들의 유사체들에 의하여 연결될 수 있다. 핵산들은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0373] - "DNA 타겟", "DNA 타겟 서열", "타겟 DNA 서열", "핵산 타겟 서열". "타겟 서열" 또는 "가공 부위"에 의하여 본 발명에 따른 회귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 타겟되고 가공될 수 있는 폴리뉴클레오타이드 서열이 의도된다. 이들 용어들은, 제한되지 않는 예로서, 특이적 DNA 위치, 바람직하게는 에서 계놈 위치, 그리고 또한 플라스미드들, 에피좀(episomes), 바이러스, 트랜스포존들(transposons) 또는 미토콘드리아와 같은 세포기관들에서 유전적 물질의 주요 부분에 독립적으로 존재할 수 있는 유전적 물질의 부분을 가리킨다. TALE-뉴클레아제 타겟들의 제한되지 않는 예들로서, 타겟인 계놈 서열들은 일반적으로 15-bp 스페이서에 의하여 분리된 (반(half) 타겟들이라 불리는) 두 개의 17-bp 길이 서열들로 구성된다. 반-타겟 각각은 제한되지 않는 예들로서, EF1-알파 프로모터 또는 T7 프로모터의 통제 하, 플라스미드들에서 코드된, 표 2, 7 및 11에 리스트된 TALE-뉴클레아제들의 반복들에 의하여 인식된다. 핵산 타겟 서열은 표 2 및 7에 표시된 대로 상기 타겟의 하나의 가닥의 5'에서 3'으로의 서열에 의하여 정의된다.

[0374] - 키메라 항원 수용체 (CAR)에 의하여 특이적 항-타겟 세포 면역 활성을 보이는 키메라 단백질을 만들어내는 T 세포 수용체-활성화시키는 세포내 도메인과, 원하는 항원 (예컨대, 종양 항원)에 대한 예컨대 항체-기반의 특이 성인, 타겟 세포 상에 존재하는 요소에 대항하여 결합 도메인을 결합하는 분자들이 의도된다. 일반적으로 CAR는 T 세포 항원 수용체 복합체 제타 체인 (scFvFc:  $\zeta$ )의 세포내 신호전달(signaling) 도메인에 융합되는 세포외 단일 체인 항체 (scFvFc)으로 구성되고, T 세포들에서 발현될 때, 단일클론 항체의 특이성에 기초한 항원 인식으로 방향전환하는 능력을 갖는다. 본 발명에서 사용되는 CAR의 한 예는 CD19 항원에 대항하여 향하는 CAR이고, 제한되지 않는 예로서 아미노산 서열 : 서열번호 : 6을 포함할 수 있다.

[0375] - "전달 벡터" 또는 "전달 벡터들"에 의하여 본 발명에서 필요로 하는, 제제들/화학물질들 및 분자들 (단백질들 또는 핵산들)을 세포 접촉 내로 넣기 위하여 (즉, "접촉하는") 또는 세포들 또는 세포이하(subcellular) 구획들 (compartments) (즉, "도입하는") 내로 전달하기 위하여 본 발명에서 사용될 수 있는 임의의 전달 벡터가 의도된다. 그것은 리포좀 전달 벡터들, 바이러스 전달 벡터들, 약물 전달 벡터들, 화학적 담체들, 폴리머 담체들, 리포플렉스들(ipoplexes), 폴리플렉스들(polyplexes), 텐드리머들, 마이크로버블들 (초음파 조영제들), 나노입자들, 에멀젼들 또는 다른 적절한 이동(transfer) 벡터들을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 전달 벡터들은 분자들, 화학물질들, 거대분자들 (유전자들, 단백질들), Diatos에 의하여 개발된 웹타이드들, 플라스미드들과 같은 다른 벡터들의 전달을 가능하게 한다. 이들 경우들에서, 전달 벡터들은 분자 담체들이다. "전달 벡터" 또는 "전달 벡터들"에 의하여, 형질주입을 수행하는 전달 방법들이 또한 의도된다.

[0376] - 용어들 "벡터" 또는 "벡터들"은 그것이 연결된 또 다른 핵산을 이동시킬 수 있는 핵산 분자를 가리킨다. 본 발명에서 "벡터"는 염색체, 비(non) 염색체, 반-합성 또는 합성 핵산들로 구성될 수 있는 선형 또는 원형 DNA 또는 RNA 분자, 바이러스 벡터, a 플라스미드, a RNA 벡터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바람직한 벡터들은 그것들이 연결되는 핵산들의 발현 (발현 벡터들) 및/또는 자동적인 복제 (에피솜 벡터)가 가능한 것들이다. 많

은 수의 적당한 벡터들이 당업자들에게 알려져 있고 상업적으로 이용가능하다.

[0377] 바이러스 벡터들은 예컨대, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 파보바이러스 (예컨대 아데노관련 바이러스들), 코로나바이러스, 오르소믹소바이러스(orthomyxovirus) (예컨대, 인플루엔자 바이러스)와 같은 음성 가닥 RNA 바이러스들, 랍도바이러스(rhabdovirus) (예컨대, 광견병 및 수포성 구내염(vesicular stomatitis) 바이러스), 파라믹소바이러스(paramyxovirus) (예컨대 홍역 및 쎈다이), 피코르나바이러스 및 알파바이러스와 같은 양성 가닥 RNA 바이러스들, 및 including 아데노바이러스 헤르페스바이러스 (예컨대, 헤르페스 심브리렉스 바이러스 타입들 1 및 2을 포함하는 이중 가닥 DNA 바이러스들, 앱스타인(Epstein)-바(Barr) 바이러스, 시토메갈로바이러스(cytomegalovirus)), 및 수두 바이러스 (예컨대, 우두, 계두 및 카나리아두창)을 포함한다. 다른 바이러스들은 노워크(Norwalk) 바이러스, 토가바이러스 플라비바이러스, 레오바이러스들(reo viruses), 파포바바이러스(papovavirus), 헤파드나바이러스(hepadnavirus), 및 간염 바이러스를 포함한다. 레트로바이러스들의 예들은 하기를 포함한다: 새의 백혈증 육종, 포유류 C-타입, B-타입 바이러스들, D 타입 바이러스들, HTLV-BLV 그룹, 렌티바이러스, 스푸마바이러스(spumavirus)(Coffin, J. M., Retroviridae: The viruseses and their replication, In Fundamental Virology, Third Edition, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

[0378] - "렌티바이러스 벡터"에 의하여 그것들의 상대적으로 큰 포장 용량, 감소된 면역원성 및 넓은 범위의 다른 세포 타입들에 높은 효율로 안정적으로 형질도입시킬 수 있는 그것들의 능력 때문에 유전자 전달을 위한 매우 유망한 HIV-기반의 렌티바이러스 벡터들이 의미된다. 렌티바이러스 벡터들은 생산자 세포들 내로 셋 (포장, 봉투(envelope) 및 이동) 또는 그보다 많은 플라스미드들의 일시적 형질주입(transfection) 후 보통 만들어진다. HIV처럼, 렌티바이러스 벡터들은 세포 표면 상 수용체들과 바이러스 표면 당단백질들의 상호작용을 통하여 타겟 세포에 들어간다. 들어가면, 바이러스 RNA는 바이러스 역전사효소 복합체에 의하여 매개되는, 역전사를 겪는다. 역전사 산물은 감염된 세포들의 DNA에 바이러스 통합의 기질인, 이중가닥 선형 바이러스 DNA이다. "통합하는(integrative) 렌티바이러스 벡터들 (또는 LV)"에 의하여, 제한되지 않는 예로서, 타겟 세포의 게놈에 통합될 수 있는 이렇나 벡터들이 의미된다. "통합하지 않는(non-integrative) 렌티바이러스 벡터들 (또는 NILV)"에 의하여 반대로 바이러스 인테그라제(integrase)의 작용을 통한 타겟 세포의 게놈에 통합되지 않는 효과적인 유전자 전달 벡터들이 의미된다.

[0379] - 전달 벡터들 및 벡터들은 초음파천공(sonoporation) 또는 전기천공 또는 이들 기술들의 유도체들과 같은 임의의 세포 투과화와 조합 또는 관련될 수 있다.

[0380] - 세포 또는 세포들에 의하여 임의의 진핵 살아있는 세포들, 인 비트로 배양들을 위한 이들 생물들로부터 유래되는 일차(primary) 세포들 및 세포주들이 의도된다.

[0381] - "일차(primary) 세포" 또는 "일차(primary) 세포들"에 의하여 살아있는 조직에서 직접 취해지고 (즉, 생검 물질) 인 비트로에서 성장을 위하여 확립된, 매우 적은 개체군 배가들을 겪고, 그리고, 그러므로, 연속적인 종양 형성성인(tumorigenic) 또는 인공적으로 불멸화된 세포주들에 비교하여, 그것들이 유래된 조직의 특성을 및 주된 기능적 요소들의 더 대표적인, 세포들이 의도된다.

[0382] 제한되지 않는 예로서, 세포주들은 CHO-K1 세포들; HEK293 세포들; Caco2 세포들; U2-OS 세포들; NIH 3T3 세포들; NSO 세포들; SP2 세포들; CHO-S 세포들; DG44 세포들; K-562 세포들, U-937 세포들; MRC5 세포들; IMR90 세포들; Jurkat 세포들; HepG2 세포들; HeLa 세포들; HT-1080 세포들; HCT-116 세포들; Hu-h7 세포들; Huvec 세포들; Molt 4 세포들로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0383] 이들 세포주들 모두는 본 발명의 방법에 의하여 변형되어 생산, 발현, 정성화, 검출, 관심있는 유전자 또는 단백질 연구를 위한 세포주 모델들을 제공할 수 있고; 이들 모델들은 또한 제한되지 않는 예로서 화학물질들, 바이오연료들, 치료법들 및 농업경제학들과 같은 여러가지 영역들에서 생산 및 연구에서 관심있는 생물학적으로 활성인 분자들을 스크리닝하는데 사용될 수 있다.

[0384] - "돌연변이"에 의하여 폴리뉴클레오타이드 (cDNA, 유전자) 또는 폴리펩타이드 서열에서 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯, 일곱, 여덟, 아홉, 열, 열하나, 열둘, 열셋, 열넷, 열다섯, 스몰, 스물다섯, 서른, 마흔, 쇼, 또는 그보다 많은 뉴클레오타이드들/아미노산들의 치환, 결실, 삽입이 의도된다. 돌연변이는 유전자의 서열 또는 그 것의 조절 서열을 코드하는데 영향을 미칠 수 있다. 그것은 또한 코드되는 mRNA의 구조/안정성 또는 게놈 서열의 구조체에 영향을 미칠 수 있다.

[0385] - 변종(들)"에 의하여 부모 분자의 아미노산 서열에서 적어도 하나의 잔기의 대체 또는 돌연변이에 의하여 수득

되는 폴리펩타이드 변종, 반복 변종, 변종, DNA 결합 변종, TALE-뉴클레아제 변종이 의도된다.

[0386] - "기능적 변종"에 의하여 단백질 또는 단백질 도메인의 촉매적으로 활성인 돌연변이체가 의도된다; 이러한 돌연변이체는 그것의 부모 단백질 또는 단백질 도메인에 비하여 동일한 활성 또는 추가적인 특성들, 또는 더 높은 또는 더 낮은 활성을 가질 수 있다.

[0387] - "유전자"에 의하여 특정 단백질 또는 단백질의 부분을 코드하는, 크로모좀을 따라 선형으로 배열된 DNA의 부분으로 구성된, 유전의 기본 단위가 의미된다. 유전자는 보통 프로모터, a 5' 번역되지 않는 영역, 하나 이상의 코딩 서열들 (엑손들), 선택적으로 인트론들, 3' 번역되지 않는 영역을 포함한다. 유전자는 터미네이터, 인핸서들, 및/또는 사일런서들을 더 포함할 수 있다.

[0388] - 여기에서 사용된 대로, 용어 "자리(locus)"는 크로모좀 상 DNA 서열의 (예컨대 유전자의) 특정 물리적 위치이다. 용어 "자리(locus)"는 크로모좀 상 희귀-절단 엔도뉴클레아제 타겟 서열의 특정 물리적 위치를 가리킬 수 있다. 이러한 자리는 본 발명에 따른 희귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 인식 및/또는 절단되는 타겟 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 관심있는 자리는 세포의 (즉 크로모좀에서) 유전적 물질의 주요 부분에 존재하는 핵산 서열 뿐 아니라, 제한되지 않는 예들로서, 플라스미드들, 에피좀들, 바이러스, 트랜스포존들, 또는 미토콘드리아와 같은 세포기관들에서 유전적 물질의 부분을 수식하는 것으로 이해된다.

[0389] - 용어 "엔도뉴클레아제"는 DNA 또는 RNA 분자, 바람직하게는 DNA 분자 내 핵산들 사이의 결합의 가수분해 (절단)을 촉매화할 수 있는 임의의 야생형 또는 변종 효소를 가리킨다. 엔도뉴클레아제들은 그것의 서열에 관계없이 DNA 또는 RNA 분자를 절단하는 것이 아니라, "타겟 서열들" 또는 "타겟 부위들"로도 언급되는 특이적 폴리뉴클레오타이드 서열들에서 DNA 또는 RNA 분자를 인식하고 절단한다. 엔도뉴클레아제들은 전형적으로 12 염기 쌍들 (bp) 길이보다 더 큰, 더욱 바람직하게는 14-55 bp의 폴리뉴클레오타이드 인식 부위를 가질 때, 희귀-절단 엔도뉴클레아제들로 분류될 수 있다. 희귀-절단 엔도뉴클레아제들은 정의된 자리에서 DNA 이중-가닥 손상들 (DSBs)을 유도함으로써 상당히 증가한다 (Rouet, Smih et al. 1994; Choulika, Perrin et al. 1995; Pingoud and Silva 2007). 희귀-절단 엔도뉴클레아제들은 예컨대 호밍(homing) 엔도뉴클레아제 (Paques and Duchateau 2007), FokI과 같은 제한 효소의 촉매적 도메인과 조작된 징크-핑거 도메인들의 융합으로부터 야기된 키메라 징크-핑거 뉴클레아제 (ZFN) (Porteus and Carroll 2005) 또는 화학적 엔도뉴클레아제 (Eisenschmidt, Lania et al. 2005; Arimondo, Thomas et al. 2006)일 수 있다. 화학적 엔도뉴클레아제에서, 화학적 또는 웨პ타이드적 절단자는 핵산들의 폴리머에 또는 특정 타겟 서열을 인식하는 또 다른 DNA에 콘쥬게이트되고, 이로써 특정 서열에 대한 절단 활성을 타겟팅한다. 화학적 엔도뉴클레아제들은 또한 특정 DNA 서열들에 결합하는 것으로 알려진, 오르소페난트롤린(orthophenanthroline)의 콘쥬게이트들과 같은 합성 뉴클레아제들, DNA cleaving 분자, 및 트리플렉스(triplex)-형성(forming) 올리고뉴클레오타이드들(oligonucleotides) (TFOs)을 포함한다 (Kalish and Glazer 2005). 이러한 화학적 엔도뉴클레아제들은 본 발명에 따른 용어 "엔도뉴클레알제"에 포함된다.

[0390] 희귀-절단 엔도뉴클레아제들은 예컨대 TALE-뉴클레아제들, 전사인자 유사 효과기 (TALE)로부터 유래한 DNA 결합 도메인 및 FokI 촉매적 도메인을 이용한 새로운 종류의 화학적 뉴클레아제들, 잔토모나스(Xanthomonas) 속의 식물 병원균들에 의하여 감염 공정에서 사용되는 단백질들의 패밀리일 수 있다 (Boch, Scholze et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al.). FokI-기반의 TALE-뉴클레아제 (TALE-뉴클레아제)의 기능적 배치는 근본적으로 TALE 도메인에 의하여 대체되는 징크-핑거 DNA 결합 도메인과, ZFN의 그것이다. 이와 같이, TALE-뉴클레아제에 의한 DNA 절단은 비특이적 중앙 영역의 측면의 (flanking) 두 개의 DNA 인식 영역들을 요구한다. 본 발명에서 포함되는 희귀-절단 엔도뉴클레아제들은 또한 TALE-뉴클레아제들로부터 유래될 수 있다.

[0391] 희귀-절단 엔도뉴클레아제는 메가뉴클레아제의 이름으로도 알려진 호밍 엔도뉴클레아제일 수 있다. 이러한 호밍 엔도뉴클레아제들은 당업계에 잘 알려져 있다 (Stoddard 2005). 호밍 엔도뉴클레아제들은 DNA 타겟 서열을 인식하고 단일- 또는 이중-가닥 손상을 만들어낸다. 호밍 엔도뉴클레아제들은 매우 특이적이며, 12 내지 45 염기 쌍들 (bp) 길이들로부터 범위의, 보통 14 내지 40 bp 길이로부터 범위의 DNA 타겟 부위들을 인식한다. 본 발명에 따른 호밍 엔도뉴클레아제는 예컨대 LAGLIDADG 엔도뉴클레아제에, HNH 엔도뉴클레아제에, 또는 GIY-YIG 엔도뉴클레아제에 대응될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 호밍 엔도뉴클레아제는 I-CreI 변종일 수 있다.

[0392] - "TALE-뉴클레아제(nuclease)"에 의하여 핵산 타겟 서열을 절단하기 위하여 하나의 뉴클레아제 촉매적 도메인 및 전사(Transcription) 활성인자(Activator) 유사(Like) 효과기(Effector) (TALE)로부터 보통 유래된 핵산-결합 도메인으로 구성된 융합 단백질이 의도된다. 촉매적 도메인은 바람직하게는 뉴클레아제 도메인이고 더욱 바람직하게는 예를 들어 I-TevI, ColE7, NucA 및 Fok-I와 같은 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 도메인이다. 특정 예

에서, TALE 도메인은 예를 들어 I-CreI 및 I-OnuI 또는 그것의 기능적 변종(variant)과 같은 메가뉴클레아제(meganuclease)에 융합될 수 있다. 더 바람직한 예에서, 상기 뉴클레아제는 모노머인 TALE-뉴클레아제이다. 모노머인 TALE-뉴클레아제는 WO2012138927에 기재된 I-TevI의 촉매적 도메인과 조작된 TAL 반복들(repeats)의 융합들과 같은, 특이적 인식 및 절단을 위한 다이머화를 요구하지 않는 TALE-뉴클레아제이다. 전사(Transcription) 활성인자(Activator) 유사(Like) 효과기(Effector) (TALE)은 박테리아 종 잔토모나스(Xanthomonas)로부터의 단백질로 각 반복이 핵산 타겟된 서열의 각 뉴클레오타이드 염기에 특이적인 위치 12 및 13 (RVD)에서 두(di)-잔기들을 포함하는, 다수의 반복된 서열들을 포함한다. 유사한 모듈식(modular) 염기 당 염기(base-per-base) 핵산(nucleic acid) 결합(binding) 특성들(properties) (MBBD)을 가진 결합 도메인들은 또한 다른 박테리아 종들에서 본 출원인에 의하여 최근에 발견된 새로운 모듈식 단백질들로부터 유래될 수 있다. 새로운 모듈식 단백질들은 TAL 반복들보다 더 많은 서열 변동성을 보이는 이점을 가진다. 바람직하게는, 다른 뉴클레오타이드들의 인식과 관련된 RVD들은 C의 인식을 위한 D, T의 인식을 위한 NG, A의 인식을 위한 NI, G 또는 A의 인식을 위한 NN, A, C, G 또는 T의 인식을 위한 NS, T의 인식을 위한 HG, T의 인식을 위한 IG, G의 인식을 위한 NK, C의 인식을 위한 HA, C의 인식을 위한 ND, C의 인식을 위한 HI, G의 인식을 위한 HN, G의 인식을 위한 NA, G 또는 A의 인식을 위한 SN 및 T의 인식을 위한 YG, A의 인식을 위한 TL, A 또는 G의 인식을 위한 VT 및 A의 인식을 위한 SW이다. 또 다른 예에서, 대단히 중요한 아미노산들 12 및 13은 뉴클레오타이드들 A, T, C 및 G를 향한 그것들의 특이성을 조절하기 위하여, 특히 이 특이성을 증강시키기 위하여 다른 아미노산 잔기들을 향해 돌연변이될 수 있다. TALE-뉴클레아제는 유전자 변형들 및 유전자 타겟팅을 자극하기 위하여 사용되고 이미 기재되어 왔다 (Boch, Scholze et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al.). 조작된 TAL-뉴클레아제들은 TALENTM 상표로 상업적으로 이용 가능하다 (Celllectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 Paris, France).

[0393]

- 용어 "절단"은 폴리뉴클레오타이드의 공유 백본(backbone)의 파손을 가리킨다. 절단은 인산이에스테르 결합의 효소적 또는 화학적 가수분해를 포함하나, 이에 제한되지 않는 여러가지 방법들에 의하여 개시될 수 있다. 단일-가닥 절단 및 이중-가닥 절단 둘 다 가능하며, 이중-가닥 절단은 두 개의 구별되는 단일-가닥 절단 이벤트들의 결과로서 발생할 수 있다. 이중 가닥 DNA, RNA, 또는 DNA/RNA 혼성 절단은 둥툭한 말단들 또는 엇갈린(staggered) 말단들의 생산을 야기할 수 있다.

[0394]

- "융합 단백질"에 의하여, 분리된 단백질들 또는 그것들의 부분을 원래 코드하는 두 개 이상의 유전자들의 연결로 구성되는 당업계에 잘 알려진 공정의 결과가 의도되며, 기 "융합 유전자"의 번역은 원래 단백질들의 각자로부터 유래되는 기능적 물성을 갖는 단일 폴리펩타이드를 야기한다.

[0395]

- "동일성"은 두 핵산 분자들 또는 폴리펩타이드들 사이의 서열 동일성(identity)이 가리킨다. 동일성은 비교목적으로 정렬될 수 있는 각 서열에서의 위치의 비교에 의하여 결정될 수 있다. 비교되는 서열에서의 위치가 동일 염기에 의하여 차지될 때, 그러면 분자들은 그 위치에서 동일하다. 핵산 또는 아미노산 서열들 사이에서 유사도(similarity) 또는 동일성(identity)의 정도는 핵산 서열들에 의하여 공유되는 위치들에서 동일하거나 또는 매칭되는 뉴클레오타이드들의 수의 기능이다. 여러가지 정렬 알고리즘들 및/또는 프로그램들이 두 서열들 사이의 동일성을 계산하는데 사용될 수 있고, GCG 서열 분석 패키지의 부분으로서 이용가능한 BLAST 또는 FASTA를 포함하고 (University of Wisconsin, Madison, Wis.), 예컨대, 디풀트 세팅으로 사용될 수 있다. 예컨대, 여기에 기재된 특정 폴리펩타이드들에 적어도 70%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일성을 갖고 바람직하게는 이러한 폴리펩타이드들을 코드하는 폴리뉴클레오타이드와 더불어, 대체로 동일한 기능들을 보여주는 폴리펩타이드들이 고려된다.

