



(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 덴마크(DK)

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

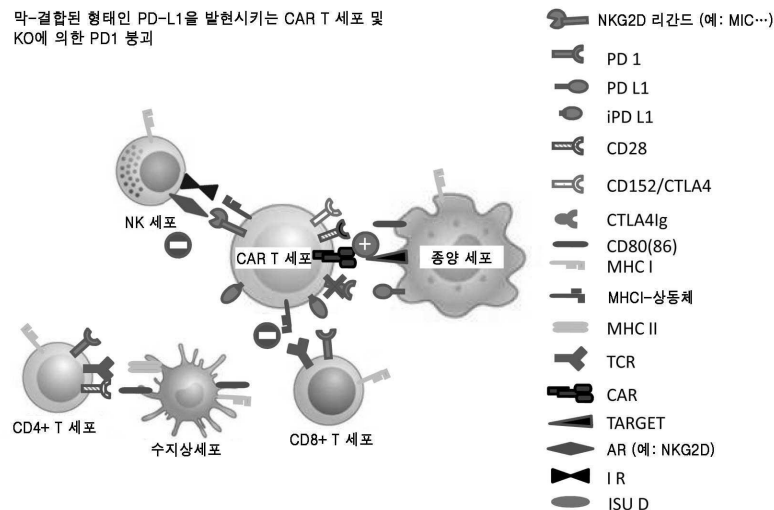
전체 청구항 수 : 총 41 항

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

(57) 요약

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 입수가 가능한 입양 면역요법을 위한 가능성을 가능하게 하며, 이로써 GVH의 위험이 감소된다.

대표도 - 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, 로렐

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 코딩하는 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 코딩하는 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 코딩하는 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 코딩하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,
발현되는 CTLA-4 면역글로불린들을 코딩하는 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 코딩하는 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 코딩하는 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 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 이 용함으로써 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 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 외인성 핵산 분자를 상기 T-세포 내로 도입하는 단계의 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), 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) and 서열번호 76 (WT1 항원)과 80% 동일성이 넘는, 바람직하게는 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 회귀-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 감염 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 감염 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(moiety)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 림프구들 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)를 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(graft) 거부(rejection) (HvG)로 명명된 과정으로, 이것은 이동된 세포들의 약효를 상당히 제한한다. 면역부적격(immune-incompetent) 숙주들에서, 동종이계 세포들은 이식되는 것은 가능하나, 그것들의 내생의 TCR 특이성들이 숙주 조직을 외래의 것으로 인식하여, 심각한 조직 손상 및 사망을 이끌 수 있는 이식편대(graft versus) 숙주(host) 질병(disease) (GvHD)을 야기한다. 동종이계 세포들을 효과적으로 이용하기 위하여 이들 문제점들 둘 다 극복되어야 한다.
- [0005] 면역적격 숙주들에서 동종이계 세포들은 숙주 면역 체계에 의하여 급하게 거부된다. 방사선조사되지 않은 혈액 제품들에 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 시토솔(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 알렘투주맵은 12 아미노산 글리코실포스파티딜

(glycosylphosphatidyl)-이노시톨(inositol)-(GPI) 연결된 당단백질인 CD52을 타겟팅하는 인간화된 단일클론 항체이다 (Waldmann and Hale 2005). CD52는 T 및 B 림프구들에서 높은 수준으로 그리고 단핵구에서 낮은 수준으로 발현되는 반면 과립구 및 골수 전구체들에서는 없다. 알렘투주맵(Alemtuzumab)으로 하는 치료, CD52에 대하여 항해지는 인간화된 단일클론 항체, 는 순환 림프구들 및 단핵구들의 급한 소모를 유도하는 것으로 보여져 왔다. 이식의 컨디셔닝(conditioning) 요법(regimen)의 부분들로서 특정 경우들 및 T 세포 림프종들의 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 헤테로다имер를 형성하기 위하여 조립되는 알파 및 베타, en 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 베�타 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 펩타이드 단편들에 의하여 활성화되어, MHC 제한으로 알려진, T 세포들에 의한 항원 인식에 추가의 관점(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 이물질들을 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 펩타이드들을 인식하나, 동종이식편반응의 경우, 외래 MHC 클래스 I을 지닌 세포들을 죽인다. MHC 클래스 I 분자들은 2 개의 독립체들로 이루어진다 : 매우 다형적인, 막관통 중쇄 및 작은 불변(invariant) 폴리펩타이드, B2M 유전자에 의하여 코드되는 $\beta 2$ -마이크로글로불린($\beta 2$ -m). 세포 표면에서 MHC 클래스 I 중쇄의 발현은 그것의 $\beta 2$ -m과의 관계를 요구한다. 이런 이유로, CAR T 세포들에서 $\beta 2$ -m 발현의 폐기는 MHC 클래스 I 발현을 손상시키고 그것들을 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 획득해왔다. 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. [Mangeny 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 (Mangeny 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) 펩타이드(peptide))로 명명된 두 번째 것은 단백질의 N 말단 부분에 위치하며, TCR알파 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 펩타이드로서 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. 이들 억제 경로들을 함께(co)-타는 종양들의 능력은 면역 내성에서 중요한 메커니즘을 나타내며 면역요법의 성공을 제한한다. 치료적 T-세포 면역 반응을 활성화시키는 유망한 접근들 중 하나는 이들 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 길항적(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 단백질들은 최근 연구에 기초한 치료적 봉쇄를 위한 유망한 타겟들을 나타낸다.
- [0012] W02013/173223A 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-12을 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 (W02013/173223A, 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 징후들에서, 치료로서 동종이제 CAR T 세포들을 사용하기 위하여, 환자에 의한 치료적 세포들의 거부 위험과 더불어 이식편대 숙주 질환(GvHD)의 위험을 완하시켜야 한다. 타생(allogenic) 세포들은 림프격감요법(regimen)을 받은 환자들에게서 생존할 수 있지만, 그것들의 치료적 활성화는 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 활성화될 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 향상시킬 수 있다는 것을 발견하였다. 더 좋은 약효를 위하여 이 국소적 면역억제 효과는 자가/비-자가 인식에 관여되는 유전자의 불활성화에 의하여 완성되며, 이식을 위한 이들 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 MHC I 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 CTLA-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, CTLA-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 변화없이 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 변화없이 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 MCHI 상동체를 발현시키는 CAR T 세포. 표시 (+)는 활성화를, 표시 (-)는 억제를 나타낸다. 종양 세포를 갖고 CAR T 세포 사이의 잠재적 상호작용이 변화하지 않고 남아 있다. 앞선 특징에 대하여 말하자면 (B2M KO 만), CAR T 세포 및 숙주 CD8+ T 세포 사이의 상호작용이 완화된다. 이 경우에, 바이러스 MCHI 상동체의 발현이 NK 세포와의 상호작용을 MCHI/억제인자 수용체를 통하여 작동하지 않게(inoperative) 만든다. 바이러스 MCHI 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 변화하지 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 또다른 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, 이들 동종이계 CAR T 세포들에 대한 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 코딩하는 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 특이적 세포 세포용해 활성.

도 16: T 세포들에서 β2-m 발현의 FACS 분석. 형질주입되지 않은 (왼쪽) 및 형질주입된 T 세포들 (중간 및 아래쪽)이 생존능력 (왼쪽) 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 (빛금친 막대) 또는 1/5000e 희석 (어두운 막대)에서 ELISA에 의하여 테스트된다. 희석 막대는 희석 둘 다로부터의 평균 적정(titer)를 나타낸다.

도 18: 기증자 1으로부터의 CFSE 음성 T 세포들의 정량화 (희석 막대들), 표시된 자극들에 대한 반응에서 CD3+ T 세포들 (검은 막대들) 및 T 세포들 생존능력들 (빛금친 막대들)의 정량화에 대한 혼합된 림프구들 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 발현 시킴) 및 대조군 음성 세포들 (Daudi)과 4 시간 동안 10:1의 E:T 비율로 배양되는 세포독성 분석. 타겟 세포 사망은 유동세포 분석법에 의하여 측정되고 비-특이적 죽이기 (Daudi)에 대하여 정규화된다.