[0396]

- "유사도"는 둘 또는 이보다 많은 폴리펩타이드들의 아미노산 서열들 사이의 관계를 기재한다. BLASTP는 BLOSUM45, BLOSUM62 또는 BLOSUM80와 같은 유사도 매트릭스를 이용하여 참조 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 87.5%, 90%, 92.5%, 95%, 97.5%, 98%, 99% 서열 유사도를 갖는 아미노산 서열을 확인하는데 사용될 수 있다. 다르게 표시하지 않는 한, 유사도 지수는 BLOSUM62의 이용에 기초할 것이다. BLASTP이 사용될 때 퍼센트 유사도는 BLASTP 양성 지수에 기초하고 퍼센트 서열 동일성은 BLASTP 동일성들 지수에 기초한다. BLASTP "동일성들"은 동일한 지수가 높은 서열쌍들에서 총 잔기들의 부분(fraction) 및 수를 보여준다; 그리고 BLASTP "양성들"은 그것들을 위한 정렬 지수들이 서로 유사하고 양성 값들을 갖는 잔기들의 부분 및 수를 보여준다. 여기에 개시된 아미노산 서열들의 유사도의 동일성의 임의의 중간 정도 또는 동일성 또는 유사도의 이들 정도를 갖는 아미노산 서열들이 고려되고 이 공개에 포함된다. 유사한 폴리펩타이드들의 폴리뉴클레오타이드 서열들은 유전적 코드를 이용하여 도출되고 종래 수단들에 의하여 수득될 수 있다.

[0397]

- "신호(signal)-전달(transducing) 도메인" 또는 "공-자극 리간드"는 T-세포 상 동계(cognate) 공-자극 분자

에 특이적으로 결합하는 항원 제시 세포 상의 분자를 가리키며, 이로써, 예컨대, 웹타이드가 로딩된 MHC 분자와 TCR/CD3 복합체의 결합에 의하여, 제공되는 일차(primary) 신호에 추가하여, 증식 활성화, 분화 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 T 세포 반응을 매개하는 신호를 제공한다. 공-자극 리간드는 CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성(inducible) 공자극(costimulatory) 리간드(igand) (ICOS-L), 세포간(intercellular) 부착(adhesion) 분자 (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, 림포톡신(lymphotoxin) 베타 수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, Toll 리간드 수용체에 결합하는 작용제(agonist) 또는 항체 및 B7-H3에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 공-자극 리간드는 또한 그 중에서도, CD27, CD28, 4-IBB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, 특이적으로 CD83에 결합하는 리간드와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 T 세포 상에 존재하는 공-자극 분자에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다.

- [0398] "공-자극 분자"는 공-자극 리간드와 특이적으로 결합하는 T 세포 상 동계(cognate) 결합 파트너를 가리키며, 이로써 증식과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 세포에 의한 공-자극 반응을 매개한다. 공-자극 분자들은 MHC 클래스 I 분자, BTLA 및 Toll 리간드 수용체를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0399] 여기에서 사용된 "공-자극 신호"는 TCR/CD3 라이케이션과 같은 일차 신호와 결합하여, T 세포 증식 및/또는 주요(key) 분자들의 상향조절 또는 하향조절을 이끄는 신호를 가리킨다.
- [0400] -여기에서 사용된 용어 "세포외 리간드-결합 도메인"은 리간드에 결합할 수 있는 올리고- 또는 폴리웹타이드로 정의된다. 바람직하게는, 도메인은 세포 표면 분자와 상호작용할 수 있을 것이다. 예를 들어, 세포외 리간드-결합 도메인은 특정 질병 상태와 관련된 타겟 세포들 상에 세포 표면 마커로서 작용하는 리간드를 인식하도록 선택될 수 있다. 이와 같이 리간드들로서 작용할 수 있는 세포 표면 마커들은 바이러스, 박테리아 및 기생충 감염들, 자가면역 질병 및 암 세포들과 관련된 것들을 포함한다.
- [0401] 여기에서 사용된 대로 용어 "대상" 또는 "환자"는 인간이 아닌 영장류들 및 인간들을 포함하는 동물계의 모든 멤버들을 포함한다.
- [0402] 본 발명의 상기 기재된 기재는 그것을 만들고 이용하는 공정 및 방식을 제공하여, 당업자가 이를 만들고 사용하는 것을 가능하게 하는 것이며, 이 구현은 특히 원래 기재의 부분을 이루는, 첨부된 특허청구범위의 주제를 위하여, 제공된다.
- [0403] 숫자 제한 또는 범위가 여기에 기재될 때, 그 단점들(endpoints)이 포함된다. 또한 숫자 제한 또는 범위 내 모든 값들 및 하위범위들은 명백히 적혀있는 것처럼, 특이적으로 포함된다.
- [0404] 상기 기재는 당업자가 본 발명을 이용하고 만드는 것을 가능하게 하도록 제시되며, 특정 적용 및 그것의 요구들의 맥락에서 제공된다. 바람직한 예들에 대한 여러가지 변형들이 당업자에게 쉽게 분명할 것이며, 여기에 정의된 유전적 원칙들은 본 발명의 범위 및 정신에서 벗어나는 것 없이 다른 예들 및 적용들에 적용될 수 있다. 이런 식으로 이 발명은 보여지는 예들로 제한되는 것으로 의도되지 않고, 여기에 개시된 특성들 및 원칙들과 일치하는 가장 넓은 범위에 따른다.
- [0405] 이 발명에 일반적으로 기재된 것, 추가의 이해가 특정 특이적 예들을 참조로 하여 수득될 수 있는데, 이는 설명 목적을 위하여만 여기에 제공되는 것이며, 다르게 명시하지 않는 한 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0406] **실시예들**
- [0407] 본 발명자들은 HvG를 통한 동종이계 CAR T 세포들 소모(depletion)를 방지하는 세 개의 다른 전략들을 탐험할 것을 제안한다 (도 9). 실시예 1에 나타난 대로, 첫 번째 것은 CAR T 세포의 표면에서 PD-L1을 발현시키는 단계로 구성된다. 이러한 항원의 존재는 PD1/PD-L1 억제 경로를 통한 숙주 T 세포들을 억제하여, 그러므로 CAR T 세포를 향한 그것들의 세포독성 활성을 감소시킬 개연성이 있다 (도 10A). 이러한 유인 시스템 없이 그리고 그 후의 특정 기간의 시간 후, 숙주 T 세포들은 동종이계 CAR T 세포들을 공격하고 소모시킬 것으로 예상된다 (도 10B). 두 번째 전략은 CAR T 세포들을 조작하여 그것들을 IgG의 불변 영역에 융합된 CTLA4 단백질로 만들어진 키메라 구조체인, CTLA4 Ig를 분비하게 만드는 것이다. 세포외 배지에서 CTLA4의 방출은 항원 제시(presenting) 세포들 (APC)의 표면에서 노출되는 CD86/CD80에 결합하여 그것들이 CD28/CD80 또는 CD28/CD86 상호작용을 통하여 숙주 T 세포들이 활성화되는 것을 방지할 가능성이 있다. 숙주 APC 및 숙주 T 세포들 상호작용/활성화를 수반하는 HvG 반응은 도 11A에 보여지고 CTLA4의 분비를 통한 CAR T 세포 거부의 방지는 도 11B에 나타난다. 앞서 두 전략들을 결합하여 구성되는 세 번째 전략은, HvG 반응을 방지하는데 또한 사용되어 CAR T 세포들이 동종이

계 세포 입양 이동의 셋팅에서 증식하는 것을 가능하게 할 수 있다.

[0408] 하기 실시예 들 3 내지 7에서, 그것들의 생존을 연장시키고 그것들의 치료적 활성을 향상시키기 위하여, 본 발명자들은 i) UL18 and  $\beta$ 2-m (B2M-UL18)로 이루어진 키메라 단일 체인 분자의 발현 또는 ii) NKG2D 리간드들의 분비에 결합된, 특이적 TALEN을 이용하여, B2M 유전자의 불활성화를 통한 타생의(alloigenic) T 세포들을 조작함으로써 치료적 동종이계 T 세포들의 NK-세포 매개된 거부를 방지하는 방법을 기재한다. 특이성은 바이러스 감염된 세포들 또는 종양 세포들에서 정상적으로 발생하는 메커니즘에 일차 T 세포들을 적용하는데 있다. 그러므로 작용의 메커니즘은 잠재적으로 다르다: 종양 세포들에서, 발산(shedding) NKG2D 리간드들이 표면에서 그것들의 감소된 존재를 이끄는 반면, 조작된 세포들에서는 분비된 NKG2D 리간드(들)이 T 세포 표면에 여전히 잠재적으로 존재하는 몇몇 다른 NKG2D 리간드들에 대한 유인으로서 작용한다. 하기 실시예들 8 내지 11에서, 타생의(alloigenic) CAR T 세포들이 바이러스 단백질들 (막-결합 또는 분비된 웹타이드들로서 ISU 또는 FP)로부터의 면역억제 폴리웹타이드들을 발현시켜, 환자 T 세포들의 억제를 가능하게 하고, 그러므로 환자 내로 주입되는 타생의(alloigenic) CAR T 세포들의 효율적인 지속을 가능하게 하는 방법이 제시된다.

[0409] 일반적 방법들

[0410] 일차 T-세포 배양들

[0411] T 세포들은 Ficoll 밀도 기울기 배지를 이용하여 EFS (Etablissement Francais du Sang, Paris, France)에서 제공된 버피(buffy) 코트(coat) 샘플들로부터 정제되었다. PBMC 층은 회수되었고 T 세포들은 상업적으로 이용 가능한 T-세포 풍부(enrichment) 키트를 이용하여 정제되었다. 정제된 T 세포들은 비드:세포 비율 1:1에서 20ng/mL 인간 IL-2, 5% 인간, 및 다이나비드들(Dynabeads) 인간 T 활성인자 CD3/CD28로 보충된 X-VivoTM-15 배지 (Lonza)에서 활성화되었다.

[0412] scCAR mRNA 형질주입

[0413] 형질주입은 T-세포 정제 및 활성화 4일 또는 11일 후 이루어졌다. 5 백만의 세포들이 다른 scCAR 구조체들을 코드하는 mRNA 15  $\mu$ g으로 형질주입되었다. scCAR mRNA들은 3000V/cm에서 두 개의 0.1 mS 펄스들을 적용함으로써, 사이토펄스 기술을 이용하여 이루어진 T7 mRNA 폴리메라제 형질주입들을 이용하여 생산되었고 뒤이어 "사이토파레이션(Cytoporation) 버피 T" (BTX Harvard Apparatus) 최종 부피 200  $\mu$ l에서 0.4cm 캡 큐벳들에서 325V/cm에서 네 개의 0.2 mS 펄스들이 이어졌다. 세포들은 X-VivoTM-15 배지에서 즉시 희석되었고 37 °C에서 5% CO2로 배양되었다. IL-2 $\circ$  20ng/mL에서 전기천공 2 시간 후 첨가되었다.

[0414] 세포독성 분석

[0415] T-세포들이 (CD123을 발현시키는) 10,000 타겟 세포들과 함께 96-웰 플레이트들 (100,000 세포들/웰)에서, 그리고 10,000 대조군 (CD123neg) 세포들이 동일한 웰에서 배양되었다. 타겟 및 대조군 세포들은 CD123 CAR+ T-세포들과 함께 그것들을 공-배양하기 전에 형광 세포내 염료들 (CFSE 또는 Cell Trace Violet)로 표지되었다. 공-배양은 37 °C에서 5% CO2로 4 시간 동안 배양되었다. 이 배양 기간 후, 세포들은 고정가능한 생존능 염료로 표지되었고 유동세포 분석법으로 분석되었다. 각 세포 군집 (타겟 세포들 또는 CD123 대조군 세포들)의 생존능력이 결정되었고 특이적 세포 세포용해의 %가 계산되었다. 세포독성 분석들은 mRNA 형질주입 48시간 후 수행되었다.

[0416] T-세포 형질도입

[0417] 재조합 렌티바이러스 벡터들 발현으로 T-세포들의 형질도입 scCAR은 T-세포 정제/활성화 삼 일 후 수행되었다. T-세포들의 표면에서 scCAR 검출이 뮤린 IgG1 Fc 단편과 함께, 인간 CD123 단백질d1m 세포와 도메인의 융합으로 구성되는 재조합 단백질을 이용하여 이루어졌다. scCAR 분자에의 이 단백질의 결합은 단백질의 마우스 Fc 부분을 타겟팅하는 플루오로크롬(fluorochrome)-콘쥬게이트된 이차 항체로 검출되었다.

[0418] 실시예 1. 일차 T 세포들 and CAR T 세포들의 표면에서 PD-L1의 이식유전자(transgenic) 발현

[0419] 이들 실험들에서, 벡터들을 코드하는 PD-L1 (mRNA 또는 렌티바이러스)로 형질주입 또는 형질도입된, - 인간 활성화된 T 세포들 -이 세포 표면에서 PD-L1의 검출가능한 수준을 발현시킨다는 것이 보여진다.

[0420] PD-L1의 발현

[0421] 이 예는 T 세포들 또는 CAR T의 표면에서 PD-L1의 발현 및, 종양 세포들을 향한 그것들의 세포독성 활성에 대한 이러한 발현의 영향을 기재한다. 일차 T 세포들의 표면에서 PD-L1을 발현시키기 위하여, 일차 T 세포들이 버피-

코트 샘플들로부터 먼저 정제되었고, 항-CD19 CAR 도구 (pCLS23856, 서열번호 77)를 포함하는 렌티바이러스 입자에 의하여 활성화되고 형질도입되었고, 그리고 Galletto R et al. (2014) Molecular Therapy - Methods & Clinical Development 1, Article number: 14021 doi:10.1038/mtn.2014.2에 기재된 절차에 따라 형질주입되었다. 형질도입에 대하여 간단하게, 다이나비드들(Dynabeads) 인간 T 활성인자(activator) CD3/CD28에 의한 활성화 2일 후, T 세포들이 5 MOI에서 항-CD19 CAR 도구(tool)을 포함하는 렌티바이러스 입자들과 배양되었다.

#### [0422] mRNA의 형질주입

형질주입에 대하여, 그것들의 활성화 5 일 후, 5 백만의 CAR T 세포들 또는 T 세포들이 PD-L1을 코드하는 mRNA 20  $\mu$ g (pCLS27069, 서열번호 18)으로 형질주입되었다. 형질주입은 아질펄스 기술을 이용하여 수행되었다. 3,000 V/cm에서 두 개의 0.1 mS 펠스들이 적용되고 뒤이어 0.4 cm 캡 큐벳들에서 325 V/cm에서 네 개의 0.2 mS 펠스들 및 최종 부피 200  $\mu$ l의 Cytoporation 버퍼 T (BTX Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts)이 이어졌다. 세포들은 그 다음에 즉시 20 ng/ml IL-2 (최종 농도) 및 5% 인간 혈청 AB으로 보충된 X-Vivo-15 배지에서 희석되었다. 형질주입된 T 세포들이  $1 \times 10^6$ /ml에서 결국 희석되었고 추가의 특성화를 위하여 5% 인간 AB 혈청 및 20 ng/ml IL-2 (최종 농도) 및 5% CO<sup>2</sup>의 존재 하 37 °C에서 배양이 유지되었다. 형질주입 하루 후, CAR T 세포들이 그것들의 세포 표면에서 PD-L1의 발현을 특성화하고 그것들의 항 CD19 도구(tool) CAR에 의하여 타겟되는 관련된 종양 세포들을 향한 그것들의 특이적 세포독성 활성에 이러한 발현이 미치는 영향을 결정하기 위하여 회수되었다.

[0424] 우리의 결과들은 PD-L1이 PD-L1 을 코드하는 mRNA로 형질주입된 CAR T 세포에서 발현되는 반면 (>90%인 세포들이 PD-L1를 발현한다, 도 12), 가짜로(mock) 형질주입된 T 세포들 또는 CAR T 세포들에서는 발현이 검출되지 않았다는 것을 보여준다. 유사한 결과들이 형질도입되지 않은 T 세포들로도 얻어졌는데, 이는 PD-L1가 CAR T 세포들 및 T 세포들에서 성공적으로 발현된다는 것을 가리킨다 (도 12)

#### [0425] 렌티바이러스 벡터 (LV)로 형질주입

[0426] PD-L1 cDNA을 포함하는 LV 벡터가 생산되었다. 일차 T 세포들이 버퍼-코트 샘플들로부터 먼저 정제되었고, 활성화되었고, MOI 5에서 PD-L1을 포함하는 렌티바이러스 입자로 형질도입되었다 (서열번호 18의 pCLS27062). 형질도입 삼일 후, 형질도입된 T 세포들이 그것들의 세포 표면에서 PD-L1의 발현을 특성화하기 위하여 회수되었다.

[0427] 그 결과들은 PD-L1이 PD-L1 단독을 코드하는 LV 벡터로 형질도입된 T 세포에서 발현되는 반면 (>70%인 세포들이 PD-L1을 발현한다, 결과 미도시), 형질도입되지 않은 T 세포들에서는 발현이 검출되지 않았다는 것을 보여주었다.

#### [0428] 특이적 세포 세포용해

[0429] Zhao, Y. et al. (2010) Cancer Res 70, 9053-9061에 기재된 유동-기반의 분석을 이용하여 결정된 관련된 종양 세포들 (Daudi)을 향한 CAR T 세포들의 특이적 세포 세포용해 활성에 대하여, 우리의 결과들은 CAR T 세포의 표면에서 PD-L1의 재발현은 그것들의 활성에 뚜렷하게 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다 (도 13). 이 결과는 다른 혈액 기증자로부터 조작된 CAR T 세포들로도 재현가능하다 (도 13, 가짜(mock) CAR T 세포들 B 및 PD-L1 CAR T 세포들 B로 얻어진 결과들 참조).

[0430] 실시예 2 일차 T 세포들 and CAR T 세포들에 의한 아바타셉트(Abatacept) 및 벨라타셉트(Belatacept)의 이식유전자 발현 및 분비 (CTLA4 Ig)

#### [0431] 렌티바이러스 벡터 (LV)으로 mRNA의 형질주입

[0432] (각각 Orencia 및 Nulojix으로 판매되는) 아바타셉트(Abatacept) 및 벨라타셉트(belatacept)는 CTLA-4의 세포 외 도메인에 융합된 면역글로불린 IgG1의 Fc 영역으로 이루어진 융합 단백질들이다.

[0433] 이 예는 배양 배지에서 일차 T 세포들에 의한 MOI 5에서 CTLA4Ig을 포함하는 LV (서열번호 16의 pCLS27064)에 의하여 그리고 CTLA4a Ig 및 CTLA4b Ig (아바타셉트, 또는 벨라타셉트, 각각 pCLS27068 서열번호 3 및 pCLS27066, 서열번호 4)의 발현 및 분비를 기재한다. 아바타셉트는 Moreland L et al; (2006) Nature Reviews Drug Discovery 5, 185-186에 기재되어 있다. 벨라타셉트는 Larsen CP et al. (2005) "Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties". Am J Transplant. 5(3):443-53에 의하여 기재되어 있다.

[0434] ***CTLA4 a/b Ig* 발현**

일차 T 세포들에 의하여 CTLA4 Ig을 발현시키기 위하여, 일차 T 세포들이 베피-코트 샘플들로부터 먼저 정제되었고, 항-CD19 CAR 도구를 포함하는 렌티바이러스 입자로 활성화되고 형질도입되었고 (pCLS23856, 서열번호 77) 그리고 실시예 1에 기재된 절차에 따라 형질주입되었다. 형질주입과 관련하여 그것들의 활성화 5 일 후, 오백만의 CAR T 세포들 또는 T 세포들이 CTLA4a 또는 b Ig를 코드하는 mRNA 20  $\mu$ g (아바타셉트 또는 벨라타셉트 각각 pCLS27068 서열번호:16 및 pCLS27066, 서열번호:17)으로 형질주입되었고, 실시예 1에 기재된 프로토콜에 따라 배양되었다. 형질주입 하루 후, CAR T 세포들이 ELISA를 통하여 배양 배지에서 CTLA4 Ig를 분비하는 그것들의 능력을 특성화하고 타겟이 된 관련된 그리고 관련없는 종양 세포들을 향한 그것들의 특이적 세포독성 활성에 대한 이러한 발현/분비의 영향을 결정하기 위하여 회수되었다.

[0436] 우리의 결과들은 CTLA4 a 또는 b Ig을 코드하는 mRNA에 의한 일차 T 세포들의 형질주입이 배양 배지에서 대응하는 융합 단백질들이 나타나는 것을 야기하였다는 것을 보여주었다. 배양 배지에서 CTLA4 Ig의 양은 우리 실험 조건 하 각각 2.1 및 3.1 pg/mL 의 CTLA4a Ig 및 CTLA4b Ig의 최대치로 형질주입된 mRNA 양에 대략적으로 비례하였다. 예상대로 가짜(mock) 형질주입된 T 세포의 배양 배지는 어떠한 검출가능한 CTLA4 Ig 단백질도 포함하지 않았다. 이들 결과들은 CTLA4a Ig and CTLA4b Ig가 일차 T 세포들에 의하여 성공적으로 발현되었고 배양 배지에서 분비되었다는 것을 가리켰다.

[0437] **특이적 세포독성 활성**

[0438] CAR T 세포들의 활성에 대한 CTLA4 Ig의 영향을 연구하기 위하여, 관련된 그리고 관련되지 않은 종양 세포주들을 향한 그것들의 세포독성 활성이 실시예 1에 기재된 유동 기반의 분석을 이용하여 결정되었다. 우리의 결과들은 가짜(mock) 형질주입된 CAR T 세포 및 CTLA4 Ig CAR T 세포들이 Daudi 세포들을 향한 중요한 세포독성 활성을 보였다는 것을 보여주었다. 모두 함께, 이들 결과들은 일차 T 세포들이 CTLA4 Ig을 성공적으로 발현시키고 분비하는 반면 그것들의 항종양 활성을 유지한다는 것을 가리켰다.

[0439] 실시예 3. 일차 T 세포들에 의한 CTLA4 Ig 및 CTLA4 Ig /PD-L1 리간드의 이식유전자 발현 및 분비

[0440] 이 실험에서, 전술한 대로 PD-L1 및 CTLA4Ig을 코드하는 LV 벡터들로 T 세포들에 공동-형질도입된다. 도 17은 PD-L1 및 CTLA4Ig 을 코드하는 LV 벡터들로 공동 형질도입된 T 세포들에서 (평균=270 pg/  $\mu$ l) 또는 CTLA4Ig 단독을 코드하는 LV 벡터로 형질도입된 T 세포에 의한 상청액에서 (평균= 250pg/  $\mu$ l) 분비된 CTLA4 Ig의 수준을 보여주는 반면, PD-L1-형질도입된 T 세포들에서는 발현이 검출되지 않았다. 그 결과들은 PD-L1이 PD-L1 단독을 코드하는 LV 벡터로 형질도입된 T 세포에서 ((>70%인 세포들이 PD-L1을 발현시킨다, 도 17) 또는 PD-L1 및 CTLA4Ig (59%) 을 코드하는 LV 벡터들로 공동 형질도입된 T 세포들에서 발현되는 반면, 형질도입되지 않은 T 세포들 또는 CTLA4Ig-형질도입된 T 세포들에서는 발현이 검출될 수 없었다는 것을 보여주었다.