도 20. (그래프로 나타난 대로) 다르게 조작된 CAR T 세포들이 특정 타겟 세포들 (MOLM-13) 및 대조군 음성 세포들 (Daudi)과 4 시간 동안 10:1 (빛금친 막대), 5:1 (어두운 막대들) 및 1:1 (희석 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, 힌지, 막관통 도메인 (TM), 공-자극 도메인 (4-1BB) 및, 선택적으로 링커(들)을 갖는, 신호전달(signaling) 전달(transduction) 도메인 (CD3제타).

표 1: β2m 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 그것들의 이식을 쉽게 함으로써 면역요법 목적들에 적합하게 그것들을 만들고, 이로써 이식편대(graft versus) 숙주(host) 질병(disease) (GvHD)의 위험이 감소되는 방법들을 개시한다. 더욱 특히, 본 발명은 자가 또는 비-자가 항원 인식에 관여되는 폴리펩타이드를 코딩하는 적어도 하나의 내생의 유전자가 하나의 면역 세포들에서 불활성화되고, 뒤이어 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드와 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 회귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 수행된다.
- [0021] 추가의 측면에서, 숙주-대-이식(host-versus-graft) (HvG)- 즉 그것들 동종이게 이동된 면역 세포들을 공격하는 숙주 면역 세포들-에 의하여 입양으로 이동된 동종이게 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 코딩하는 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, 특허 출원들, 특허들 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 코딩하는 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 코딩하는 유전자의 발현의 불활성화를 추가적으로 포함하는 방법.
- [0042] 8) 예 7에 있어서, PD-1 유전자의 불활성화는 서열번호 11-12 및 13-14의 TALE-뉴클레아제들을 코딩하는 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 코딩하는 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 동종이계 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 서열번호: 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 동종이계 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 동종이계 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 면역 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 동종이계 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 동종이계 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 동종이계 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 적어도 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 폴리펩타이드에서 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, 징크(zinc)-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 불활성화는 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 유전자는 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 발견되는 적어도 하나의 항원에 대하여 항해지는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 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 체 인들)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 코딩하는 적어도 하나의 내생의 유 전자를 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 존 재하는 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 코딩하는 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 면역억 제 폴리펩타이드는 PD-L1 리간드인 방법.
- [0097] 6) 예 5에 있어서, 발현되는 막-결합된 형태의 PD-L1 리간드를 코딩하는 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 코딩하는 적어도 하나의 내생이 아닌 폴리뉴클레오타이드의 상기 면역 세포들에서의 발현에 의하여 수행되는 방법.
- [0100] 9) 예 8에 있어서, 발현되는 CTLA-4 면역글로불린들을 코딩하는 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 코딩하는 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 코딩하는 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 코딩하는 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 코딩하는 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 코딩하는 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 코딩하는 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 코딩하는 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 코딩하는 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 코딩하는 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 코딩하는 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 체 인들)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 코딩하는 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 부여되는 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 세포들 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 회귀-절단 엔도뉴클레아제의 발현에 의존하여, 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 하나의 타겟인 유전자에서 절단을 특이적으로 촉매화하여, 이로써 상기 타겟인 유전자를 불활성화시킨다. 회귀-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 NHEJ는 절단 부위에서 DNA 서열의 변화들을 가끔 야기하는 불완전한 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 녹아웃(knockouts)을 만드는데 사용될 수 있다. 상기 변형은 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 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] 엔도뉴클레오티릭(endonucleolytic) 손상들은 상동 재조합의 속도(rate)를 자극하는 것으로 알려져 있다. 이런 식으로, 또다른 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; Mussolino, 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 W02014189628에 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 $\beta 2m$ 의 불활성화를 위하여 서열번호: 2-3, 5-6 및 8-9로 구성되는 군으로부터 선택되는 타겟 서열을 인식하고 절단하는 것들이다.
- [0181] 인간 $\beta 2m$ 을 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]

표 1

타겟 명칭	서열번호:	반(Half) TALE-뉴클레아제 서열
T01 베타 2 M 타겟	1	TCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCT A
T01 TALEN 베타 2 M 왼쪽	2	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATACGATGTTCCAGA TTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGG AGAAGATCAAACCGAAGTTTCGTTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGT CGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGT TAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGAC ACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAG GCCTTGCTCACGGTGGCGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAG GCCAATTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCGAGTGCA TGATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCACTTGACCCCCAGCAGGTGG TGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCT GTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATC GCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCC ACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGT GCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGG CGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCC CAGGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGC AGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTG GACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTG GAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGG AGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG TGACGGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCCAGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGC CGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAG CAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGT GTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAAT GGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAG GCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGG CTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGA CGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCTAGCAGGTGGTGG

[0184]

		CCATCGCCAGCAATGGCGGCGGAGGCCGCGCTGGAGAGCATTGTTGCCAGTT ATCTCGCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCTTGG CCTGCCTCGGCGGGCTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCC TATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTG AGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCC GGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAA GGGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCCAGGCGC CATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCTGGACACCAAGGCT ACTCCGGCGGTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGT GGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCAACGAGTGGTGAAGGT GTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTGTTCTGTTCCGGCCACTTCAAGG GCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAGTCAACGGCGCC GTGCTGTCCTGGAGGAGCTCTGATCGCGCGGAGATGATCAAGGCCGGCACCC TGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGG CCGACTGATAA
T01 TALEN 베타 2 M 오른쪽	3	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTATCGATAAGGAGACCGCGCTGCCA AGTTCCAGAGACAGCACATGGACAGCATGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGG CTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCTGTCGACAGTGCGG CAGCACCCAGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTT AAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATC GCAGCGTTGCCAGAGGCGACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGT CCGGCGCAGCGCTCTGGAGGCTTGTCTACGCTGGCGGAGAGTTGAGAGGTCC ACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAATTCTCAAGATTGCAAACGTGGCGGCGTGA CCGCAAGTGGAGGAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCGCTCAA CTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGCTGCAGGCGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGG CCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGT GCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGCAGCAGGTGGTGGCCATCGCC AGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTG CTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACG ATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCA GGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGC AAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACG GCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGC GCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACC CCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGA CGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGCAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGC GGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGC CATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTG CCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCA GCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGT GTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATT

[0185]

		GGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGACAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAG GCCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGG CTTGACCCCGAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGAAGCAGGCG CTGGAGACGGTGACAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CTCAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGCAGGCGCGCTGGAGA GCATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGAC CACCTCGTCGCTTGGCCTGCTCGGCGGGCGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAGGAG GGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAG AAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGC TGATCGAGATCGCCCGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGAT GGAGTTCTTATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGCGGCTCCAGG AAGCCGACGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGCGGTGATCGT GGACACCAAGGCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCGGACGAA ATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCAAACG AGTGGTGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTGTTGCTGTC GGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAAGGCTGAACCATACCAAA CTGCAACGCGCGCTGCTGTCCTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATC AAGGCCGCGCACCTGACCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAG ATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA
T02 베타 2 M 타겟	4	TCCAAAGATTCAAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAA
T02 TALEN 베타 2 M 왼쪽	5	ATGGGCGCATCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATACGATGTTCCAGA TTACGCTATCGATATCGCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGG AGAAGATCAAAACCGAAGGTTGTTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGT CGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGT TAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGAC ACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAACAGTGGTCCGGCGCAGCGCTCTGGAG GCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAG GCCAATTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAAGTGCA TGATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGACCCGGAGCAGGTG GTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGG CTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGCCA TCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCC GGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGC AATATTGGTGGAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGACAGCGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATATTGG TGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGACGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGAAGC AGGCGCTGGAGACGGTGACGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTT GACCCCCAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGAAGCAGGCGCTG GAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGG AGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGAAGCAGGCGCTGGAGACGG TGACGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGT GGTGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCG

[0186]