[0441] 실시예 4: 동종이계 T 세포들 반응을 테스트하기 위한 혼합된 반응 분석 (MLR)

[0442] **실험의 이유 및 프로토콜**

[0443] CAR T 세포들에 의한 PD-L1 및/또는 CTLA4Ig의 발현이 숙주 면역 체계에 대하여 영향을 갖는지 여부를 테스트하기 위하여, 기증자 1으로부터의 원래의(naive) PBMC들이 HLA-미스매치된(mismatched) 기증자 2로부터의 T 세포와 공-배양되는 시험관 내 분석이 설정되었다. 간략히, PBMC들 (기증자 1)이 CFSE로 표지되고 표지되지 않은, 마이토마이신(mitomycin)-처리된 또는 방사선조사된 조작된 T 세포들 (기증자 2)와 혼합되었는데, 이는 그것들이 증식할 수 없다는 것을 의미한다. 6일의 기간 후, 유동세포 분석법 분석이 하기 동기화(gating) 전략으로 수행된다 : FSC/SSC -> 생존가능한(viable) 세포들 -> CD3+ (기증자 1 PBMC들로부터의 T 세포들) -> CFSE. CFSE 염색의 감소는 그러므로 HLA 미스매치된 기증자 2의 T 세포들의 존재 때문에 기증자 1의 T 세포들의 동종이계 반응의 세포 분열을 보여준다.

[0444] 일련의 실험들이 도 18에서 왼쪽부터 오른쪽까지 하기와 같이 세팅되었다:

- (a) 어떠한 처리도 없이 기증자 1으로부터의 PBMC들은 단독으로 배양되었다,

- (b) 증가하는 농도의 PHA (피토헤마글루тин(PhytoHemAgglutinin)), T 세포 미토겐(mitogen))으로 처리되어온 기증자 1로부터의 PBMC들이 단독으로 배양된다;

- (c) 기증자 1으로부터의 PBMC들이 기증자 2로부터의 형질도입되지 않은 T 세포들과 공-배양된다

- [0448] - (d) 기증자 1으로부터의 PBMC들이 기증자 2로부터의 PD-L1 형질도입된 T 세포들과 공-배양된다;
- [0449] - (e) 기증자 1으로부터의 PBMC들이 기증자 2로부터의 CTLA4Ig 형질도입된 T 세포들과 공-배양된다;
- [0450] - (f) 기증자 1으로부터의 PBMC들이 기증자 2로부터의 PD-L1 and CTLA4Ig 공동-형질도입된 T 세포들과 공-배양된다.

#### [0451] 결과들

[0452] 도 18로부터, CD3+ T 세포들이 공-배양되지 않거나 (a) 또는 자가조직의(autologous) T 세포들 (c)의 존재 하 증식하지 않는 것이 나타난다. 대조군 (b)로서, 기증자 1으로부터의 PBMC들은, 예상되는 CFSE 양성 군집으로서, PHA 농도가 증가됨에 따라 감소하고 있다. CD3+ T 세포들은 동종이계 T 세포들 (c)의 존재 하 증식한다 (CFSE 양성 군집이 사라짐). 동종이계 T 세포들이 PD-L1 (d), CTLA4Ig (e) 또는 이들 둘 다 (f)를 발현하도록 조작될 때, 응답자(responder) T 세포들이 밝은 CFSE 염색을 유지하는데, 이는 조작된 T 세포들에 의한 발현 PD-L1 및 /또는 CTLA4Ig이 응답자 증식을 억제한다는 결론을 이끌어낸다. 그러므로 도 18에서 얻어진 결과들은 PD-L1, CTLA4Ig 또는 둘 다를 발현시키는 조작된 T 세포들이 실험관 내 혼합된 힘프구들 반응(reaction) (MLR) 분석에서 동종이계 T 세포들 반응을 자극하는 경향이 덜하다는 것을 보여준다. 게다가, 그 결과들은 PD-L1, CTLA4Ig 둘 다 발현될 때 누적되는 효과를 보여준다.

[0453] 실시예 5: MOLM13 타겟 세포들을 죽이는 그것들의 능력에 대한 PD-L1 및/또는 CTLA4Ig 발현시키는 항-CD123 CAR T 세포들을 테스트하는 세포독성 분석

[0454] 이 실험은 CAR 분자의 발현을 통하여 특정 타겟 세포들을 죽이는 그것들의 능력에 대한 PD-L1 및/또는 CTLA4Ig 를 발현시키는 T 세포들을 테스트하는 것을 목적으로 한다.

[0455] PD-L1 LV, CTLA4IG 또는 둘 다로 형질도입된 T 세포들은 항-CD123 CAR를 코드하는 mRNA 20 μg (서열번호 69)로 형질주입되었다. 2일의 기간 후, 세포독성 분석이 특정 타겟 세포들로서 MOLM13 세포주를 이용하여 수행된다.

[0456] 세포독성 분석들의 결과들, 도 19 and 도 20은 PD-L1, CTLA4Ig 또는 둘 다를 발현시키는, 그리고 CD123 CAR 분자를 발현시키기 위하여 추가로 조작된, 조작된 T 세포들이 특정 타겟을 죽이는 그것들의 능력을 지속하고 있다는 것을 보여준다. 게다가 이들 데이터들은 PD-L1, CTLA4Ig 또는 둘 다의 발현이 그것들의 본질적인 세포독성 활성을 증가시킨다는 것을 제안한다.

[0457] 실시예 6: 생체 내 실험들

[0458] 이들 실험들의 목적은 변형된 T 세포들이 생체 내에서 동족인(cognate) 종양 세포들을 여전히 뿌리뽑을 수 있는지 확인하는 것이다. 그러므로, 생체 내 실험이 PD-L1, CTLA4Ig 또는 둘 다의 발현이 CAR T 세포들 항-종양 활성에 영향을 미치는지 여부를 조사하도록 수행되었다 그 대략적인 프로토콜이 도 21에 보여진다.

[0459] 활성화된 T 세포들이 하기 처리군들에 대하여 얻어졌다:

- [0460] - 형질도입되지 않은 T 세포들;
- [0461] - CD123 CAR 렌티바이러스 (LV)로 형질도입된 T 세포들;
- [0462] - CD123 CAR LV 및 PD-L1 LV로 형질도입된 T 세포들;
- [0463] - CD123 CAR LV, CTLA4Ig LV로 형질도입된 T 세포들;
- [0464] - CD123 CAR LV, PD-L1 LV 및 CTLA4Ig LV로 형질도입된 T 세포들.

[0465] 형질도입 2 일 후, T 세포들이 생체 내 실험들을 위하여 G-Rex 에서 증식되었다. 19일 후, 세포들이 회수되고 계산되었다.

[0466] 도 22는 PD-L1, CTLA4Ig 또는 둘 다를 발현시키고, 나아가 CD123 CAR 분자를 발현시키도록 조작된, 조작된 T 세포들이, CAR CD123 조작된 T 세포들에 비교하여, 유사한 증식 능력을 유지한다는 것을 보여준다.

[0467] 그러므로 수득된 T 세포들이 생체 내 실험을 위하여 NOG 마우스들에 주사되었다.

[0468] 항-종양 마우스 모델

[0469] 면역결핍된 NOG 마우스들이 AML 이종이식(xenograft) 마우스 모델로서 MOLM13-루시페라제 세포들을 발현시키는 CD123)으로 정맥내 (iv) 주사되었다. 마우스들은 그 다음에 테스트되는 CD123 CAR+ T-세포들의 다른 용량으로,

CD123 CAR 렌티바이러스 벡터로 형질도입되지 않은 T-세포들로, (종양 세포주의 주입 2 또는 7일 후) iv 주사되었다. 생물발광 신호들이 다른 동물들에서 종양 진행을 추적하기 위하여 T-세포 주입된 날 (D0)에, T-세포 주입 D7 및 D14에, 결정되었다.

[0470] 도 23A 및 도 23B으로부터의 생물발광 분석 결과들은 조작된 CAR T 세포들로 주사된 모든 마우스들 군들이 대조군에 비하여 종양을 효율적으로 근절한다는 것, 그리고 생체 내에서 조작된 CAR T 세포의 명확한 항-종양 활성을 가리킨다.

[0471] 실시예 7 특이적 B2M TALEN을 이용한 효율적인 B2M 유전자 네아웃

[0472] B2M 유전자의 첫 번째 코딩 엑손 내 특이적 TALEN (GenBank accession number NC\_000015)가 생산되었다 (서열번호: 2로 왼쪽 DNA 결합 도메인 RVDs: NN-NN-HD-HD-NG-NG-NI-NN-HD-NG-NN-NG-NN-HD-NG-NG, 그리고 서열번호: 3으로 오른쪽 DNA 결합 도메인 RVDs: NI-NN-HD-HD-NG-HD-HD-NI-NN-NN-HD-HD-NI-NN-NI-NG).

[0473] B2M 자리들에서 오류 발생이 쉬운 NHEJ 이벤트들을 촉진하는 이 B2M 특이적 TALEN의 능력을 테스트하기 위하여, TALEN을 코드하는 2 또는 10  $\mu$ g의 mRNA이 제조업자의 프로토콜에 따라 펄스 아질 기술을 이용하여 일차 T 세포들에 전기천공되었다. 형질주입 삼 일 후, 세포들이 회수되었고 피코에리스린(PhycoErythrin) 플루오로크롬에 커플링된 특이적  $\beta$ 2-마이크로글로불린 항체로 표지되었다. 세포들은 그 다음에  $\beta$ 2-m 발현 및 생존 능력에 대하여 유동세포 분석법에 의하여 분석된다. 그 결과들은 도 16에 나타내어 진다. 윗 패널에서, 거의 100%의 형질주입되지 않은 T 세포들이  $\beta$ 2-m을 발현시킨다 (윗쪽 오른쪽 패널). 특이적 B2M TALEN으로 T 세포들의 형질주입은, 2  $\mu$ g 또는 10  $\mu$ g의 TALEN mRNA으로 각각 형질주입될 때 38% (중간 오른쪽) 및 80 %의 T 세포들이 (아래 오른쪽 패널)이 베타2-m 음성이 되기 때문에, 2-m 발현을 극적으로 감소시킨다. 이들 데이터들은 T 세포들에서 B2M 네아웃이 높은 약효로 달성될 수 있다는 것을 가리킨다.

[0474] 실시예 8: T 세포들에서 단일 체인 분자 B2M-UL18의 생산 및 발현.

[0475] HCMV UL18은 베타2-m와 관련되고 내생의 웨პ타이드들에 결합되는 MHC 클래스 I 분자들과 높은 수준으로 AA 서열동일성을 공유하는 타입 I 막관통 당단백질을 코드한다. 우리의 목표가 B2M 유전자가 무효화된 T 세포들에서 이분자를 발현시키는 것이기 때문에, 우리의 전략은 베타2-m 및 UL18이 단일 체인 폴리웨პ타이드로서 융합되는 키메라 분자를 생산하는 것이다. 서열번호 39는 키메라 단백질의 아미노-산 서열을 보여준다. 키메라 B2M-UL18을 포함하는 렌티바이러스 입자들이 T 세포들 내로 형질도입된다. 이식유전자의 발현은 베타2-m 항체를 이용하여 FACS 분석에 의하여 모니터링된다. 이 실험으로부터의 결과들은 B2M-UL18 키메라 단백질이 T 세포들에서 효율적으로 발현된다는 것을 보여주는 것을 목표로 한다.

[0476] 실시예 9: T 세포들에서 NKG2D 리간드들의 생산 및 발현

[0477] NKG2D 자연의(natural) 리간드들은 막관통 또는 GPI-고정된(anchored) 단백질들이다. T 세포들에 의하여 이들 분자들의 분비를 달성하기 위하여, NKG2D 리간드들의 세포외 도메인들이 분비(secretory) 웨პ타이드 형태로 그것들의 N-말단에서 융합되었다. 분비된 키메라 NKG2D 리간드들의 아미노산 서열들이 하기에 리스트된다(서열번호: 40 내지 서열번호:47). 키메라 NKG2D 리간드들을 포함하는 렌티바이러스 입자들이 T 세포들 내로 형질도입된다. 배양 상청액에서 이식유전자의 발현이 특이적 항체들을 이용하여 웨스턴 블롯 분석에 의하여 모니터링된다. 이 실험의 결과들은 키메라 NKG2D 리간드 단백질들이 T 세포들에서 효율적으로 발현된다는 것을 보여주는 것이다.

[0478] 실시예 10: 베타2-M 결핍 CAR T 세포들은 타생의(allogenic) T 세포들에 의하여 인식되지 않는다.

[0479] 건강한 기증자 A로부터의 PBMC들은 기증자 B로부터의 방사선조사된 또는 마이토마이신-처리된 조작된 베타2-m 결핍 T 세포들과 공동-배양된다. 대조군으로서, 건강한 기증자 A로부터의 PBMC들이 기증자 B로부터의 방사선조사된 또는 마이토마이신-처리된 조작된 베타2-m 양성 T 세포들과 공동-배양된다. 7일 후, 기증자 A로부터의 세포들 증식이 XTT 비색 분석에 의하여 또는 CFSE 희석 (FACS 분석)에 의하여 측정된다. 세포 증식이 대조군에서 관찰되는데도 불구하고, 세포 증식이 없거나 제한된 세포 증식이 조작된 T 세포들이 베타2-m을 발현하지 않을 때 관찰된다. 이 실험 결과들은 동종반응성 T 세포들이 베타2-m 결핍 T 세포들에 대항하여 인식하고 증식하지 못한다는 것을 보여주는 것이다.

[0480] 실시예 11: NK 매개된 조작된 T 세포들 세포용해의 효율적인 억제

[0481] NK 세포은 건강한 기증자 A PBMC들로부터 정제된다.

[0482] 타겟들로서, 건강한 기증자 B로부터의 조작된 T 세포들가 생산되고 하기와 같이 리스트된다. a) 조작된 T 세포

들 (음성 대조군), b) 베타2-m 결핍 조작된 T 세포들 (양성 대조군), c) B2M-UL18 (서열번호 39)를 발현시키는 베타2-m 결핍 조작된 T 세포들, d-k) SP-MICAed (서열번호 40), SP-MICBed (서열번호 41), SP-ULBP1ed (서열번호 42), SP-ULBP2ed (서열번호 43), SP-ULBP3ed (서열번호 44), SP-N2DL4ed (서열번호 45), SP-RET1Ged (서열번호 46), SP-RAETILed (서열번호 47)을 각각 발현시키는 베타2-m 결핍 조작된 T 세포들. NK 세포들에 의하여 매개되는 세포독성이 CFSE 표지 분석에 의하여 결정되었다. 타겟 세포들이 CFSE로 표지되었고, PBS에서 세척되었고, 여러가지 E:T 세포 비율들에서 NK 세포들과 혼합되었고, 4 시간 동안 37 °C에서 배양되었다. 세포들은 그 다음에 유동세포 분석법에 의하여 분석되고 CFSE 양성 조작된 T 세포들의 퍼센트가 측정되는데, 이는 NK 세포들의 존재 하 조작된 T 세포들의 생존을 가리킨다. NK 매개된 세포 세포용해가 양성 대조군 (베타2-m 결핍 조작된 T 세포들)에서 관찰되는데도 불구하고, 베타2-m 결핍 조작된 T 세포들 조작된 T 세포들이 B2M-UL18 (서열번호 39) 또는 분비된 NKG2D 리간드들 (SP-MICAed (서열번호 40), SP-MICBed (서열번호 41), SP-ULBP1ed (서열번호 42), SP-ULBP2ed (서열번호 43), SP-ULBP3ed (서열번호 44), SP-N2DL4ed (서열번호 45), SP-RET1Ged (서열번호 46), SP-RAETILed (서열번호 47))을 발현시킬 때, NK 매개된 세포 세포용해가 관찰되지 않거나 제한된 NK 매개된 세포 세포용해가 관찰된다는 것이 의도된다. 이 실험 결과들은 태생의(allogenic) NK 세포들 세포독성 활성이, 조작된 T 세포들에서 발현되는 키메라 분자들이 억제 신호 수용체 (B2M-UL18) 또는 자극성 신호 수용체 (NKG2D 리간드들)에 대하여 유인으로서 작용할 때. 손상된다는 것을 보여주는 것을 목표로 한다.

[0483] 실시예 12: 조작된 T 세포들에서 ISU의 발현

몰로니(Moloney) 뮤린(Murine) 백혈병(Leukemia) 바이러스(Virus) (MMLV) (서열번호 78)로부터의 외피 단백질, 분비된 14-머(mer) ISU 웨პ타이드들 (HIV-1 바이러스 서열번호 19 내지 24로부터의 6개 변종들; 각각 서열번호 32, 33, 34, 35, 36, 37, and 38인 SIV, MoMuLV, HTLV-1, MPMV, Syncitin 1, Syncitin 2, HERV-K and FELV 바이러스으로부터; HIV-2 바이러스 서열번호 25 내지 30으로부터의 6개 변종들) 또는 MMLV (서열번호 79)로부터의 외피 단백질의 막관통 끝이 잘린(truncated) 형태를 지닌 렌티바이러스 입자들이 T 세포들 내로 형질도입된다. 막 결합된 이식유전자의 발현이 FACS 분석에 의하여 모니터링되는 반면 분비된 ISU 웨პ타이드의 발현이 웨스턴 블러ট에 의하여 세포 배양 상청액에서 모니터링된다. 이 실험으로부터의 결과들은 ISU의 둘 다의 형태들이 T 세포들에서 효율적으로 발현된다는 것을 보여주는 것을 목표로 한다.

[0485] 실시예 13: 조작된 T 세포들에서 FP 웨პ타이드들의 발현

분비된 9-머(mer) FP 폴리웨პ타이드들을 지닌 렌티바이러스 입자들 (각각 서열번호 48 및 49-50의 HIV-1 바이러스로부터의 1 및 인공 서열 2)이 T 세포들 내로 형질도입된다. 분비된 FP 웨პ타이드들의 발현이 웨스턴 블러ট에 의하여 세포 배양 상청액에서 모니터링된다. 이 실험 결과들은 분비된 FP 웨პ타이드들이 T 세포들에서 효율적으로 발현되는 것을 보여주는 것을 목표로 한다.

[0487] 실시예 14: ISU를 발현시키는 조작된 T 세포들에 대한 T 세포들 증식의 효율적 억제

건강한 기증자 A로부터의 PBMC들이 기증자 B로부터의 방사선조사된 또는 마이토마이신-처리된 조작된 T 세포들과 공동-배양되어, ISU를 발현시킨다. 대조군으로서, 건강한 기증자 A로부터의 PBMC들이 ISU를 발현시키지 않는 기증자 B로부터의 방사선조사된 또는 마이토마이신-처리된 조작된 T 세포들과 공동-배양된다. 7일 후, 기증자 A로부터의 세포들 증식이 XTT 비색분석에 의하여 또는 CFSE 희석 (FACS 분석)에 의하여 측정된다. 세포 증식이 대조군에서 관찰됨에도 불구하고, 조작된 T 세포들이 막 kruft 합된 또는 분비된 ISU를 발현시킬 때, 세포 증식이 관찰되지 않거나 제한된 세포 증식이 관찰된다. 이 실험 결과들은 조작된 T 세포들이 ISU를 발현시킬 때 동종반응성 T 세포들 증식이 억제되는 것을 보여주는 것을 목표로 한다.

[0489] 실시예 15: FP를 발현시키는 조작된 T 세포들을 향한 T 세포들 증식의 효율적 억제

건강한 기증자 A로부터의 BMC들이 기증자 B로부터의 방사선조사된 또는 마이토마이신-처리된 조작된 T 세포들과 공동-배양되어, FP를 발현시킨다. 대조군으로서, 건강한 기증자 A로부터의 PBMC들이 FP를 발현시키지 않는 기증자 B의 방사선조사된 또는 마이토마이신-처리된 조작된 T 세포들과 공동-배양된다. 7일 후, 기증자 A로부터의 세포들 증식이 XTT 비색분석에 의하여 또는 CFSE 희석 (FACS 분석)에 의하여 측정된다. 세포 증식이 대조군에서 관찰됨에도 불구하고, 조작된 T 세포들이 분비된 FP를 발현시킬 때, 세포 증식이 관찰되지 않거나 제한된 세포 증식이 관찰된다. 이 실험 결과들은 조작된 T 세포들이 FP를 발현시킬 때 동종반응성 T 세포들 증식이 억제되는 것을 보여주는 것을 목표로 한다.

[0491] 명세서에서 인용된 문헌들의 리스트

[0492] 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.

[0493] 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.

[0494] Ashwell, J. D. and R. D. Klusner (1990). "Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor." *Annu Rev Immunol* 8: 139-67.

[0495] Boch, J., H. Scholze, et al. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." *Science* 326(5959): 1509-12.

[0496] 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.

[0497] 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.

[0498] 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.

[0499] 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.

[0500] Christian, M., T. Cermak, et al. (2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases." *Genetics* 186(2): 757-61.

[0501] 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.

[0502] Critchlow, S. E. and S. P. Jackson (1998). "DNA end-joining: from yeast to man." *Trends Biochem Sci* 23(10): 394-8.

[0503] Deng, D., C. Yan, et al. (2012). "Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors." *Science* 335(6069): 720-3.

[0504] Eisenschmidt, K., T. Lanio, et al. (2005). "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage." *Nucleic Acids Res* 33(22): 7039-47.

[0505] EGeissler, R., H. Scholze, et al. (2011). "Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity." *PLoS One* 6(5): e19509.

[0506] Huang, P., A. Xiao, et al. (2011). "Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs." *Nat Biotechnol* 29(8): 699-700.

[0507] Jena, B., G. Dotti, et al. (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." *Blood* 116(7): 1035-44.

[0508] Kalish, J. M. and P. M. Glazer (2005). "Targeted genome modification via triple helix formation." *Ann N Y Acad Sci* 1058: 151-61.

[0509] 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.

[0510] Li, T., S. Huang, et al. (2011). "TAL nucleases (TALENs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain." *Nucleic Acids Res* 39(1): 359-72.

[0511] 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.

[0512] 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.

[0513] 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.

[0514] 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.

[0515] 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.

[0516] Miller, J. C., S. Tan, et al. (2011). "A TALE nuclease architecture for efficient genome editing." *Nat Biotechnol* 29(2): 143-8.

[0517] 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.

[0518] Moscou, M. J. and A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." *Science* 326(5959): 1501.

[0519] 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.

[0520] 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.

[0521] Pardoll, D. and C. Drake (2012). "Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy." *J Exp Med* 209(2): 201-9.

[0522] Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* 12(4): 252-64.

[0523] Park, T. S., S. A. Rosenberg, et al. (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." *Trends Biotechnol* 29(11): 550-7.

[0524] 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)

[0525] Pingoud, A. and G. H. Silva (2007). "Precision genome surgery." *Nat Biotechnol* 25(7): 743-4.

[0526] Porteus, M. H. and D. Carroll (2005). "Gene targeting using zinc finger nucleases." *Nat Biotechnol* 23(8): 967-73.

[0527] 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.

[0528] Rong Z, Wang M, Hu Z, Stradner M, Zhu S, Kong H, Yi H, Goldrath A, Yang YG, Xu Y and Fu X. (2014). "An Effective Approach to Prevent Immune Rejection of Human ESC-Derived Allografts." *Cell Stem Cell*. 14(1):121-30.

[0529] Rouet, P., F. Smih, 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.

[0530] Sander, J. D., L. Cade, et al. (2011). "Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs." *Nat Biotechnol* 29(8): 697-8.

[0531] Stoddard, B. L. (2005). "Homing endonuclease structure and function." *Q Rev Biophys* 38(1): 49-95.

[0532] Tesson, L., C. Usal, et al. (2011). "Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs." *Nat*

Biotechnol 29(8): 695-6.