		<p>GCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGCC ATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTTGC CGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGCCATCGCCAG CCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTTGCCGGTGCTG TGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATATTG GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGACGGCGCTTTGCCGGTGCTGTGCCAGG CCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATAATGGTGCCAA GCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGC TTGACCCCCAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATAATGGTGCCAAAGCAGGCGC TGGAGACGGTCCAGCGGCTTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCC CCAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAG GTGGTGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTG CCATCGCCAGCAATGGCGGCGCAGGCCGCGCTGGAGAGCATTGTTGCCAGTT ATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCTTGACCAACGACCACCTCGTCGCTTG CCTGCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGCAAGTGAAGAGGATTGGGGATCC TATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTG AGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCC GGAACAGCACCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAA GGTGATCGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGC CATCTACACGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGACACCAAGGCCT ACTCCGGCGGTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGT GGAGGAGAACCAGACAGGAACAAGCACATCAACCCACGAGTGGTGGAAGGT GTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTGTTGCTGTCGGCCACTTCAAGG GCACTACAAGGCCAGCTGACAGGCTGAACCACATCACCAGTGAACGGCGCC GTGCTGTCGTGGAGGAGCTCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCC TGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGG CCGACTGATAA</p>
T02 TALEN 베타 2 M 오른쪽	6	<p>ATGGGCGATCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGACCGCGCTGCCA AGTTTCAGAGACAGCACATGGACAGCATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGG CTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCTGACAGTGCGG CAGCACACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTT AAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATC GCAGCGTTGCCAGAGGCGACACAGAGCGATCGTTGGCGTCGGCAACAGTGGT CCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCC ACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAATTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGCGTGA CCGAGTGGAGGCAAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCGCTCAA CTTGACCCCCAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATAATGGTGCCAAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CGGAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAATATTGGTGCCAAAGCAGGCGCTGGAGA CGGTGCAGGCGCTTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCA GGTGGTGCCATCGCCAGCCAGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCA GCGGCTTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGCTG TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGCCATCGC CAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTTGCCGGT GCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGCCATCGCCAGCAAT</p>

[0187]

		<p>GGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGC CAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCG GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCA CGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAG GCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGA CCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGA GACGGTGACGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAG CAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTC CAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGG TGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGC TGTGCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCAT CGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCC GGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGC AATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGG CGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC CAGCGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGC AGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTT GACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGCAGGCCGCGCTG GAGAGCATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCTTGACCAA CGACCCTCGTCGCTTGCCCTGCTCGGCGGCGCTCCTGCGCTGGATGCACTGA AAAAGGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGA GGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATC GAGCTGATCGAGATCGCCCGAAGCAGCACCAGGACCGTATCTGAGATGAAGG TGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTC CAGGAAGCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTG ATCGTGAGACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCGA CGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCC AACGAGTGGTGGAAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCTG GTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCATCA CCAATGCAACGGCGCGCTGCTGCTCGGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGAT GATCAAGGCGGCAACCCTGACCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGG CGAGATCAACTCGCGGCCGACTGATAA</p>
T03 베타 2 M 타겟	7	<p>TTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCTATCCA</p>
T03 TALEN 베타 2 M 왼쪽	8	<p>ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATACGATGTTCCAGA TTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGG AGAAGATCAAACCGAAGGTTCTGTCGACAGTGCGCAGCACCACGAGGCACTGGT CGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGT TAGGGACCGTCGCTGCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGAC ACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGTTCCGGCGCACGCGCTCTGGAG GCCTTGCTCAGGTTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAG GCCAATTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCACTGCA TGATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCACTTGACCCCGGAGCAGGTG GTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAAGCG</p>

[0188]

	<p>CTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCAT CGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCC ACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGG TGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGC AGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTT GACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTG GAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCC AGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG TCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGC CGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAG CCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTG TGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATG GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGC CCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAG CAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCT TGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCT GGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCG GAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACG GTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAGGCGGCGCTGGAGAGCATTGTTGCCAGTTAT CTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCTTGGCC TGCCCTCGGCGGCGCTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCCTA TCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAG GCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGG AACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGG TGACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCGACGGCGCCAT CTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGACACCAAGGCCTACT CCGGCGGCTACAACTGCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGA GGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGAAGGTGTAC CCCTCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCTGTGTCGGCCACTTCAAGGGCAA CTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCAACCACTGCAACGGCGCCGTGC TGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCTGAC CCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGA CTGATAA</p>
--	---

[0189]

T03 TALEN 베타 2 M 오른쪽	9	<p>ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGACCGCCGCTGCCA AGTTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGG CTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAAACGAGGTTCTTCGACAGTGGCG CAGCACACAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTT AAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGCAAGTATCAGGACATGATC GCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGT CCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCC ACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGGCTGA CCGCGTGGAGGAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAA CTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAG GTGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAG GCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGG CCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT GCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC AGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTG TGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAAT GGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAG GCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGG CTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGA CGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCA GGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCA GCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGT TGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGC CAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTG CTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAA TGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAG GCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGG CTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGACGGCCGGCGCTGGAGA GCATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGAC CACCTCGTCGCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCTCCTGCGCTGGATGCAGTGA AAAA GGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAG AAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGC TGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGAT GGAGTTCTTATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGCGGCTCCAGG AAGCCGACGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGT GGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCGACGAA ATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACG AGTGGTGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTGTTCTGTGTC GGCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAAGGCTGAACCATCACCAA</p>
----------------------------------	---	--

		<p>CTGCAACGGCGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATC AAGGCCGGCACCTGACCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAG ATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA</p>
--	--	--

표 1: $\beta 2m$ TALE-뉴클레아제들 서열들의 기재

인간 PD-1 유전자를 절단하는 TALE-뉴클레아제들

자가 및 비-자가 항원 인식에 수반되는 상기 유전자의 불활성화에 추가하여, 추가의 유전적 조작이 W02014/184744에 기재된 대로의 번역 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 프로그래밍(Programmed) 사망(Death) 1에 대응한다. 바람직하게는 TALEN-매개 붕괴에 의한, 이 PD-1 억제제는 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_T 01	TTCTCCCCAGCCCTG CT cgtggtgaccgaagg GGACAACGCCACCTTCA (서열번호: 10)	PDCD1_T01-L TALEN (서열번호: 11)
		PDCD1_T01-R TALEN (서열번호: 12)
PDCD1_T 03	TACCTCTGTGGGGC CAT ctccctggccccc GGCGCAGATCAAAGAGA (서열번호: 13)	PDCD1_T03-L TALEN (서열번호: 14)
		PDCD1_T03-R TALEN (서열번호: 15)

[0197]

[0198] 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 또다른 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.

[0202] **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 계통 내로 들어온 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.
- [0211] **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	MGGVLLTQRTLLSLVALLFSPMASMAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYAS PGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVN LTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQDEPKSS DKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGS
pCLS27066	CTLA4b 발현 플라스미드	17	MGGVLLTQRTLLSLVALLFSPMASMAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYAS PGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVN LTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQDEPKSS DKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGS
pCLS27069	PD-L1 발현 플라스미드	18	MGRIFAVFIMTYWHLLNAFTVTPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLA ALIVYWEMEDKNIIQFVHGEECLKVQHSSYRQRARLLKDLQSLGNAALQITDV KLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCA EGYPKAEVIWTSDDHQVLSGKTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFR RLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGMM DVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEETGS

[0216]

[0217] 표 3: CLTA-4a, CTLA-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.

[0219] **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 막관통 도메인 및 30 아미노산들의 세포질 꼬리로 구성되는 290 아미노산들의 타입 I 막관통 단백질을 코딩한다.

[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 코딩하는 핵산 분자는 서열번호:18이고, 또는 (PDL1-리간드의 야생형에 대응되는) 서열번호:18과 적어도 80%, 바람직하게는 90% 그리고 더욱 바람직하게는 95%의 동일성을 공유한다.

[0224] 또다른 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 억제(을) 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 KO에 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 KO에 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.
- [0232] ISU 도메인의 발현
- [0233] 또다른 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(immunosuppressive) 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	기원
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

- [0236]
- [0237] 표 4: 다양한 바이러스들로부터의 ISU 도메인 변종들
- [0238] 따라서, 특정 예들에서, 상기 동종이계 면역 세포들에서 발현되는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 서열번호

호 19-38의 ISU 도메인이다.