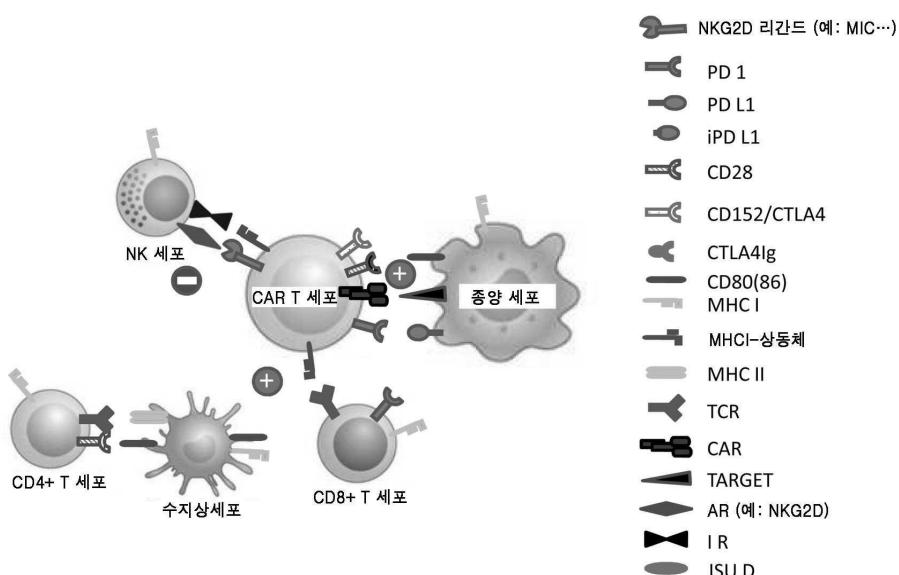
[0533] Waldmann, H. and G. Hale (2005). "CAMPATH: from concept to clinic." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 360(1461): 1707-11.

[0534] Weber, E., R. Gruetzner, et al. (2011). "Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning." PLoS One 6(5): e19722.

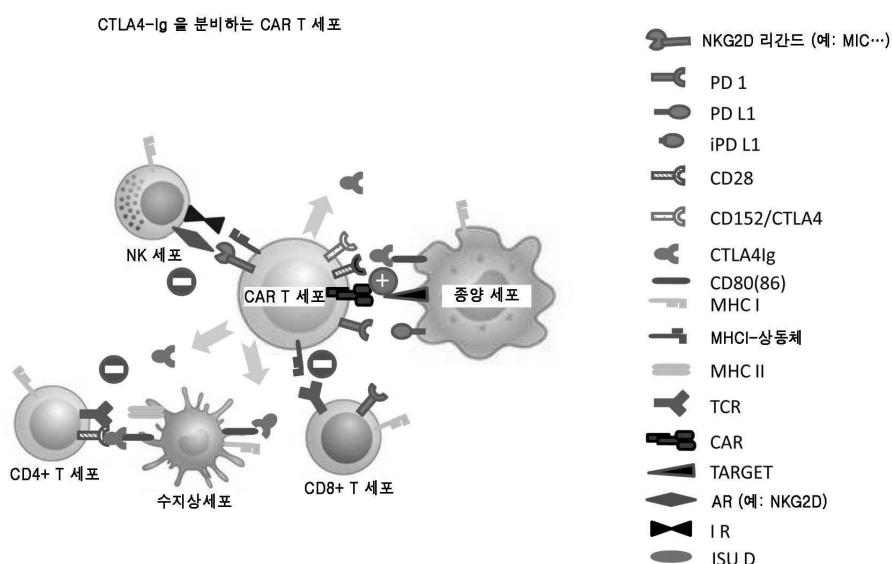
[0535] Zhang, F., L. Cong, et al. (2011). "Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription." Nat Biotechnol 29(2): 149-53.

## 도면

### 도면1

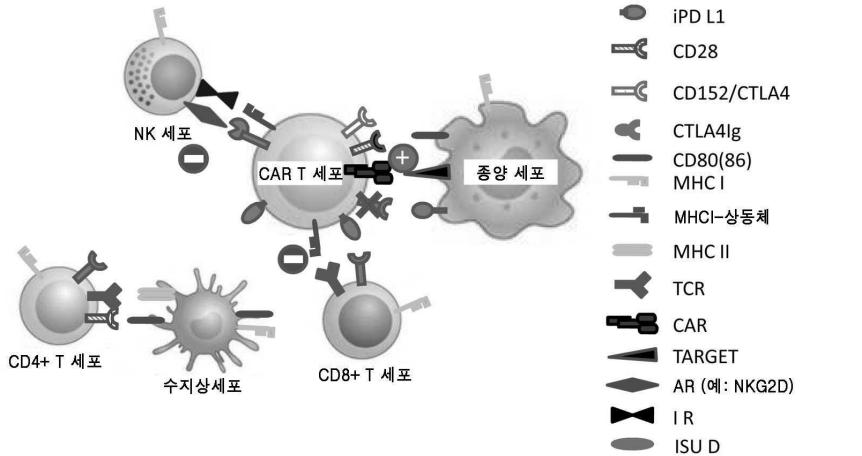


### 도면2



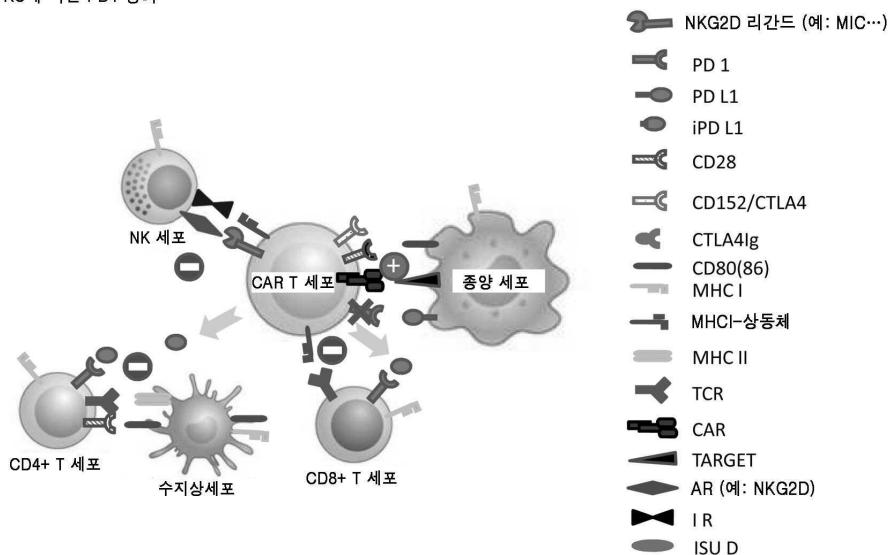
### 도면3

막-결합된 형태인 PD-L1을 발현시키는 CAR T 세포 및 KO에 의한 PD1 봉괴



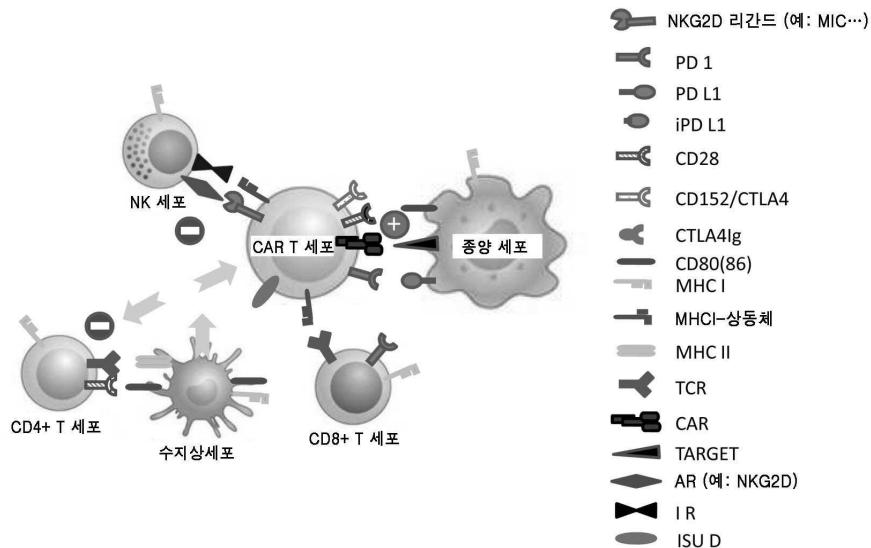
### 도면4

분비된 형태인 PD-L1을 발현시키는 CAR T 세포 및 KO에 의한 PD1 봉괴



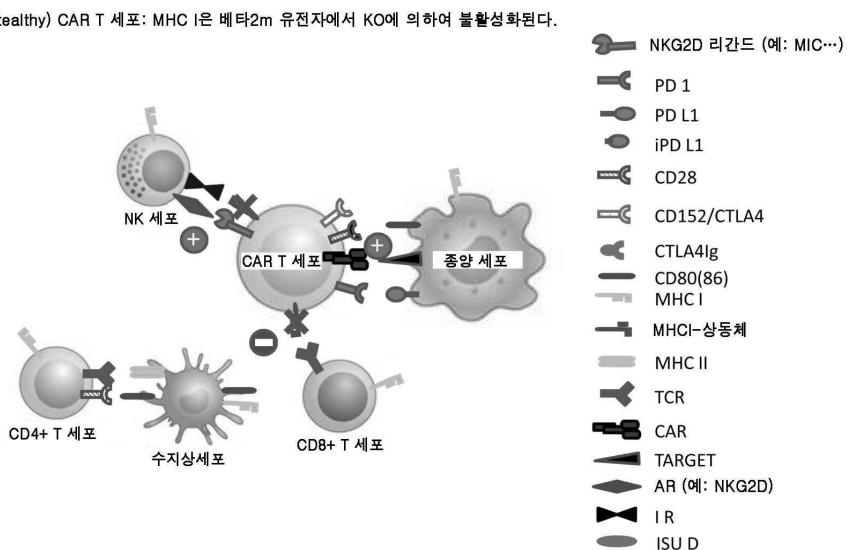
## 도면5

바이러스 외피 면역억제 도메인(ISU)를 발현시키는 CAR T 세포들

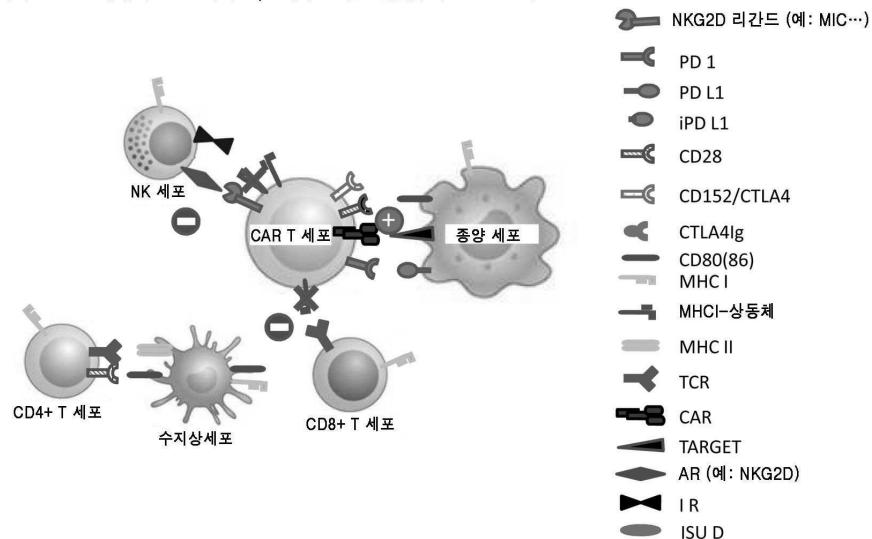


## 도면6

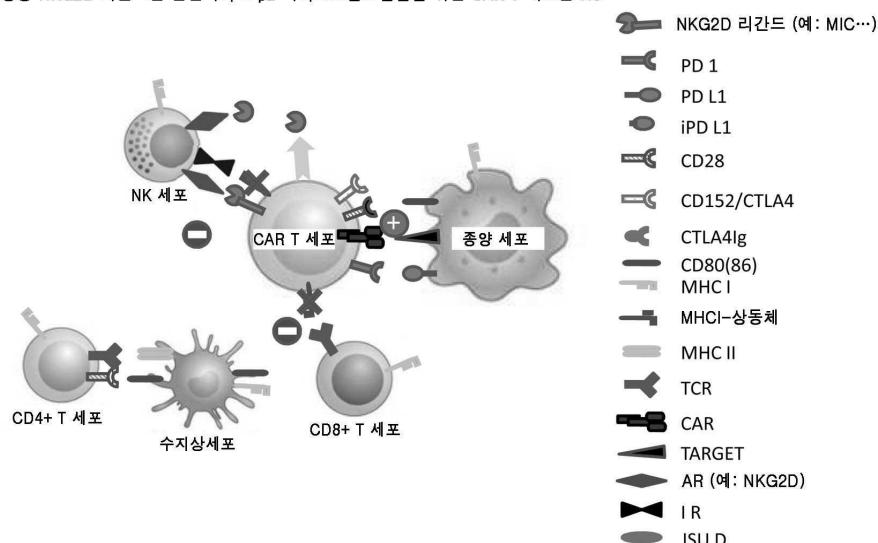
침행(steady) CAR T 세포: MHC I은 베타2m 유전자에서 KO에 의하여 불활성화된다.



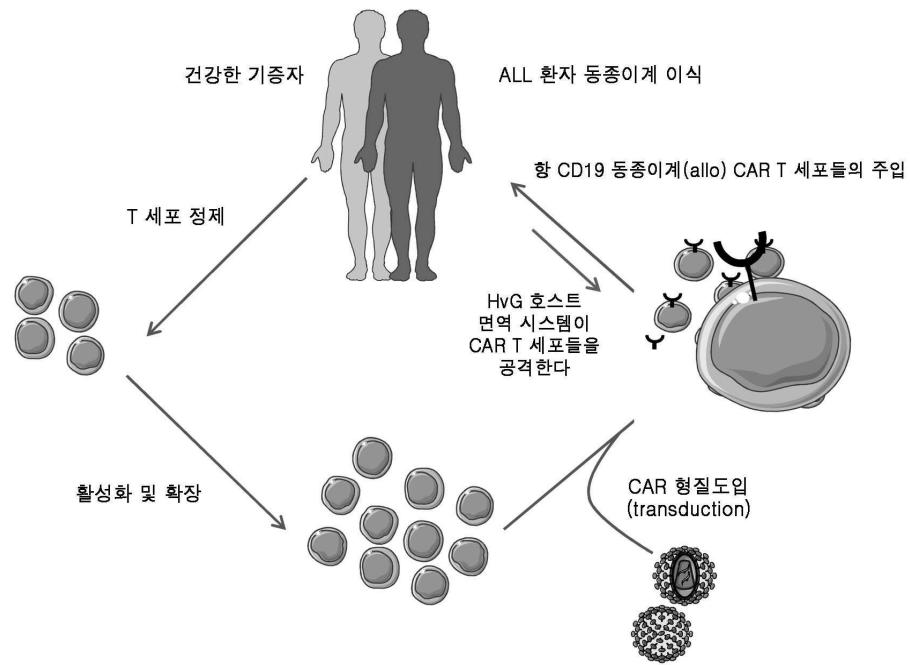
## 도면7

바이러스 MHC I 상동체를 발현시키고  $\beta$ 2 마이크로글로불린을 위한 CAR T 세포들 KO

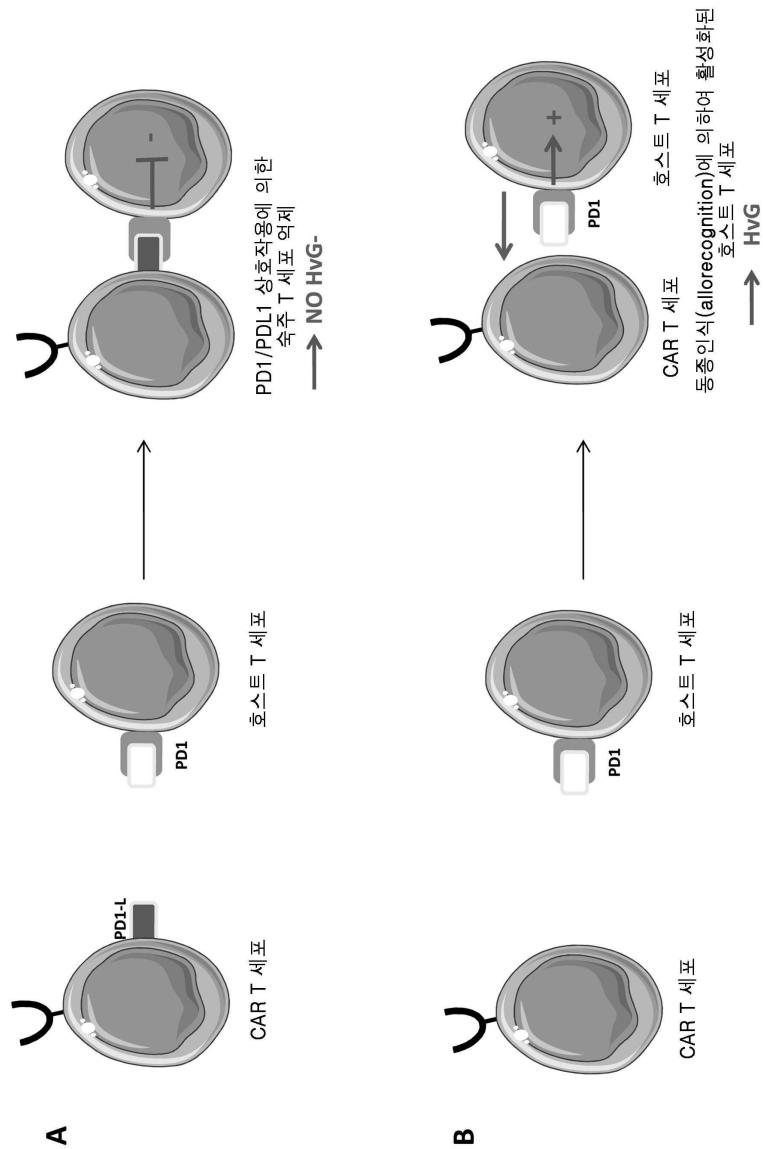
## 도면8

가용성 NKG2D 리간드를 발현시키고  $\beta$ 2 마이크로글로불린을 위한 CAR T 세포들 KO

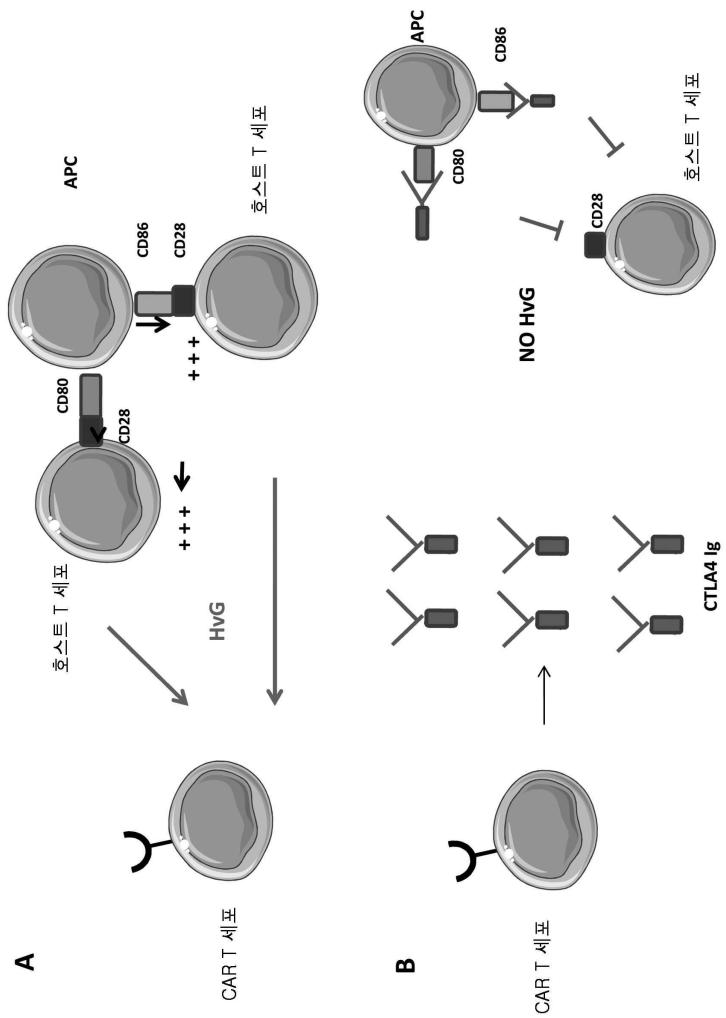
## 도면9



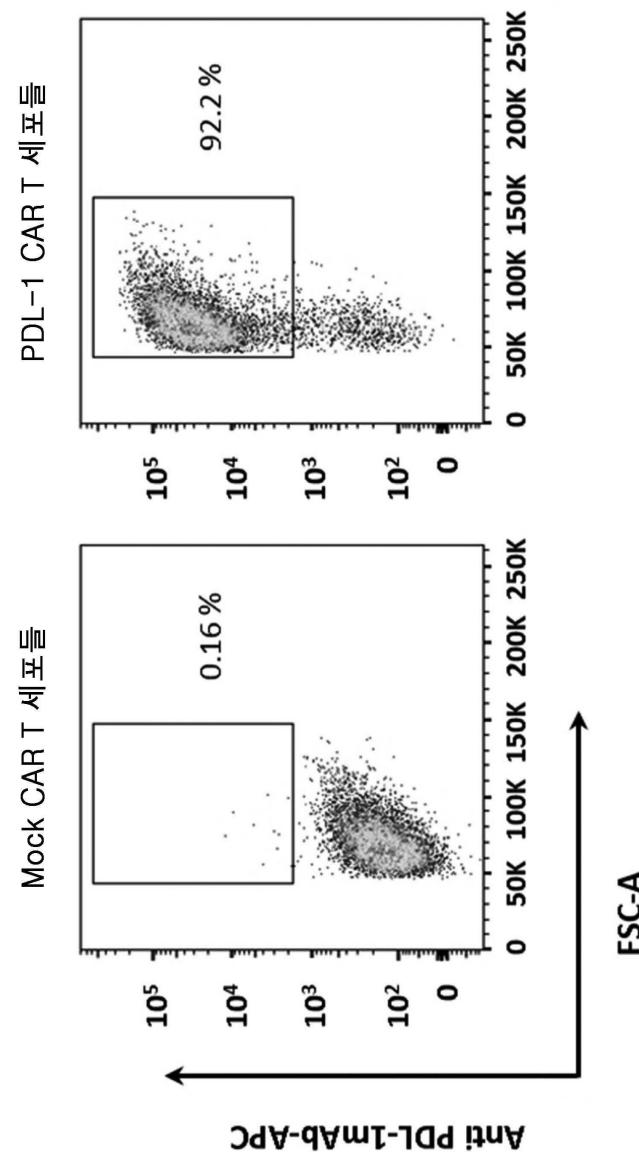
도면10



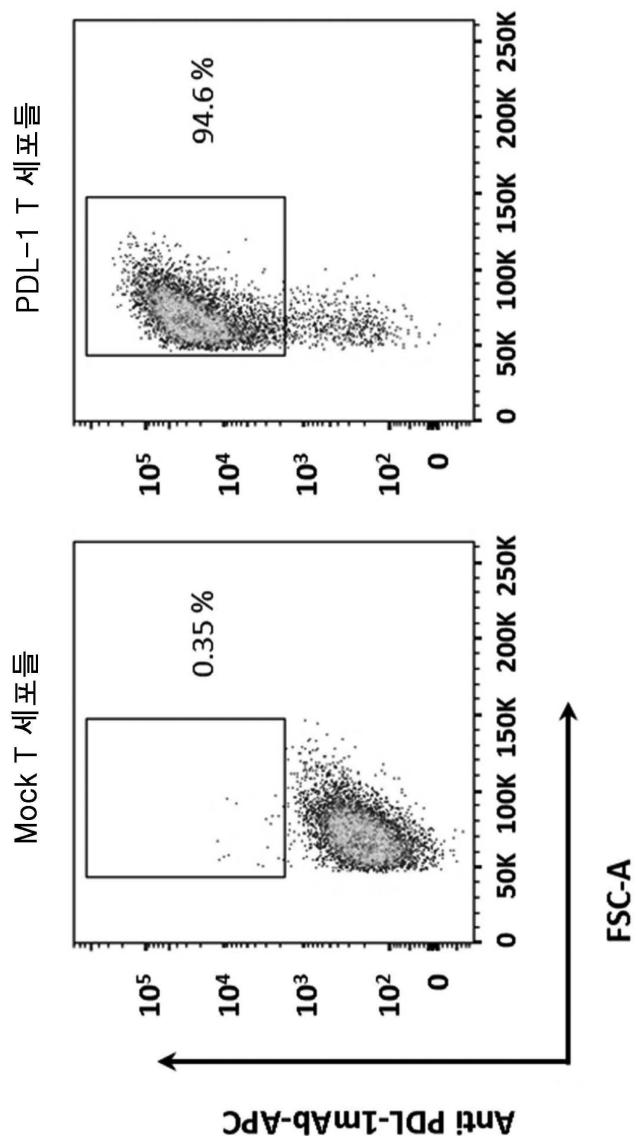
## 도면11



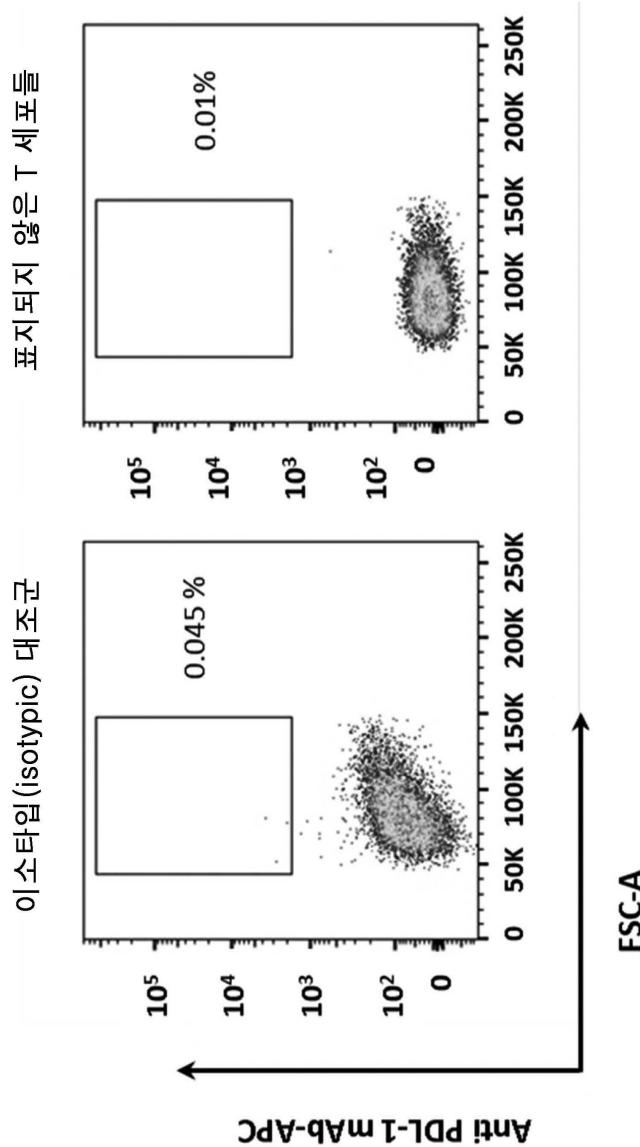
도면12a



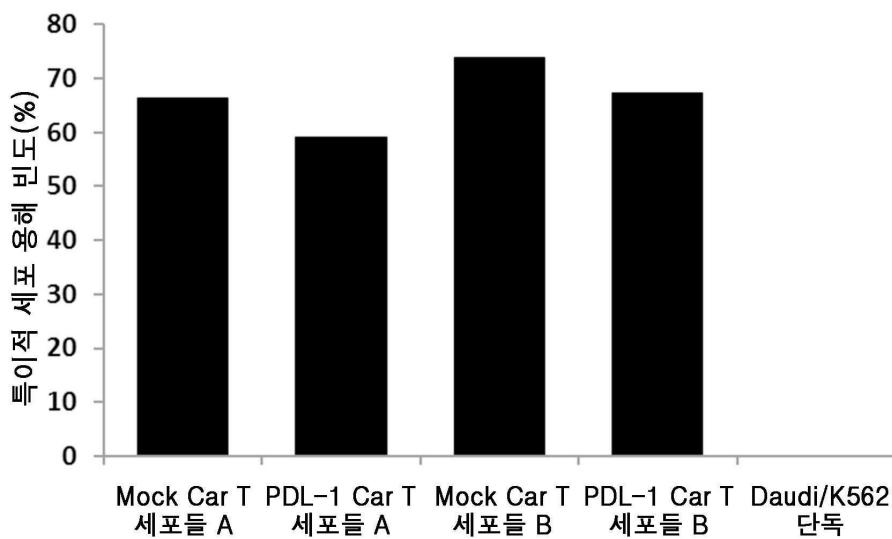
도면12b



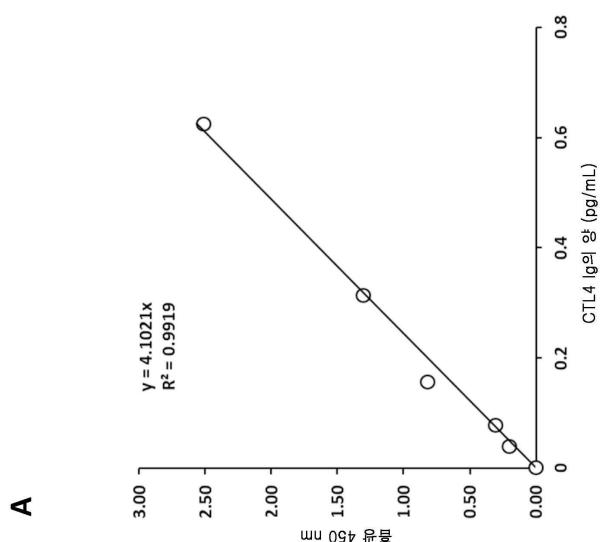
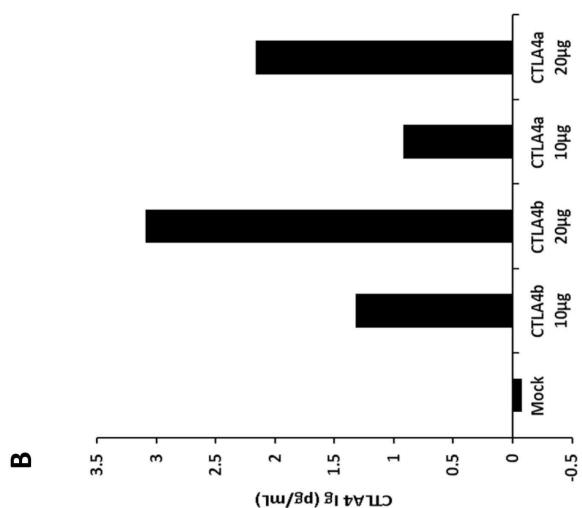
도면12c



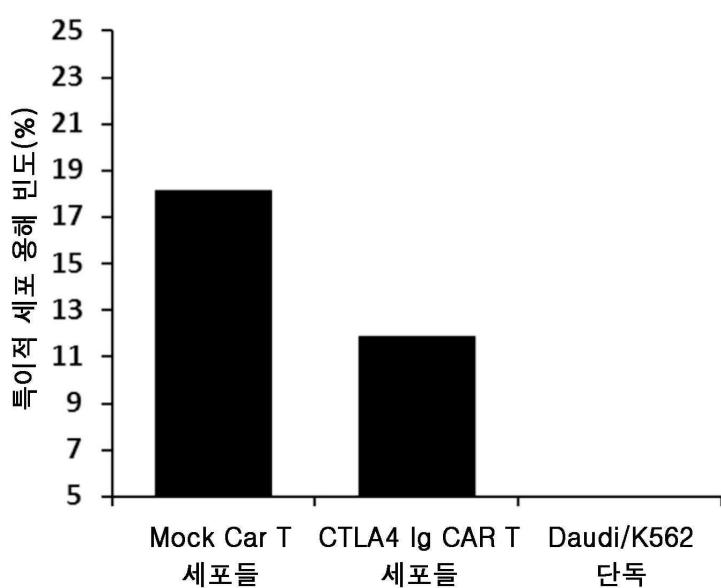
도면13



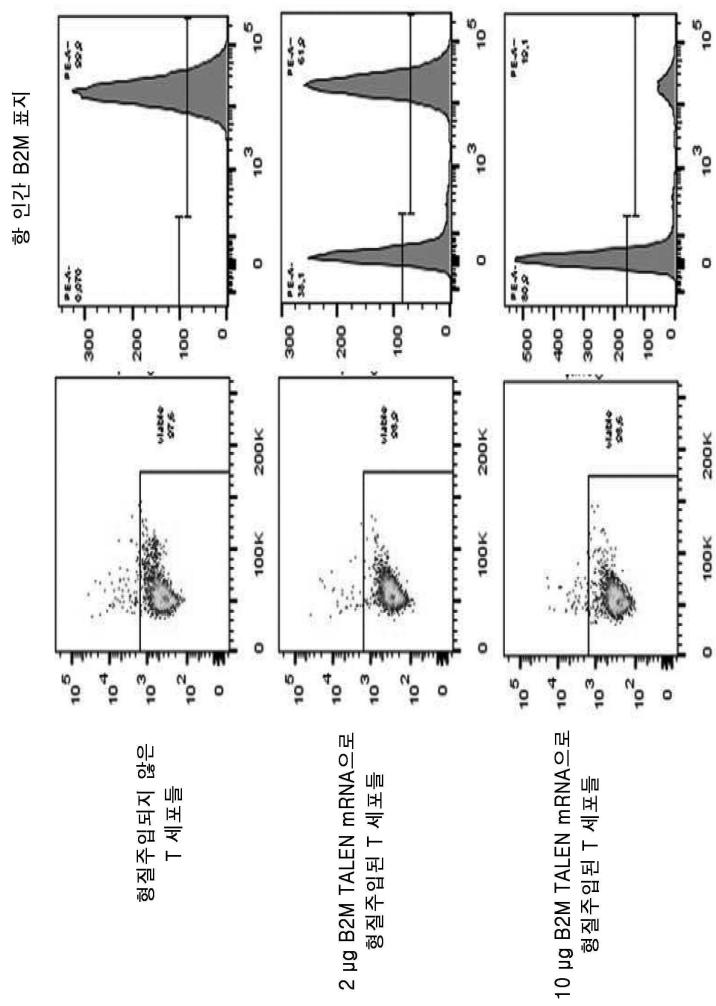
도면14



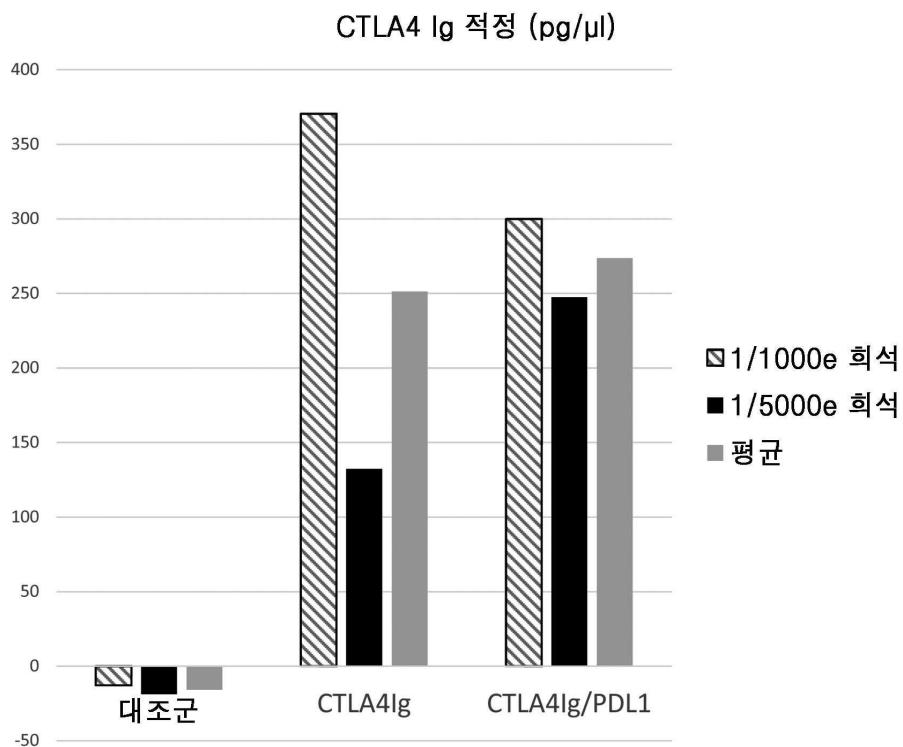
도면15



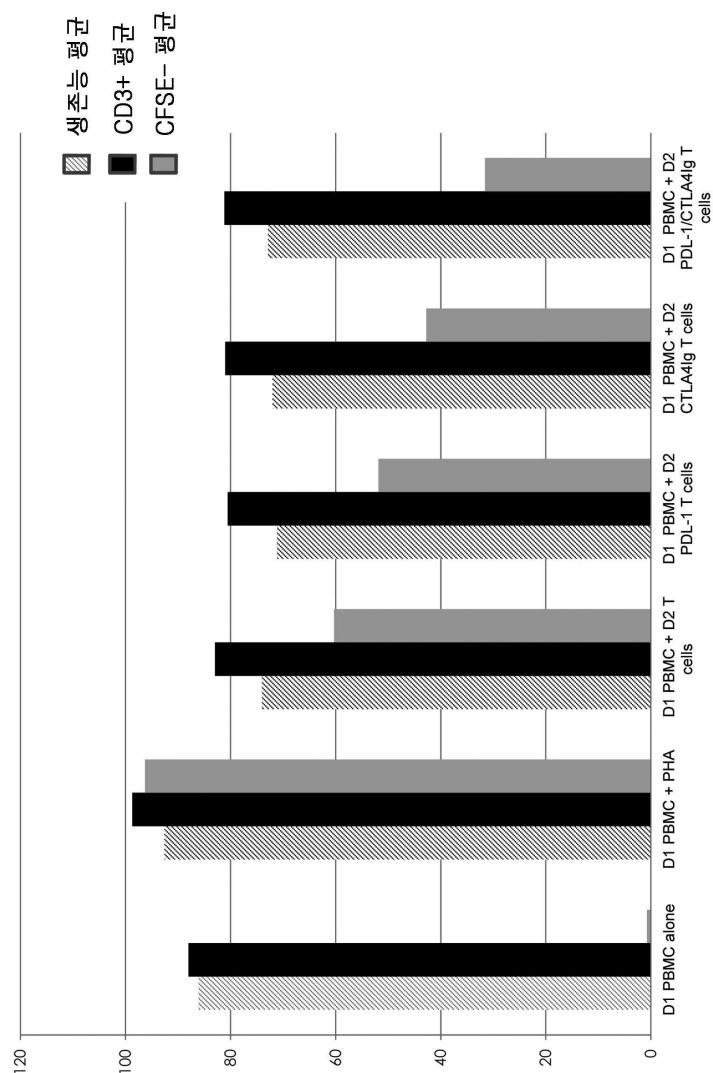
## 도면16



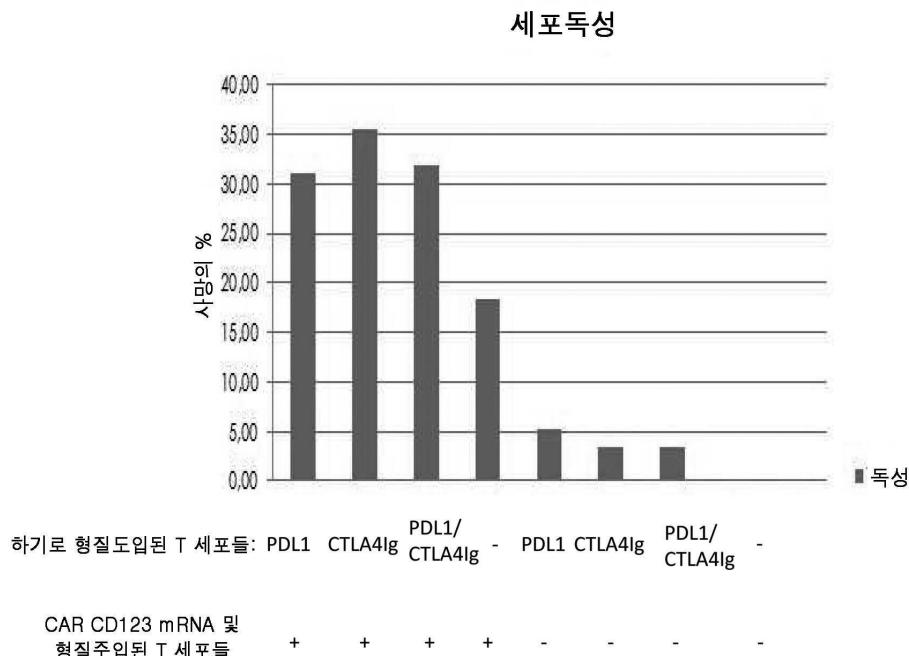
## 도면17



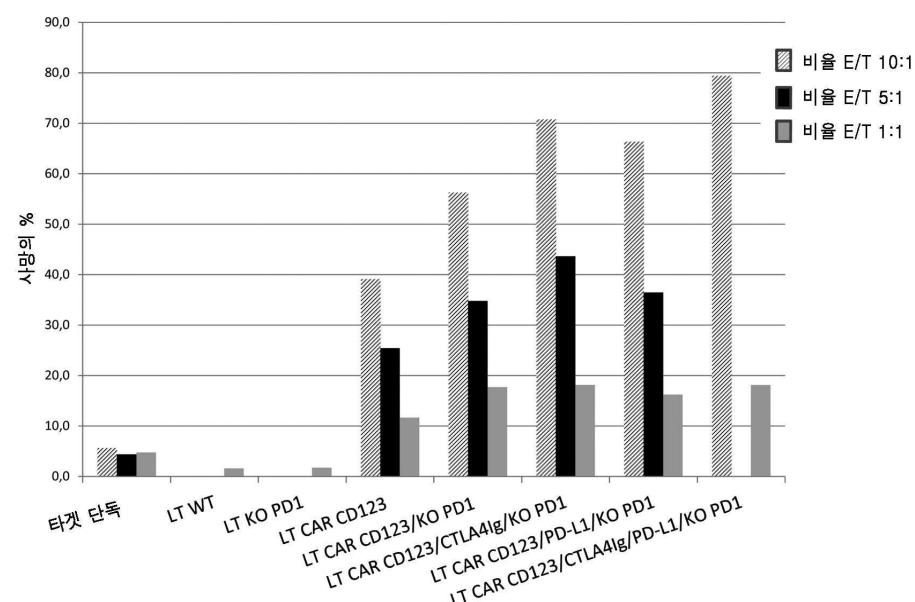
도면18

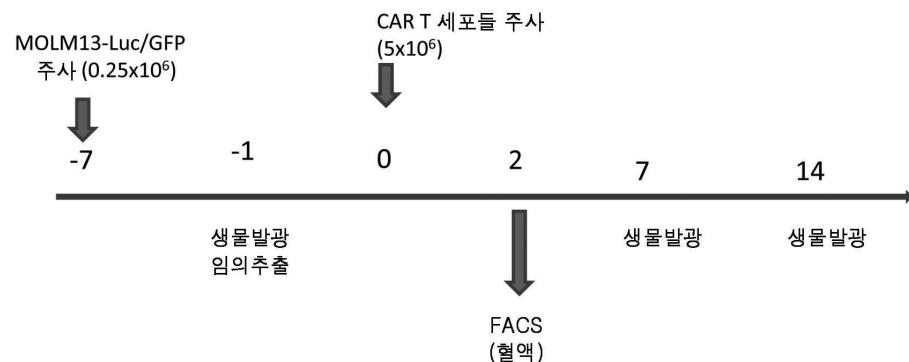


## 도면19



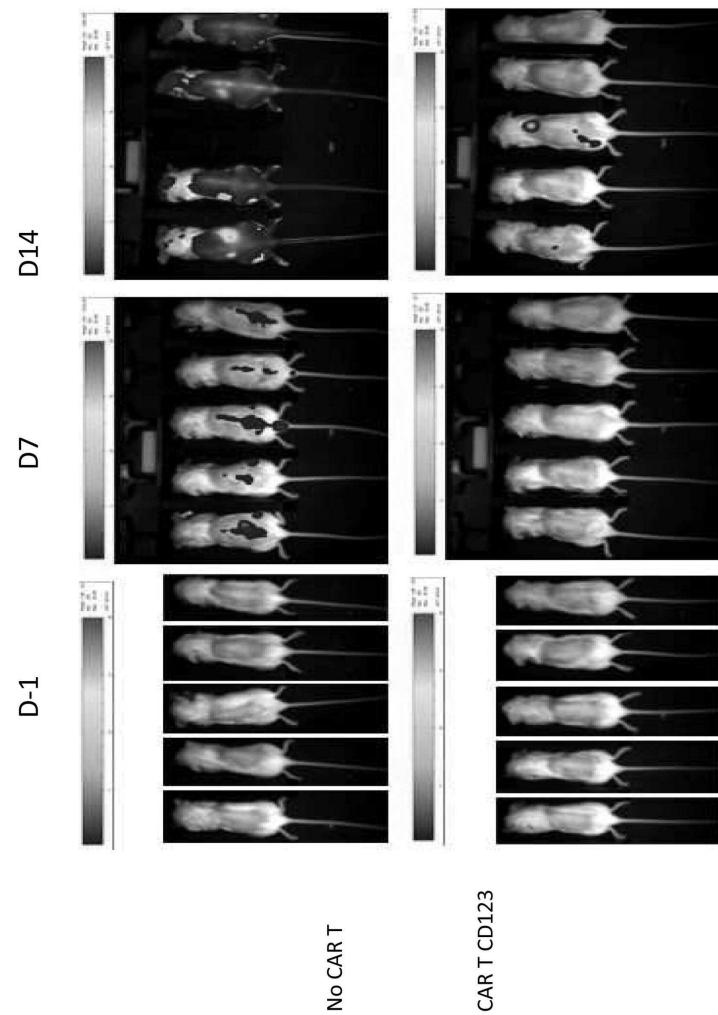
## 도면20



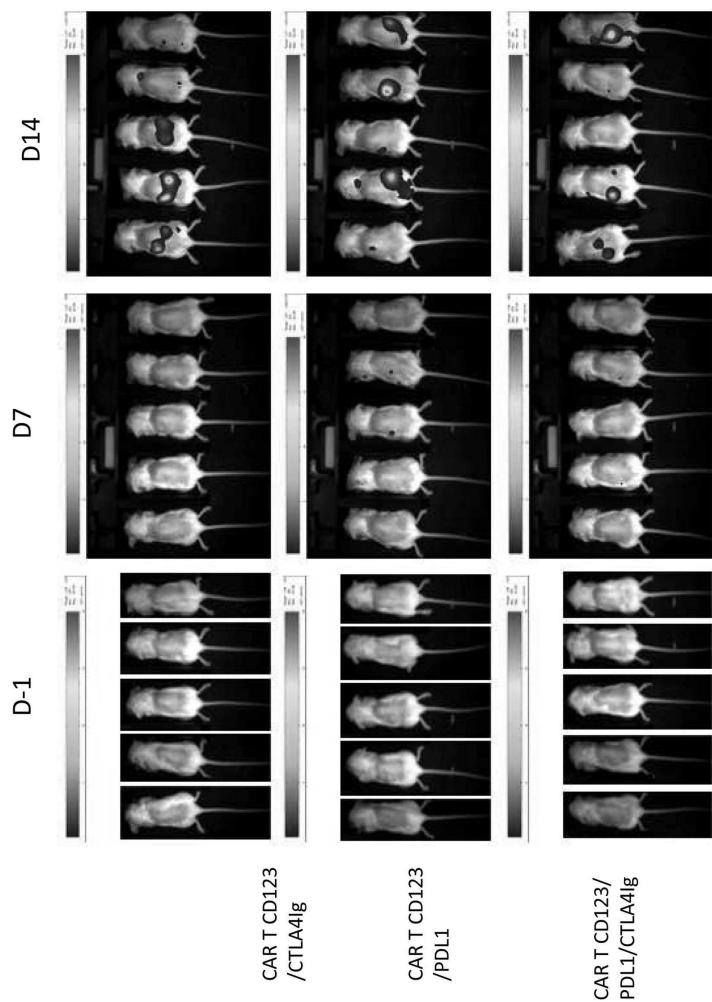
**도면21****도면22**

그룹	% CAR+ 세포들그룹	% PDL1+ 세포들	CTLA4 Ig 농도 (pg/ $\mu$ l)
CAR CD123	98.3	n.a.	n.a.
CAR CD123/PDL1	97.3	96.6	n.a.
CAR CD123/CTLA4Ig	97.7	n.a.	250
CAR CD123/PDL1/CTLA4Ig	97.1	91.9	275

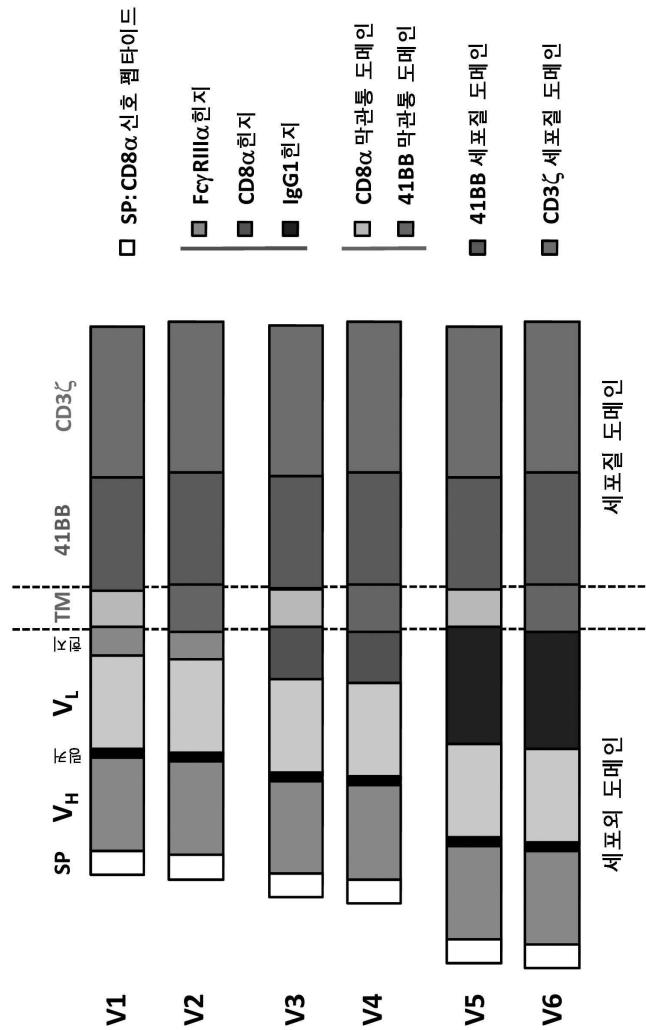
도면23a



도면23b



## 도면24

서  
열  
목  
록

- <110> CELLECTIS
- <120> METHODS FOR ENGINEERING ALLOGENEIC T CELL TO INCREASE AND/OR ENGRAFTMENT INTO PATIENTS
- <130> P81501020PCT00
- <150> PA201570138
- <151> 2015-03-11
- <160> 79
- <170> Patent In version 3.5
- <210> 1
- <211> 58
- <212> DNA
- <213> homo sapiens
- <220><221> gene

&lt;222&gt; (1)..(58)

&lt;223&gt; B2M TALEN T01targeting sequence

&lt;400&gt; 1

tctcgctccg tggccttagc tgtgctcgcg ctactcttc tttctggcct ggaggcta 58

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2814

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Beta2M T01- TALEN - LEFT

&lt;400&gt; 2

atgggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60

gctatcgata tcgcccgtatc acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120

aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggtt 180

acacacgcgc acatcggtgc gtttaagccaa cacccggcag cgtagggac cgtcgctgtc 240

aagtatcagg acatgatcgc acgcgttgcca gaggcgcac acgaagcgat cgttggcgtc 300

ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgtctg gaggccttgc tcacggtgtc gggagagttg 360

agagggtccac cgttacagtt ggacacaggg caacttctca agattgcaaa acgtggggc 420

gtgacccgcag tgaggcagt gcatgcattt cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480

ttgacccccc agcaggttgtt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgcgtggag 540

acgggtccagg ggctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgacccccc ccagcagggt 600

gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg 660

ccgggtgtgt gccaggcccc caaggcttgacc ccggagcagg tgggtggccat cgccagccac 720

gatggcggca agcaggcgct ggagacggc acgcggctgt tgccggtgt gtgccaggcc 780

cacggcttga ccccgaggca ggtggtgcc atcgccagcc acgtggcgg caaggcaggcg 840

ctggagacgg tccagcggtt gttggcggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag 900

caggtggtgtt ccatcgccag caatggcggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 960

ctgtgtccgg tgctgtgcca gggccacggc ttgacccccc agcaggttgtt ggccatcgcc 1020

agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag acgggtccacg ggctgttgcc ggtgtgtgc 1080

caggcccacg gcttgacccccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag 1140

caggcgctgg agacggtgca ggcgtgttg ccgggtgtgtt ggcaggcccc cggcttgacc 1200

ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat aatggtgccaa acgaggcgct ggagacggc 1260

cagcggctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtgccc	1320
atcggccagcc	acgatggcg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgcggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	aatggcggt	1440
gcagaaggcagg	cgttggagac	ggtccagcgg	ctgttgtccgg	tgctgtgcc	ggcccacggc	1500
ttgacccccc	agcaggtgg	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcagggt	1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgttgt	1680
ccgggtctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	1740
aatggtgca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcgctgt	tgccggct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtgccc	atcgccagcc	acgatggcg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgcggtg	ctgtgccagg	ccacggctt	gaccccccag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	aatggcggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
ctgtgcggg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaggtgg	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gccccaggcc	ggcgctggag	agcattgttgc	cccagtatac	tcgcctgtat	2100
ccggcggtgg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgctgcct	tggcctgcct	cgccggcggt	2160
cctgcgttgg	atgcagtgaa	aaaggatttg	ggggatcta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtccccac	2280
gagtagatcg	agctgatcg	gatcgcccg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtagatgg	atgtttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	ggccggctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgt	ggctcccca	tcgactacgg	cgtgatcg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggttacaac	ctgcccattcg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttccgtttcg	tgtccggcca	cttcaaggc	2640
aactacaagg	cccaagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgct	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cgccggcgag	atgatcaagg	ccggcaccc	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cgcccgactg	ataa	2814
<210>	3					
<211>	2832					
<212>	DNA					

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Beta2M T01 TALEN -RIGHT

&lt;400&gt; 3

atggcgatc ctaaaaagaa acgtaaaggc atcgataagg agaccgcgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cggtcgacag tggcgacca ccacgaggca	180
ctggctggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtcggt taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatgcag cggtgcaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgccttgaa ggccttgctc	360
acggtgtggg gagagttag aggtccaccg ttacagtgg acacaggca acttctcaag	420
attgcaaaac gtggcgcgt gaccgcgtg gaggcagtgc atgcattggc caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag caaatattgg	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgccca ggccacggc	600
ttgacccccc agcaggtggt ggcattcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	660
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgaccccg ggagcaggtg	720
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg	780
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc cggagcagg tggtgccat cgccagccac	840
gatggcggca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccgggtgt gtgcaggcc	900
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atcgccagca atggcgggtgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggct gttggcggtg ctgtggcagg cccacggctt gaccccgag	1020
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccaggg	1080
ctgttgccgg tgctgtgccca ggccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc	1140
agccacgatg gggcaagca ggctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1200
caggcccacg gcttgaccccg ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtgcaag	1260
caggcgctgg agacggtgca ggctgttg cggcgctgt gcccaggccca cggcttgacc	1320
ccccaggagg tggtgccat cgccagcaat aatggtgca agcaggcgct ggagacggc	1380
cagcggctgt tgccgggtgt gtggcaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc	1440
atcgccagca ataatggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttggcggtg	1500
ctgtggcagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagggc ctgttgccgg tgctgtgccca ggccacggc	1620
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gggcaagca ggcgctggag	1680
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgaccccg ggagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagcaatat tggtgcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg	1800

ccgggtgtgt gcccggccca cggcttgacc ccccaaggagg tggtgccat cgccagcaat	1860
aatggggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggctgt gtgccaggcc	1920
cacggcttga ccccgagca ggtggtgcc atgcgcagca atattggtg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tcgaggcgct gttggccgtg ctgtggcagg cccacggctt gaccctcag	2040

caggtggtgg ccatcgccag caatggcgcc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc	2100
cagttagtctc gccctgatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcccttgc	2160
gcctgcctcg gccccgtcc tgcgctggat gcagtggaaa agggattggg ggatccatc	2220
agccgttccc agctggtcaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tgcggccaa cagcacccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacagggc	2400
aagcacctgg gccccgtccag gaagccccgac ggcgcacatct acaccgtggg ctccccatc	2460

gactacggcg tgcgttgaa caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccattggc	2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaagggt gtacccctcc agcgtgaccg agtcaagtt cctgttgcgt	2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcacaac	2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctccctgatcg gccccggat gatcaaggcc	2760
ggcacccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttaacaaca acggcgagat caacttcg	2820
gccgactgat aa	2832

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> B2M T02- TALEN targeting sequence

<400> 4

tccaaagatt caggtttact cacgtcatcc agcagagaat ggaaagtcaa	50
--	----

<210> 5

<211> 2814

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta2M T02-TALEN - LEFT

<400> 5

atggcgcata ctaaaaagaa acgttaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
--	----

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt	180
acacacgcgc acatcggtgc gttaagccaa cacccggcag cgtagggac cgtcgctgtc	240
aagtatcagg acatgatcgac agcggtgcac gaggcgacac acgaagcgat cggtggcgtc	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctgtc gaggccttgc tcacggtgcc gggagagtgg	360
agagggtccac cgttacagtt ggacacagggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatttgcgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgaccccgagcagggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcccgaagca ggcgtggag	540
acggtccagg ggcgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcagggtg	600
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	660
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc cggagcagg tggtgccat cgccagcaat	720
attggtgca agcaggcgct ggagacgggtg caggcgctgt tgccgggtct gtgccaggcc	780
cacggcttga ccccgagca ggtggtgcc atcgccagca atattggtg caaggcaggcg	840
ctggagacgg tgcaggcgct gttggcggtc ctgtggcagg cccacggctt gacccggag	900
caggtggtgg ccatcgccag caatattggt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg	960
ctgtggccgg tgctgtgcca ggccccacggc ttgacccccc agcagggtggt ggccatcgcc	1020
agcaataatg gtggcaagca ggccgtggag acggccacgc ggctgttgcc ggtgtgtgc	1080
caggcccacg gcttgacccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtgccag	1140
caggcgctgg agacggtgca ggccgtgttgc cgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc	1200
ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat ggccgtggca agcaggcgct ggagacggc	1260
cagggctgt tgccgggtct gtgccaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc	1320
atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagggct gttggcggtg	1380
ctgtggccagg cccacggctt gacccggag cagggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccaggg ctgttgccgg tgctgtgcca ggccccacggc	1500
ttgaccccgagcagggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgtggag	1560
acgggtccagg cgctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgacccc ccacgagggtg	1620
gtggccatcg ccagcaataa tggtgccag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	1680
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtgccat cgccagcaat	1740
aatggtgca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccgggtct gtgccaggcc	1800

cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atgcgcagca atggcggtgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag	1920
caggtggtgg ccatgccag caatggcggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1980
ctgtgccgg tgctgtgcca gccccacggc ttgaccctc agcaggtggt ggccatgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc ggccgtggag agcattgtg ccagttata tcgcctgtat	2100
ccggcggtgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcgtgcct tggcctgcct cggcggcgt	2160
cctgcgtgg atgcagtgaa aaaggattt gggatcta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280
gagtacatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aagggtgatgg agttttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtcc	2400
aggaagcccg acggcccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgccccatcg gccaggccga cgaardtgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaaag	2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttccctttcg tgtccggcca cttcaaggc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tccgtggagg agctcctgat cggcgccgag atgatcaagg cggcacccct gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagtcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814
<210> 6	
<211> 2832	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Beta2M T02-TALEN RIGHT	
<400> 6	
atgggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgataagg agaccggcgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca	180
ctggctggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtcgct taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccc tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgac cggtggcaga ggcacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac ggcgtctgga ggccttgctc	360
acgggtggcgg gagagtttag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcgtggc caatgcactg	480

acgggtgccc cgctcaactt gaccccccag caggtggtgg ccatgccag caataatggt	540
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc	600
ttgaccccg agcaggtggt ggccatgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgtggag	660
acgggtcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgaccgg ggagcagggtg	720
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgtgg agacggcca gggctgttg	780
ccgggtctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtgccat cgccagcaat	840
ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgtgt gtgcaggcc	900
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atgcccaca atggcggtgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagccgct gttgcccggc ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag	1020
caggtggtgg ccatgccag caatggcggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatgcc	1140
agccacgatg gcccgaagca ggccgtggag acggccatcg ggctgttgcc ggtgctgtgc	1200
caggcccacg gcttgaccgg ggagcagggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag	1260
caggcgtgg agacggtcca gggctgttg cggctgtgt gcaaggccca cggcttgacc	1320
ccggagcagg tggtgccat cgccagcaat attggtgca agcaggcgct ggagacggtg	1380
caggcgtgt tgccgggtgt gtgccaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc	1440
atcggccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagccgct gttgcccgg	1500
ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag caggtggtgg ccatgccag caatggcgg	1560
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc	1620
ttgaccccg agcaggtggt ggccatgcc agccacgatg gcccgaagca ggcgtggag	1680
acggccatcg ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgaccgg ccagcagggtg	1740
gtggccatcg ccagcaatgg cggtgccaa caggcgtgg agacggtcca gggctgttg	1800
ccgggtctgt gccaggccca cggcttgacc cggagcagg tggtgccat cgccagccac	1860
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtgt gtgcaggcc	1920
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atgcccaca atggcggtgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagccgct gttgcccggc ctgtggcagg cccacggctt gacccctcag	2040
caggtggtgg ccatgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattttgcc	2100
cagtatctc gccctgatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacat cgtgccttg	2160
gcctgcctcg gccccgtcc tgcgtggat gcagtaaaa agggattggg ggatcctatc	2220

agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgccccgaa cagcacccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacagggc	2400
aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggccatct acaccgtgg ctccccatc	2460
gactacggcg ttagtgcgca cacaaggcc tactccggcg gctacaacct gccatcgcc	2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaagg gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctttcg	2640
tccggccact tcaaggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctccgtatcg gcggcgagat gatcaaggcc	2760
ggcacccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcg	2820
gccgactgat aa	2832
<210> 7	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> B2M T03- TALEN targeting sequence	
<400> 7	
ttagctgtgc tcgcgtact ctctttctt ggcctggagg ctatcca	47
<210> 8	
<211> 2814	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Beta2M T03-TALEN - LEFT	
<400> 8	
atgggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgcccgtatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgacg caccacgagg cactggcgcc ccacgggtt	180
acacacgcgc acatcggtgc gtttaagccaa cacccggcag cgtagggac cgtcgctgtc	240
aagtatcagg acatgatcgc acgttgtcca gagggcgacac acgaaggat cgttggcg	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgtctg gaggccttgc tacgggtggc gggagatgg	360
agagggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcg	420

gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatttgc cgcattttcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgaccccg agcagggttgtt ggccatcgcc agcaatatttgc gtggcaagca ggcgcgtggag	540
acgggtgcagg cgctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgaccccc ccagcagggtg	600
gtggccatcg ccagcaataa ttgtggcaag caggcgctgg agacggtcac gcggcgttgttgc	660
ccgggtgtgtt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg ttgtggccat cgccagccac	720
gatggcggca agcaggcgctt ggagacggtc cagcggctgtt tgccgtgttgc gtgcaggcc	780
cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgttgc caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggctt gtgtggccagg cccacggctt gaccccccag	900
cagggtgtgg ccatcgccag caataatgtt ggcaaggagg cgctggagac ggtccagcgg	960
ctgtgtccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccccc acgagggttgtt ggccatcgcc	1020
agcaatggcg gtggcaagca ggctgggg acggccagg ggctgtgttgc ggtgtgtgc	1080
caggcccacg gcttgaccccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaataa ttgtggcaag	1140
caggcgctgg agacggtcca ggctggctgttgc ccggctgtgttgc ggcaggccca cggcttgacc	1200
ccggaggcagg ttgtggccat cgccagccac gatggcggca agcaggcgctt ggagacggtc	1260
cagcggctgt tgccggctt gtgtggccagg cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc	1320
atcgccagca atggcggtgttgc caagcaggcg ctggagacgg tccagggctt gttggccgg	1380
ctgtgtccagg cccacggctt gaccccccggc cagggtgtgg ccatcgccag ccacgtggc	1440
ggcaaggagg cgctggagac ggtccagcgg ctgtgtccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgacccccc acgagggttgtt ggccatcgcc agcaataatgtt gtggcaagca ggctgtggag	1560
acggccagg ggctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgaccccc ggagcagggtg	1620
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcac gcggctgttgttgc	1680
ccgggtgtgtt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg ttgtggccat cgccagcaat	1740
aatggggca agcaggcgctt ggagacggtc cagcggctgtt tgccgtgttgc gtgcaggcc	1800
cacggcttga ccccgaggca ggtggtggcc atcgccagca acgtggcgg caaggaggcg	1860
ctggagacgg tccagggctt gtgtggccagg cccacggctt gaccccccag	1920
cagggtgtgg ccatcgccag caatggcggtt ggcaaggagg cgctggagac ggtccagcgg	1980
ctgtgtccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc acgagggttgtt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattttgc cccagtttac tcggccgttat	2100
ccggcgttgttgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcgtgttgc tggcgtgttgc cggcggcg	2160
cctgcgttgttgc atgcgtgtaa aaaggatttgg gggatccat tcagccgttc ccagctgggttgc	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280

gagtagatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aagggtgatgg	agtcttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	ggcggtctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccca	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggttacaac	ctgcccattcg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtgggttggaa	2580
gtgtaccctt	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttccctgttcg	tgtccggcca	cttcaaggc	2640
aactacaagg	cccaagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agtcctgtat	cggcgccgag	atgatcaagg	ccggcacccct	gaccctggag	2760
gagggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cgcccgactg	ataa	2814
<210>	9					
<211>	2832					
<212>	DNA					

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta2M T03-TALEN -RIGHT

<400> 9

atggcgatc	ctaaaaagaa	acgttaaggc	atcgataagg	agaccggccgc	tgccaatgttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatac	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaaggtt	cgttcgacag	tggcgccagca	ccacgaggca	180
ctggctggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggtgcgt	taagccaaca	cccgccagcg	240
tttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgac	cgttgccaga	ggcgcacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctgg	caaacagtgg	tccggcgac	gacgtctggaa	ggccttgctc	360

acgggtggcgg	gagagttgag	aggtaaggc	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaaac	gtggcgccgt	gaccgcgtg	gaggcagtgc	atgcattggcg	aatgcactg	480
acgggtgccc	cgtcaactt	gaccccccag	cagggtgg	ccatcgccag	caataatgg	540
ggcaagcagg	cgtggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcc	ggcccacggc	600
ttgacccccc	agcaggtgg	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acggttccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagcaatat	tggtgccag	caggcgctgg	agacggtgca	ggcgctgttg	780

ccgggtgtgt	gccaggccca	cggttgacc	ccccagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	840
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggctgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtgcc	atcgccagca	atattggtg	caagcaggcg	960

ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggcgt ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag	1020
cagggtggc ccatcgccag caataatggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccggc agcaggtggt ggccatcgcc	1140
agccacatg gggcaagca ggccgtggag acggccacgc ggctgttgcc ggtgcgtgc	1200
caggccccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag	1260
caggcgctgg agacggtcca gcggctgtt ccggctgtgt gccaggcccc cggcttgacc	1320
ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat ggccgtggca agcagggcgt ggagacggtc	1380
cagccgtgt tgccgggtgt gtgccaggcc cacggcttga cccggagca ggtggtgcc	1440
atcggccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagggctt gttggcggt	1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccggag caggtggtgg ccatcgccag ccacatggc	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagggc ctgttgccgg tgctgtgcca ggccacggc	1620
ttgaccggc acgaggtggt ggccatcgcc agcaatattt gttggcaagca ggcgtggag	1680
acgggtgcagg cgctgttgcc ggtgtgtgc caggccccacg gcttgacccc ccagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagaataa tggtgcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttgc	1800
ccgggtgtgt gccaggcccc cggcttgacc cccagcagg tggtgccat cgccagcaat	1860
aatggtgca agcaggcgct ggagacggc cagccgtgt tgccgggtgt gtgccaggcc	1920
cacggcttga cccggagca ggtggtgcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagggctt gttggcggt ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag	2040
cagggtggc ccatcgccag caatggcggc ggcaggcccc cgctggagag cattgttgcc	2100
cagtatctc gcccgtatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtgccttgc	2160
gcctgcctcg gggggcgcc tgcgtggat gcagtggaaa agggatggg ggatcctatc	2220
agccgttccc agtggtaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tggccacga gtacatcgag ctgtatcgaa tcggccggaa cagcacccag	2340
gaccgttatcc tggagatgaa ggtgtggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacagggc	2400
aagcacctgg gcccgtccag gaagcccgac ggccatct acaccgtggg ctccccatc	2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccacggc	2520
caggccccacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgggtt ggtggaaatgtt gtacccctcc agcgtgaccc agtcaagtt cctgttcgt	2640
tccggccact tcaaggccaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg cctgtgtc cgtggaggag ctccgtatcg gcccgtggat gatcaaggcc	2760
ggcacccatcga ccctggagga ggtgaggagg aagttaaca acggcgagat caacttcg	2820

gccgactgat aa	2832
<210> 10	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PDCD1_T01	
<400> 10	
ttctccccag ccctgctcgt ggtgaccgaa ggggacaacg ccaccttca	49
<210> 11	
<211> 2814	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PDCD1_T01-L TALEN	
<400> 11	
atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggatc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgcccgcata ctgcacgcgc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttcttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggtt	180
acacacgcgc acatcggtgc gtttaagccaa cacccggcag cgtagggac cgtcgctgtc	240
aagtatcagg acatgatcgcc agcggtgcgc gaggcgacac acgaaggcat cggtggcgcc	300
ggcaaaacagt ggtccggcgc acgcgcgtcg gaggccgtgc tcacgggtgc gggagagttt	360
agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcgcc	420
gtgacccgcag tggaggcagt gcatgcattt gcacatgcac tgacgggtgc cccgcgtcaac	480
ttgacccccc agcaggttgtt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgcgtggag	540
acggttccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccccc ggagcaggtt	600
gtggccatcg ccagccacga tggcggtcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	660
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc ccccgagg tggtgccat cgccagcaat	720
ggcggtggca agcaggcgct ggagacggcgc cagcggtgt tgccgggtgt gtgccaggcc	780
cacggcttga ccccgaggca ggtgggtggcc atcgccagcc acgtggcgca aagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggtt gttggcggtt ctgtggcagg cccacggctt gacccggag	900
cagggttgtt ccacgtggc ccaacatcgcc ggcaaggcagg cgctggagac ggtccaggcg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggccacggc ttgacccgg agcaggttgtt ggccatcgcc	1020

agccacgatg gccggcaagca ggccgtggag acggccatcg ggctgtgcc ggtgtgtgc	1080
caggcccacg gcttgacccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagccacga tggccggcaag	1140
caggcgctgg agacggtcca gcggctgttgc cggtgtgttgc gccaggcccc cggcttgacc	1200
ccggagcagg tggtgccat cgccagcaat attggggca agcaggcgct ggagacggtg	1260
caggcgctgt tgccgggtgt gtgcaggcc cacggcttgc ccccccagca ggtgtggcc	1320
atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagggct gttggccgtg	1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccggag caggtggtgg ccatcgccag ccacgtggc	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagccg ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc	1500
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gccggcaagca ggcgtggag	1560
acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcagggtg	1620
gtggccatcg ccagccacga tggggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	1680
ccgggtgtgt gccaggcccc cggcttgacc ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat	1740
ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtgt gtgcaggcc	1800
cacggcttgc ccccccagca ggtgtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagggct gttggccgtg ctgtggcagg cccacggctt gacccggag	1920
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagccg	1980
ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc ttgaccctc agcaggtggt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gccgcaggcc ggcgtggag agcattgttgc cccagttatc tcgcctgtat	2100
ccggcgttgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcgtgcct tggcctgcct cggggcgt	2160
cctgcgttgg atgcgtgaa aaaggatttggggatccata tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280
gagtagatcg agctgatcg gatcgcccg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aaggtagatgg agttttcat gaagggtgtac ggctacaggg gcaaggacct gggggctcc	2400
aggaagcccc acggccat ctacaccgtg ggctccccca tgcactacgg cgtgtatcg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcctatcg gccaggccga cggaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtgggtggag	2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttccctgtcg tgcggccca cttcaaggc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgt	2700
tccgtggagg agctcctgat cggccggcag atgatcaagg cggccacctt gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttgc cggccgactg ataa	2814

&lt;211&gt; 2829

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; PDCD1\_T01-R TALEN

&lt;400&gt; 12

atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacgaggca	180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtcggt taagccaaaca cccggcagcg	240
ttagggacct tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgac cggtgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgctgg caaacagtgg tccggcgacac ggcgtctgg ggccttgctc	360
acgggtggcgg gagagtttag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaaac gtggcgccgt gaccgcagt gaggcagtgc atgcattggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccgag caagtcgtcg caatcgccag ccatgatgga	540
gggaagcaag ccctcgaaac cgtcgacggg ttgttcctg tgctctgcca ggcacggc	600
cttacccctc agcaggttgtt ggccatcgca agtaacggag gaggaaagca agccttggag	660
acagtgcagc gcctgttgc cgtctgtgc caggcacacg gcctcacacc agagcaggtc	720
gtggccatttgc cttccatgtt cggggggaaa caggctctgg agaccgttca gaggctgctg	780
cccgctctt gtcaagctca cggcctgact ccccaacaag tggtcggccat cgcctctaatt	840
ggcgccggga agcaggactt ggaaacagtgc cagagactgc tccctgtgt ttgccaagct	900
catgggttga ccccccaaca ggtcgctcg attgcctcaa acgggggggg caagcaggcc	960
ctttagactg tgcagaggctt gttgccagtg ctgtgtcagg ctacggctt cactccaa	1020
cagggtggtcg caatttgcac caacggcgcc ggaaagcaag ctcttggaaac cgtgcaacgc	1080
ctcctgcccc tgcgtgtca ggctcatggc ctgacaccac aacaagtcgtt ggccatcgcc	1140
agtaataatg gggggaaaca ggctcttgg accgtccaga ggctgtccc agtgcgttc	1200
caggcacacg ggctgacccc cgagcagggtg gtggctatcg ccagcaatat tggggcaag	1260
caggccctgg aaacagtcca ggcctgtcg ccagtgtttt ggcaggctca cgggctact	1320
ccccacggcagg tcgtggcaat cgcctccaac ggcggaggga agcaggctt ggagaccgtg	1380
cagagactgc tgccctgtttt gttgccaggcc cacggactca cacctgaaca ggtcgcc	1440
attgccttc acgatggggg caaacaagcc ctggagacag tgcagccgtt gttgcctgtt	1500
ttgtgccaag cccacggctt gactcctcaa caagtggtcg ccacgcctc aaatggcc	1560

ggaaaacaag ctctggagac agtgcagagg ttgctgccc tccctgcc a gcccacggc	1620
ctgactcccc aacaggcgt cgccattgcc agcaacaacg gaggaaagca ggctctcgaa	1680
actgtgcagc ggctgcttcc tgtgctgtgt caggctcatg ggctgacccc cgagcaagtg	1740
gtggctattg ccctaataatgg aggcaagcaa gccctigaga cagtccagag gctgtigcca	1800
gtgctgtgcc aggcccacgg gtcacaccc cagcaggtgg tcgccatcgc cagtaacaac	1860
gggggcaaac aggcatggaa accgtccag cgccctgcttc cagtgcctg ccaggcacac	1920
ggactgacac ccgaacaggt ggtggccatt gcatccatg atggggcaa gcaggccctg	1980
gagaccgtgc agagactcct gccagtgttg tgccaaagctc acggcctcac ccctcagcaa	2040
gtcgtggcca tcgcctcaaa cggggggggc cggccitgac tggagagcat tttggccag	2100
ttatctcgcc ctgatccggc gttggccgctt tgaccaacg accaccttgt cgccttggcc	2160
tgcctggcg ggcgtcctgc gctggatgca gtaaaaagg gattgggggat tcctatcagc	2220
cgttcccagc tggtaagtc cgagctggag gagaagaaat ccgagtttag gcacaagctg	2280
aagtacgtgc cccacgagta catcgagctg atcgagatcg cccgaaacag cacccaggac	2340
cgtatctgg agatgaaggt gatggagttc ttcatgaagg tgtacggcta cagggcaag	2400
cacctggcg gctccaggaa gccgcacggc gccatctaca ccgtgggctc cccatcgac	2460
tacggcgtga tctggacac caaggcctac tccggggct acaacctgcc catggccag	2520
gccgacgaaa tgcagaggtt cgtggaggag aaccagacca ggaacaagca catcaacccc	2580
aacgagtggta ggaaggtgtt cccctccagc gtgaccgagt tcaagtctt gtttgtgtcc	2640
ggccacttca agggcaacta caaggcccag ctgaccaggc tgaaccacat caccaactgc	2700
aacggcgccg tgctgtccgt ggaggagctc ctgatcgccg gcgagatgtt caaggccggc	2760
accctgaccc tggaggaggtt gaggaggaag ttcaacaacg gcgagatcaa cttcgccggcc	2820
gactgataa	2829
<210> 13	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PDCD1_T03	
<400> 13	
tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagaga	49
<210> 14	
<211> 2814	
<212> DNA	

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt;

&gt; PDCD1\_T03-L TALEN

&lt;400&gt; 14

atggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgcccgcatac acgcacgcgc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttcggtcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt	180
acacacgcgc acatcggtgc gttaagccaa caccggcag cgtagggac cgtcgctgtc	240
aagtatcagg acatgatcgc acgcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgcgttgca gaggcgttgca tcacggtggc gggagatgt	360
agaggcac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcgcc	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcattgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgaccggcgg agcagggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag	540
acgggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtc caggcccacg gcttgacccc ggagcagggtg	600
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg	660
ccggtgtgtt gccaggccca cggcttgacc cgggagcagg tggtgccat cgccagccac	720
gatggcggca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccgggtgt gtggcaggcc	780
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atcgccagca atggcgttg caaggcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggtt gttggccgt ctgtgccagg cccacggctt gacccggag	900
cagggtggcc ccatcgccag ccacgatggc ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg	960
ctgtggccgg tgcgtgtgcca gggccacggc ttgacccccc agcagggtggt ggccatcgcc	1020
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccacg ggctgttgcc ggtgtgtgc	1080
caggcccacg gcttgacccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaataa tggtgccaaag	1140
caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggctgtgt ggccaggccca cggcttgacc	1200
ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat ggccggtgcc agcaggcgct ggagacggc	1260
cagcggctgt tggcggtgt gtggccaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc	1320
atcgccagca ataatggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttggccgt	1380
ctgtggccagg cccacggctt gaccccccag cagggtggcc ccatcgccag caataatgg	1440
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgcc ctgttgccgg tgcgtgtgcca gggccacggc	1500
ttgacccccc agcagggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	1560

acgggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc cagggccacg gtttgcaccc ccagcaggta 1620

gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg 1680

ccgggtctgt gccaggccca cggcttgacc cgggaggcagg tggtgccat cgccagccac 1740

gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtct gtgccaggcc 1800

cacggcttga ccccgagca ggtgggtggcc atgccagcc acatggcgg caagcaggcg 1860

ctggagacgg tccagcggct ttggccgtg ctgtggcagg cccacggctt gacccggag 1920

caggtggtgg ccatcgccag caatattgtt ggcaaggcagg cgctggagac ggtgcaggcg 1980

ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccctc agcaggttgtt ggccatcgcc 2040

agcaatggcg gggcaggcc ggcgctggag agcattgttgc cccagtatc tcgcctgtat 2100

ccggcgttgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcgtgcct tggctgcct cggcggcg 2160

cctgcgtgg atgcagtgaa aaaggattt ggggatcta tcagccgttc ccagctggtg 2220

aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac 2280

gagtagatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg 2340

aagggtatgg agttttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaaggcacct gggcggtcc 2400

aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcg 2460

gacaccaagg cctactccgg cggttacaac ctggccatcg gccaggccga cgaaatgcag 2520

aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaa 2580

gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttccctgtcg tgtccggcca cttcaaggc 2640

aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cggcgtgt 2700

tccgtggagg agtccctgtat cggcggcgag atgatcaagg cggcaccctt gaccctggag 2760

gagggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttgc cggccgactg ataa 2814

<210> 15

<211> 2829

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDCD1\_T03-R TALEN

<400> 15

atgggcgtatc ctaaaaagaa acgttaaggta atcgataagg agaccggccgc tgccaaatgttc 60

gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcggtt ctacagccag 120

cagcaacagg agaagatcaa accgaaggttt cggtcgacag tggcgcagca ccacgaggca 180

ctggtcggcc acgggtttac acacgacgtac atcgatgtgtt taagccaaaca cccggcagcg 240

ttagggaccg tcgtgtcaa gtatcaggac atgatgcag cgccgcaga ggccacac	300
gaagcgatcg tggcgctgg caaacagtgg tccggcac ggccttgctc	360
acggtgtccgg gagagtttag aggtccaccg ttacagtgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaaac gtggcgccgt gaccgcgtg gaggcagtgc atgcattggc caatgcactg	480
acgggtgcccg cgtcaacctt gaccccgag caagtcgtcg caatgcacccatgatgga	540
ggaaagcaag ccctcgaaac cgtgcagcgg ttgcttcctg tgctctgcca ggccacggc	600
cttaccctc agcagggtgtt ggccatcgca agtaacggag gaggaaagca agccttggag	660
acagtgcacgc gcctgttgcc cgtgcgtgc caggcacacg gcctcacacc agagcaggc	720
gtggccatttgc ctcctcatga cggggggaaa caggctctgg agaccgttcca gaggctgtc	780
cccgccctct gtcaagctca cggccctgact ccccaacaag tggcgccat cgcctctaatt	840
ggcggcgaaa agcaggcact ggaaacagtgc cagagactgc tccctgtgtt tgccaaagct	900
catgggttga ccccccaaca ggtcgctcgat attgcctcaa acgggggggg caagcaggcc	960
ctttagactg tgcagaggct gttgccatgt ctgtgtcagg ctacggct cactccacaa	1020
cagggtgtcg caattgccag caacggcgcc ggaaagcaag ctgttgcac cgtgcacgc	1080
ctccgtcccg tgctctgtca ggctcatggc ctgacaccac aacaagtgtt ggccatcgcc	1140
agtaataatg gggggaaaca ggcttttgag accgtccaga ggctgtccc agtgcgtgc	1200
caggcacacg ggctgacccc cgagcagggt gtggctatcg ccagcaataat tggggcaag	1260
caggccctgg aaacagtcca ggcctgtcg ccagtgtttt gccaggctca cgggctact	1320
ccccagcagg tcgtggcaat cgcctcaac ggcggaggaa agcaggctct ggagaccgtg	1380
cagagactgc tgccgtctt tgccaggcc cacggactca cacctgaaca ggtcgctgcc	1440
attgccttc acatggggg caaacaagcc ctggagacag tgcagggct gttgcctgt	1500
ttgtgccaag cccacggctt gactcctcaa caagtggctcg ccatgcctc aaatggcgcc	1560
ggaaaacaag ctctggagac agtgcagagg ttgcgtcccg tccctgtcca agccacggc	1620
ctgactcccc aacaggctgtt cgcattgtcc agcaacaacg gaggaaagca ggctctcgaa	1680
actgtgcagc ggctgcttcc tggctgtgtt caggctcatg ggctgacccc cgagcaagtgc	1740
gtggctatttgc cctctaatgg aggcaagcaa gcccggatgaga cagtcacagag gctgttgcca	1800
gtgcgtgtcc agggccacgg gtcacaccc cagcagggtgg tgcgtcccg cagtaacaac	1860
ggggcaaaac aggcattggaa aaccgtccag cgcctgttc cagtcgtctg ccaggcacac	1920
ggactgacac ccgaacaggt ggtggccattt gcatccatg atggggcaaa gcaggccctg	1980

gagaccgtgc agagactcct gccagtgtt tgccaaagctc acggcctcac ccctcagcaa	2040
gtcgtggcca tcgcctcaaa cggggggggc cggcctgcac tggagagcat tggtgcccag	2100
ttatctcgcc ctgatccggc gttggcccg ttgaccaacg accaccttgt cgccctggcc	2160
tgcctcgcc ggcgtcctgc gctggatgca gtgaaaagg gattggggta tcctatcagc	2220
cgttccacgc tggtaagtc cgagctggag gagaagaaat ccgagttgag gcacaagctg	2280
aagtacgtgc cccacgagta catcgagatcg atcgagatcg cccgaaacag cacccaggac	2340
cgtatcctgg agatgaaggt gatggagttc ttcatgaagg tgtacggcta cagggcaag	2400
cacctggcg gctccaggaa gccccgacggc gccatctaca ccgtgggctc ccccatcgac	2460
tacggcgtga tcgtggacac caaggcctac tccggggct acaacctgcc catcgccag	2520
gccgacgaaa tgcagaggta cgtggaggag aaccagacca ggaacaagca catcaacccc	2580
aacgagtggt ggaaggtgta cccctccagc gtgaccgagt tcaagttctt gttcggtcc	2640
ggccacttca agggcaacta caaggcccag ctgaccaggc tgaaccacat caccaactgc	2700
aacggcggc tgctgtccgt ggaggagctc ctgatccggc gcgagatgtat caaggccgc	2760
accctgaccc tggaggaggt gaggaggaag ttcaacaacg gcgagatcaa cttcgccggcc	2820
gactgataa	2829

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 386

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; pCLS27068: CTLA4a expression plasmid

&lt;400&gt; 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 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 Asp Val Ser His Glu Asp Pro

195 200 205

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> Artificial Sequence

<220><223> 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
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
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
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly 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
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> Artificial Sequence

<220><223> 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 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

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> Human immunodeficiency virus type 1

<220><221>

> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

<223> HIV-1 virus, 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> Human immunodeficiency virus type 1

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

<223> HIV-1 virus, 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

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

<223> HIV-1 virus, 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> Human immunodeficiency virus type 1

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

<223> HIV-1 virus, 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

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

<223> HIV-1 virus, ISU peptide n? from gp41 env protein

<400> 23

Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Gln Asp

1                    5                    10

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

<223> HIV-1 virus, ISU peptide n? from gp41 env protein

<400> 24

Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Gln Asp

1	5	10
---	---	----

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 2

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

<223> HIV-2 virus, ISU peptide n? from gp41 env protein

<400> 25

Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Gln Asp

1	5	10
---	---	----

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 2

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(13)

<223> HIV-2 virus, ISU peptide n? from gp41 env protein

<400> 26

Leu Gln Ala Arg Val Thr Ala Ile Glu Tyr Leu Ala Asp

1	5	10
---	---	----

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 2

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

<223> HIV-2 virus, 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> Human immunodeficiency virus type 2

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

<223> HIV-2 virus, 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> Human immunodeficiency virus type 2

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(13)

<223> HIV-2 virus, 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> Human immunodeficiency virus type 2

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(14)

<223> HIV-2 virus, 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> Simian immunodeficiency virus

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(13)

<223> SIV virus, 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> Artificial Sequence

<220><223> MoMuLV virus, 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> Artificial Sequence

<220><223> HTLV-I, -2 virus, 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> Artificial Sequence

<220><223> MPMV, SRV-1 virus, ISU peptide from gp41 env protein

&lt;400&gt; 34

Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Thr Ala Glu Gln

1 5 10

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Syncitin 1 virus, ISU peptide from gp41 env protein

&lt;400&gt; 35

Leu Gln Asn Arg Arg Ala Leu Asp Leu Leu Thr Ala Glu Arg

1 5 10

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Syncitin 2 virus, ISU peptide from gp41 env protein

&lt;400&gt; 36

Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Met Leu Thr Ala Ala Gln

1 5 10

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; HERV-K virus, ISU peptide from gp41 env protein

&lt;400&gt; 37

Leu Ala Asn Gln Ile Asn Asp Leu Arg Gln Thr Val Ile Trp

1 5 10

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; FELV virus, ISU peptide from gp41 env protein

&lt;400&gt; 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>	Artificial Sequence	
<220><223>	Chimeric B2M-UL18	
<400>	39	
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
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
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 Ser		
130	135	140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Met		
145	150	155
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
Gly Thr Ile Ser Trp Met Ala Asn Val Ser Ala Ala Tyr Pro Thr Tyr		
225	230	235
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
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
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

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 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> Artificial Sequence

<220><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

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

<211> 313

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><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

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 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> Artificial Sequence

<220>

><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

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
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>	Artificial Sequence		
<220><223>	SP-ULBP2ed		
<400>	43		
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

145 150 155 160

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

<210> 44

<211> 206

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><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

Arg Asp Phe Leu Met His Arg Lys Lys Arg Leu Glu Pro Thr

195 200 205

<210> 45

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><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

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 Leu Pro Asp

210 215 220

<210> 46

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><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
-----	-----	-----

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> Artificial Sequence

<220><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 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 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

195 200 205

Ser Ala Gly

210

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(9)

<223> HIV-1 virus,FP polypeptide

<400> 48

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly

1 5

<210> 49  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> FP polypeptide  
<400> 49

Ala Gly Phe Gly Leu Leu Leu Gly Phe

1 5

<210> 50  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> FP polypeptide  
<400> 50

Ala Gly Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly

1 5

<210> 51  
<211> 59  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<220><221> gene  
<222> (1)..(59)  
<223> Target TRAC  
<400> 51

tgatcctttt gtcccacaga tatccagaac cctgaccctg ccgtgtacca gctgagaga 59

<210> 52  
<211> 2832  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> TALEN TRAC LEFT

<400> 52

atgggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc 60  
gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120

cagcaacagg agaagatcaa accgaagggtt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca	180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtcgta taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatgcag cggtgccaga ggcgacacac	300
gaagcgtatcg ttggcgtcgg caaacagtg tccggcgcac gcgccttgaa ggcctigtc	360
acggtgtggcg gagagttag aggtccaccc ttacagtgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagt gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcacacggc	600
ttgacccccc agcaggttgtt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgttgag	660
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg	720
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	780
ccggtgctgt gccaggcccc caaggcttgacc ccggagcagg tggtgccat cgccagcaat	840
attggtgca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccgggtgt gtgccaggcc	900
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atgcgcagca ataatggtgtt caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggtt gttggcggtg ctgtggcagg cccacggctt gaccccgag	1020
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcacacggc ttgacccccc agcaggttgtt ggccatcgcc	1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgttgag acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc	1200
caggcccacg gcttgacccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaataa tggtgcaag	1260
caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg ccgggtctgtt gccaggcccc cggcttgacc	1320
ccccacggcagg tggtgccat cgccagcaat aatggtgca agcaggcgct ggagacggtc	1380
cagcggtgt tgccgggtgt gtggcaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc	1440
atgcgcagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttggcggtg	1500
ctgtggcagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag caatattgtt	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcacacggc	1620
ttgaccccgagc agcaggttgtt ggccatcgcc agccacgatg gggcaagca ggcgttgag	1680
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagcaatat tggtgcaag caggcgctgg agacgggtca ggcgtgttg	1800
ccgggtgtgtt gccaggcccc cggcttgacc ccggagcagg tggtgccat cgccagccac	1860
gatggcggca agcaggcgct ggagacggcgc cagcggtgt tgccgggtgt gtggcaggcc	1920
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atgcgcagca ataatggtgtt caagcaggcg	1980

ctggagacgg tccagcggtc gttgccggcgt ctgtgccagg cccacggctt gaccctctag	2040
caggtgggtgg ccatcgccag caatggcgcc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc	2100
cagtttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtgccttg	2160
gcctgcctcg gcgggcttc tgccgtggat gcagtgaaaa agggattggg ggatcctatc	2220
agccgttccc agctggtaaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcacccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacagggc	2400
aagcacctgg gcggctccag gaagccgcac ggcccatct acaccgtggg ctccccatc	2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcgcc	2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtacccctcc agcgtgaccg agtcaagtt cctgttcgtg	2640
tccggccact tcaaggccaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg ccgtgctgctc cgtggaggag ctccgtatcg ggccgagat gatcaaggcc	2760
ggcacccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttaaca acggcgagat caacttcgca	2820
gccgactgat aa	2832
<210> 53	
<211> 2814	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> TALEN TRAC RIGHT

<400> 53

atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggta atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgcccgtatc acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttcggtcgac agtggcgacg caccacgagg cactggcg ccacgggtt	180
acacacgcgc acatcggtgc gttaagccaa cacccggcag cgttagggac cgtcgctgctc	240
aagtatcagg acatgatcgac agcggttgcca gaggcgacac acgaagcgat cggtggcg	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgtctg gaggccttgc tacgggtggc gggagagttg	360

agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcg	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcattt cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgacccccc agcaggttgtt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag	540
acgggtccacg ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcagg	600

gtggccatcg ccagcaataa tggggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	660
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tggggccat cgccagcaat	720
ggcggtgcca agcaggcgct ggagacggc cagcggtgt tgccgggtgt gtgccaggcc	780
cacggcttga ccccgagca ggtggtgcc atgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggtgtt gttggccagg cccacggctt gacccggag	900
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca gccccacggc ttgacccgg agcagggtgtt ggccatgccc	1020
agccacgatg gggcaagca ggccgtggag acggccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc	1080
caggcccacg gcttggccggc ggagcagggtg gtggccatcg ccagcaatat tggggcaag	1140
caggcgctgg agacggtgca ggccgtgtt ccgggtgtgtt ggccaggccca cggcttgacc	1200
ccggagcagg tggggccat cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggc	1260
cagcggtgt tgccgggtgtt gtggccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtggtgcc	1320
atgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttggccgtg	1380
ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag caggtggtgg ccacgatggc caataatgg	1440
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg ctgttgccgg tgctgtgcca gccccacggc	1500
ttgacccggc agcagggtgtt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggccgtggag	1560
acgggtcgagg cgctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttggccggc ccacgagggt	1620
gtggccatcg ccagcaatgg cggggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	1680
ccgggtgtgtt gccaggccca cggcttgacc cggaggcagg tggggccat cgccagcaat	1740
attgggtggca agcaggcgct ggagacgggtg caggcgctgt tgccgggtgt tgccaggcc	1800
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atgccagca atggcggtgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtgtt gttggccagg ctgtggccagg cccacggctt gacccggag	1920
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca gccccacggc ttgacccctc agcagggtgtt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc ggcgtggag agcattgttgc cccagtatac tcggccgtat	2100
ccggcggtgg ccccggttgc acacgaccac ctctgtcgct tggccgtgc cggggcggt	2160
cctgcgtgg atgcagtgaa aaaggatttggggatccat ttagccgttc ccacgtgggt	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agttaatgtt cgtccccac	2280
gagtacatcg agtgcgttgcgatccgg aacaggccac aggaccgtat cctggagatg	2340
aagggtgtgg agtcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaaggcacctt gggcggtcc	2400

aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggtacaac ctgcccattcg gccaggccga cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtgaaag	2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttccctgttcg tgtccggcca cttcaaggc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tccgtggagg agtcctgat cggcggcgag atgatcaagg cggcacccct gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814
<210> 54	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220><221> gene	
<222> (1)..(49)	
<223> Target TRAC-T01	
<400> 54	
ttgtccaca gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgaga	49
<210> 55	
<211> 2814	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TALEN TRAC T01 LEFT	
<400> 55	
atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggatc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgcccgtatc acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgac caccacgagg cactggtcgg ccacgggtt	180
acacacgcgc acatcggtgc gttaagccaa cacccggcag cgtagggac cgtcgtgtc	240
aagtatcagg acatgatcgc agcggtgccg gaggcgacac acgaaggatcgat cgttggcg	300
ggcaaaacagt ggtccggcgc acgcgtctg gaggcgttcg tcacgggtgc gggagatgt	360
agagggtccac cgttacagtt ggacacagggc caacttctca agattgcaaa acgtggcg	420
gtgaccgcag tggaggcgt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgacccccc agcaggttgtt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag	540

acgggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggecccacg gcttgaccgc ccagcaggta	600
gtggccatcg ccagcaataa tggtgttgcag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg	660
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat	720
ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtct gtgccaggcc	780
cacggcttga ccccgagca ggtgggtggcc atcgccagcc acatggcgg caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggtct tttggccagg ctgtggccagg cccacggctt gacccggag	900
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccgg agcaggtggt ggccatcgcc	1020
agccacgatg gggcaagca ggccgtggag acgggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1080
caggccccacg gcttggccatcg ccagcaataat tggtgttgcag	1140
caggcgctgg agacggtgca ggccgtgttgc cgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc	1200
ccggagcagg tggtgccat cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc	1260
cagggctgt tgccgggtct gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtgggtggcc	1320
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttggccgtt	1380
ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgacccgg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatgt gtggcaagca ggcgttggag	1560
acgggtcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggccccacg gcttggccatcg ccaggaggta	1620
gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	1680
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc cggagcagg tggtgccat cgccagcaat	1740
attggtgca agcaggcgct ggagacgggtc caggcgctgt tgccgggtct gtgccaggcc	1800
cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtct tttggccagg ctgtggccagg cccacggctt gacccggag	1920
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc gggctggag agcattgttgc cccagttatc tcggctgtat	2100
ccggcgctgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcgtgcct tggcctgcct cggcggcg	2160
cctgcgtgg atgcagtggaa aaagggtttt ggggatccatc tggccgttc ccagctggta	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280

gagtacatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aagggtatgg agttttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggccgcctcc	2400
aggaagcccg acggccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtatctgt	2460
gacaccaagg cctactccgg cgctacaac ctgcccattcg gccagggcga cggaaatcgg	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtgggtggaa	2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttccctgttcg tgtccggcca cttcaaggc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tccgtggagg agctcctgat cggccggcag atgatcaagg cggcacccct gaccctggag	2760
gagggtgagga ggaagttcaa caacggcag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814
<210> 56	
<211> 2832	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TALEN TRAC T01 RIGHT	
<400> 56	
atggcgcata ctaaaaagaa acgttaaggc atcgataagg agaccggcgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggtt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca	180
ctggcggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtcgat taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgac cggtggcaga ggcacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacatgg tccggcgcac ggcgtctgg ggccttgctc	360
acgggtggcg gagagtttag aggtccaccc ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcgtg gaggcgtgc atgcatggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gacccggag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgccca ggcacccggc	600
ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag	660
acgggtccagg ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcagggt	720
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgttgg agacggtcca ggcgtgttg	780
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc cggaggcagg tggtgccat cgccagcaat	840
attgggtggca agcaggcgct ggagacgggtg caggcgtgt tgccgtgt gtggcaggcc	900
cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	960

ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag	1020
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgtgccgg tgcgtgcca gccccacggc ttgacccccc agcaggtggt ggccatgcc	1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtcagc ggctgtgcc ggtgtgtgc	1200
cagggccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagaataa tggtgcaag	1260
cagggcgtgg agacggtcca gcggtgtt ccgggtctgt gccaggccc cggcttgacc	1320
ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat aatggtgca agcaggcgct ggagacggtc	1380
cagggctgt tgccgggtct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtgcc	1440
atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg	1500
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag caatattgg	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgtgccgg tgctgtgcc gccccacggc	1620
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgtg gggcaagca ggcgtggag	1680
acggtcagc ggctgttgcc ggtgtgtgc cagggccacg gcttgacccc ggagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagaatat tggtgcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgtgttg	1800
ccggtgtgt gccaggccc cggcttgacc cggagcagg tggtgccat cgccagccac	1860
gatggcggca agcaggcgct ggagacggc cagggctgt tgccgggtct gtgccaggcc	1920
cacggcttga cccccagca ggtggtgcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccttag	2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcgcc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc	2100
cagtatctc gcctgtatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtgccttg	2160
gcctgcctcg gccccgtcc tgcgtggat gcagtgaaaa agggatggg ggatcctatc	2220
agccgttccc agtggtaaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgccccggaa cagcacccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgtatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc	2400
aagcacctgg gccccgtccag gaagccccgac ggcgcacatct acaccgtggg ctccccatc	2460
gactacggcg tgatcggtt caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gccccatggc	2520
cagggccacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaagggt gtacccctcc agcgtgaccc agtcaagtt cctgttcgt	2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700

tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctccatgatcg gcggcgagat gatcaaggcc	2760
ggcacccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttaaca acggcgagat caacttcgct	2820
gccgactgat aa	2832
<210> 57	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220><221> gene	
<222> (1)..(49)	
<223> Target TRAC-T02	
<400> 57	
ttagaaagt tcctgtgatg tcaagctggt cgagaaaagc tttgaaaca	49
<210> 58	
<211> 49	
<212> DNA	
<213>	
> Homo sapiens	
<220><221> gene	
<222> (1)..(49)	
<223> Target TRAC-T03	
<400> 58	
tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc gatttgatt ctaaacaa	49
<210> 59	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220><221> gene	
<222> (1)..(49)	
<223> Target TRAC-T04	
<400> 59	
tatatacag acaaaactgt gctagacatg aggtctatgg acttcaaga	49
<210> 60	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	

<220><221> gene

<222> (1)..(49)

<223> Target TRAC-T05

<400> 60

tgaggcttat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaa 49

<210> 61

<211> 49

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> gene

<222> (1)..(49)

<223> Target TRBC\_T01

<400> 61

tgttttag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa aaggccaca 49

<210> 62

<211> 2814

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TALEN TRBC\_T01 LEFT

<400> 62

atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60

gctatcgata tcgcccgcata acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120

aaaccgaagg ttgcgttcgac agtggcgacg caccacgagg cactggcggcc 180

acacacgcgc acatcggtgc gttaaagccaa cacccggcag cgtagggac cgtcgctgtc 240

aagtatcagg acatgatcgc acgttgtcca gaggcgacac acgaaggcat cgtagggcgtc 300

ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgtctg gaggccttgc tcacggcggc 360

agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcgac 420

gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcattt cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480

ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgtggag 540

acgggtccagg ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcagggtg 600

gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg 660

cgggtgtgtt gccaggccca cggcttgacc cccccaggagg tggtgccat cgccagcaat 720

aatggtgca agcaggcgct ggagacggc cagcggtgt tgccgggtgt gtgccaggcc	780
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atgcgcagca atggcggtgg caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggtc gttgcccggc ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag	900
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg	960
ctgtgcccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccggc acgagggtgg ggccatcgcc	1020
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acgggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc	1080
caggcccacg gcttgacccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaataa tggggcaag	1140
caggcgctgg agacggtcca gcggtgttgc ccgggtctgt gccaggccca cggcttgacc	1200
ccggagcagg tggtgccat cgccagcaat attggggca agcaggcgct ggagacggtg	1260
caggcgctgt tgccgggtgt gtggccaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc	1320
atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtc gttgcccgg	1380
ctgtgcccagg cccacggctt gaccccgagg caggtggtgg ccatcgccag ccacgtggc	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcg ctgtgcccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgaccccg aggagggtgg ggccatcgcc agccacgtg gggcaagca ggcgtggag	1560
acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc cagggccacg gcttgacccc ggagcagggtg	1620
gtggccatcg ccagcaatat tggggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgtgttg	1680
ccgggtctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtgccat cgccagcaat	1740
ggcggtggca agcaggcgct ggagacggc cagcggtgt tgccgggtgt gtggccaggcc	1800
cacggcttga ccccgaggca ggtggtggcc atgcgcagcc acgatggcg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtc gttgcccggc ctgtgccagg cccacggctt gaccccgagg	1920
caggtggtgg ccatcgccag caatattggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtgcaggcg	1980
ctgtgcccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccttc acgagggtgg ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc ggcgctggag agcattgttg ccagtatc tcgcctgtat	2100
ccggcggtgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcgtcgct tggcctgcct cggggcg	2160
cctgcgtgg atgcagtgaa aaaggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280
gagtagatcg agctgatcg gatcgcccg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aagggtatgg agttttcat gaagggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggggctcc	2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgtatcg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcctatcg gccaggccga cgaaatgcag	2520

aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	acccaaacga	gtggtgaaag	2580
gtgtaccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaaggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcggcgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gagggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cgcccgactg	ataa	2814
<210>	63					
<211>	2832					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	TALEN TRBC_T01 RIGHT					
<400>	63					
atggcgcate	ctaaaaagaa	acgttaaggc	atcgataagg	agaccggcc	tgccaagt	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatc	gccgatctac	gcacgctcg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggt	cgttcgacag	tggcgcagca	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggtcg	taagccaaca	cccgccagcg	240
ttagggaccg	tcgtgtcaa	gtatcaggac	atgatcgac	cgttgcaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcg	caaacagtgg	tccggcgcac	gctcttgaa	ggccttgctc	360
acggtggcgg	gagagttag	aggtaaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgc当地	gtggcggcgt	gaccgcgt	gaggcagtgc	atgcattggc	aatgcactg	480
acgggtgccc	cgtcaactt	gaccccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatgg	540
ggcaaggcagg	cgtggagac	ggtccagcgg	ctgttgcgg	tgctgtgcca	ggccacggc	600
ttgacccccc	agcaggttgt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgttgag	660
acggtccagc	ggcgttgcc	ggtctgtgc	caggccccacg	gcttgacccc	ccagcagggt	720
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtgccag	caggcgtgg	agacggtcca	gcccgtgtt	780
ccgggtgtgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	840
aatggtgca	agcaggcgct	ggagacggc	cagcggctgt	tgcggtgct	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggct	gttgcggtg	ctgtgcagg	cccacggctt	gacccggag	1020
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgtggc	ggcaaggcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1080
ctgttgcgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgacccccc	agcaggttgt	ggccatcgcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgtgtgc	1200

caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	1260
caggcgctgg	agacggtcca	gcggctgttgc	ccgggtctgt	gccaggcccc	cggtttgacc	1320
ccccacgagg	tggtgccat	cgccagcaat	ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1380
cagcggtgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtgcc	1440
atcggccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcgct	gttgcgggt	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatgg	1560
ggcaagcagg	cgttgagac	ggtccagcg	ctgttgccgg	tgctgtgcc	ggcccacggc	1620
ttgacccccc	acaggtgtt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgtggag	1680
acggtccagg	ggcgttgcc	ggtgcgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcagggt	1740
gtggccatcg	ccagaataaa	tggtgccag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgttgtt	1800
ccgggtgtgt	gccaggcccc	cggttgacc	ccccagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	1860
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtgcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcgct	ttgcccgg	ctgtgcagg	ccacggctt	gaccctcag	2040
caggtggtgg	ccatcgccag	aatggcgcc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagtatctc	gccctgatcc	ggcgttgcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtgccttg	2160
gcctgcctcg	gccccgtcc	tgcgtggat	gcagtgaaaa	aggatgggg	ggatccatc	2220
agccgttccc	agctggtaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgcggcacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tgcggcgaa	cagcacccag	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacagggc	2400
aagcacctgg	gcccgtccag	gaagcccgac	ggcgccatct	acaccgtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgtatcggtt	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccatcgcc	2520
caggcccacg	aaaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agtcaagtt	cctgttcgt	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	cctgtgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gccccgagat	gatcaaggcc	2760
ggcacccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagtcaaca	acggcgagat	caacttcg	2820
gccgactgat	aa					2832
<210>	64					
<211>	50					
<212>	DNA					

<213> Homo sapiens

<220><221> gene

<222> (1)..(50)

<223> Target TRBC\_T02

<400> 64

ttcccacccg aggtcgctgt gttttagcca tcagaaggcag agatctccca	50
---	----

<210> 65

<211> 2814

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TALEN TRBC\_T02 LEFT

<400> 65

atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgccccatct acgcacgcgc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttccgttcgac agtggcgac caccacgagg cactggcg ccacgggtt	180
acacacgcgc acatcggtgc gttaagccaa cacccggcag cgtagggac cgctcgctgc	240

aagtatcagg acatgatcgc acgttgccca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcg	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgcctcg gaggccttgc tcacgggtgc gggagagttg	360
agagggtccac cgttacagtt ggacacaggg caacttctca agattgcaaa acgtggcg	420
gtgaccgcgc tgaggcgtgt gcatgcattgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctca	480
ttgaccccg agcagggtgtt ggccatcgcc agccacgatg gcccgaagca ggcgctgg	540
acggtccagg ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcagg	600
gtggccatcg ccagccacga tggcgcaag caggcgctgg agacggtcca gcgctgttg	660

ccgggtgtgt gccaggcccc caaggcttgacc ccggaggcagg tggtgccat cgccagccac	720
gatggcgca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccgggtgt gtgccaggcc	780
cacggcttga ccccgagca ggtggtgcc atgcgcagca atattggtg caagcaggcg	840
ctggagacgg tgcaggcgct gttggcggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag	900
cagggtggcc ccatcgccagg ccacgatggc ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcacggc ttgaccccg agcagggtgtt ggccatcgcc	1020
agccacgatg gcccgaagca ggcgctggag acggtccagg ggctgttgcc ggtgctgtgc	1080

caggccacg gcttgacccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagccacga tggcgcaag	1140
--	------

caggcgctgg agacggtcca gcggctgtt ccgggtctgt gccaggccc cggcttgacc	1200
cccccagcagg tggtgccat cgccagcaat aatggtgca agcaggcgct ggagacggtc	1260
cagcggtgt tgccgggtgt gtgccaggcc cacggcttga cccggagca ggtggtgcc	1320
atcggccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttggcggtg	1380
ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcggt ctgttgccgg tgctgtgcca ggcacggc	1500
ttgacccccc agcagggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgtggag	1560
acggttccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcagggtg	1620
gtggccatcg ccagcaatgg cggtgtcaag caggcgctgg agacggtcca ggcgtgttg	1680
ccgggtgtgt gccaggccc cggcttgacc cgggagcagg tggtgccat cgccagccac	1740
gatggcggca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccgggtgt gtgcaggcc	1800
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtt gttggcggt ctgtggcagg cccacggctt gacccggag	1920
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcacccggc ttgacccctc agcagggtggt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc ggcgtggag agcattgttgc cccagtatac tcgcctgat	2100
ccggcgttgg ccgcgttgc acacgaccac ctgcgtgcct tggcctgcct cggcggcgt	2160
cctgcgttgg atgcagtgaa aaaggatttggggatccat tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280
gagtacatcg agctgatcgat gatcgcccg aacagcaccc aggaccttat cctggagatg	2340
aagggtgatgg agttttcat gaagggtgtac ggctacaggg gcaaggcacct gggggctcc	2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcctatcg gccaggccga cggaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtgggtggaa	2580
gtgtacccct ccagcgtgac cgagttcaag ttccctgttgc tgccggccat cttcaaggc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cggcgtgt	2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg cggcacccct gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttgc cggccgactg ataa	2814
<210> 66	
<211> 2832	
<212> DNA	

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; TALEN TRBC\_T02 RIGHT

&lt;400&gt; 66

atggcgatc ctaaaaagaa acgtaaaggc atcgataagg agaccggc tgccaagg	60
gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cggtcgacag tggcgagca ccacgaggca	180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtcggt taagccaaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgac cgttgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcg caaacagtgg tccggcgcac gcgccttgaa ggccttgtc	360
acggtggcgg gagagtttag aggtccaccc ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcattggc caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gacccccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggccacggc	600
ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	660
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcagg	720
gtggccatcg ccagcaataa tggggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cggagcagg tggggccat cgccagcaat	840
attgttgcca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccgtgtc gtgcaggcc	900
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggct gttggccgg ctgtggcagg cccacggctt gacccggag	1020
caggtggtgg ccatcgccag caatattggt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg	1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggccacggc ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc	1140
agcaatggcg gtggcaagca ggctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc	1200
caggcccacg gcttgacccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagccacga tggggcaag	1260
caggcgctgg agacggtcca gggctgttg cgggtgtgtc ggaggccca cggcttgacc	1320
ccccaggcagg tggtgccat cgccagcaat ggctggcagca agcaggcgct ggagacggc	1380
cagggctgt tgccgtgtc gtgcaggcc cacggcttga cccggagca ggtggtgcc	1440
atcgccagcc acatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttggccgg	1500
ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggccacggc	1620
ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	1680

acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc cagggccacg gcttgaccgg ggagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg	1800
ccgggtctgt gccaggccca cggcttgacc ccccaggcagg tggtgccat cgccagcaat	1860
ggcggtgcca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgtgtc gtgccaggcc	1920

cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgt gg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagcggct gttggcggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccctcag	2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc	2100
cagtatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgccctt	2160
gcctgcctcg gccccgtcc tgcgtggat gcagtggaaa agggatggg ggatccatc	2220
agccgttccc agctggtcaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgccccgaa cagcacccag	2340

gaccgttatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacagggc	2400
aagcacctgg gcccgtccag gaagccgcac ggcccatct acaccgtggg ctccccatc	2460
gactacggcg tgcgttggaa caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccattggc	2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaagggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctttcg	2640
tccggccact tcaaggccaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctccgtatcg gcggcgagat gatcaaggcc	2760

ggcacccatga ccctggagga ggtgaggagg aagttaaca acggcgagat caacttcg	2820
gccgactgat aa	2832

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 557

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; murine, CD19 antigen

&lt;400&gt; 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
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
Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala		
145	150	155
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
Val Met Glu Thr Gly 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
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
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu		400
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 Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg  
 545 550 555  
 <210> 68  
 <211> 300  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> murine, 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  
 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> Artificial Sequence  
 <220><223> murine, 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  
 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

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 Gln Lys Thr

370 375

<210> 70

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> murine, 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

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 Val Pro 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
-----	-----	-----

<210> 71  
 <211> 184  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> murine, 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
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
Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu		
165	170	175
Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg		

180			
<210>	72		
<211>	993		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	murine, 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

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  
 Phe Ser Arg Lys Ser Phe Pro Cys Glu Gln Lys Gly Leu Asn 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

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 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 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  
 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> Artificial Sequence  
 <220><223> murine, CD33 antigen

&lt;400&gt; 73

Met Pro 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 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

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> Artificial Sequence

<220><223> murine, 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 Leu  
 35                    40                    45

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 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> Artificial Sequence

<220><223> murine, EGFRvIII

<400> 75

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala

1 5 10 15

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

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 Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe		
385	390	395
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
Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu		
465	470	475
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
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  
 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

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> Artificial Sequence

<220><223> murine, 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 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 His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro

130 135 140

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 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 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
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
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
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>	Artificial Sequence	
<220><223>	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
Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly		
20	25	30
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 Ala Cys Pro Tyr Ser		
50	55	60
Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro		
65	70	75
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 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
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 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
Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro		
245	250	255
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 Thr Lys Leu Glu Ile Thr		

290	295	300
Lys Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
305	310	315
Ser 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		
370	375	380
Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser		
385	390	395
400		
Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr		
405	410	415
Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala		
420	425	430
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Pro		
435	440	445
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala		
450	455	460
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly		
465	470	475
480		
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile		
485	490	495
Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Ser Leu Val		
500	505	510
Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe		
515	520	525
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly		
530	535	540

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg  
 545 550 555 560

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln  
 565 570 575

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp  
 580 585 590

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro  
 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> Artificial Sequence

<220><223>

> MMLV virus, 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 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 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  
 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 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  
 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 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

<210>      79

<211>      229

<212>      PRT

<213>      Artificial Sequence

<220><223>      MMLV virus, 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 Met Leu Arg Gly Val Ser

20                    25                            30

Arg Glu Pro Val Ser Leu Thr Leu Ala Leu Leu 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

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