[0239] 바이러스 MHC 상동체의 발현

[0240] 또다른 예에 따라, 상기 동종이계 면역 세포들에서 발현되는 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드는 예컨대 UL18 과 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 7 에 도식적으로 나타나 있다 (바이러스 MHC 상동체의 발현). 도면들 둘 다에서 MHC 클래스 I은 베타2M 유전자를 붕괴시킴 (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 붕괴시킴 (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	MALPVTALLPLALLHAARPSRSVALAVLALLSLGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLN CYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWVSFYLLYYTEFTPEKDEYACRVNHNVTLS QPKIVKWDRDMGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGMTMWCLTLFVLWMLRVVGMHVLRY GYTGIFDDTSHMTLTVVGIFDQGFFTYHVNSSDKASSRANGTISWMANVSAAPTYLDGE RAKGDILFNQTEQNLELEIALGYRSQSVLTWTHECNTTENGSTVAGYEGFGWDGETLMELK DNLTLWTGPNYEISWLKQNKTYIDGKIKNISEGDTTIQRNYLKGNCQWVSIYSFGQTPVTH PVVKGGVNRQNDNRAEAFCTSYGFFPGEINITFIHYGNKAPDDSEPQCNPPLPTFDGTFHQG CYVAIFCNQNYTCRVTHGNWTVETPISVTPDSSSSGEVDPDHTANKRYNTMTISSVLLALL CALLFAFLHYFTTLKQYLRNLAFAWRYRKVRSS
SP-MICAed	40	MGGVLLTQRTLLSLVALLFSPMASMEPHSLRYNLTVLSWDGSGVQSGFLETVHLDGGQPFRLC DRQCRAPQGGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEI CEIHEDNSTRSSQHFYDGEFLSQNLTKETWMPQSSRAQLAMNVRNFLKEDAMKTKTH YHAMHADCLQELRRYLKSGVLRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWR QDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNQTYQTWVATRICQGEERFTCYMEHSGNHSTHPVPSG KVLVLQSHW
SP-MICBed	41	MGGVLLTQRTLLSLVALLFSPMASMAEPHSLRYNLMVLSQDESQSGFLAEGHLDGGQPF RYDRQKRRAPQGGQWAEDVLGAKTWDTEDELTENGQDLRRTLTHIKDQKGGHLSLQEI VCEIHEDSSTRGRSHFYDGEFLSQNLTKETVTPQSSRAQLAMNVTNFWKEDAMKTKTH HYRAMQADCLQELRRYLKSGVAIRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWR QDGVSLSHNTQQWGDVLPDGNQTYQTWVATRICQGEERFTCYMEHSGNHSTHPVPSG KVLVLQSQRTD
SP-ULBP1ed	42	MGGVLLTQRTLLSLVALLFSPMASMGWVDTHCLCYDITVTPKSRPEQWCEVQGLVDERP FLHYDCGNKTVTPVSPGLGKKNVTAWKAQNPVLRVVDILTEQLRDIQLENYTPKEPLTLQA RMSCEHAEGHSGSWQFSDGQIFLLFDSNNRKWTALHPGAKKMEKWEKNRDTMF FQKISLGDCKMWLEEFLLMYEQMLDPT
SP-ULBP2ed	43	MGGVLLTQRTLLSLVALLFSPMASMGRADPHSLCYDITVTPKSRPEQWCEVQGLVDERP FLHYDCGNKTVTPVSPGLGKKNVTAWKAQNPVLRVVDILTEQLRDIQLENYTPKEPLTLQA RMSCEQAEGHSGSWQFSDGQIFLLFDSNNRKWTALHPGAKKMEKWEKNRDTMF FHYFSMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAG
SP-ULBP3ed	44	MGGVLLTQRTLLSLVALLFSPMASMDAHSWYNFTIHLPRHGQWCEVQSQVDQKNFL SYDCGSDKVLMSGHLEEQLYATDAWGKQLEMLREVQRLRLADLEDFTPSGPLTLQV RMSCEADGYIRGSWQFSDGQIFLLFDSNNRKWTALHPGAKKMEKWEKNRDTMF MVSMRDCKSWLRDFLMHRKKRLEPT
SP-N2DL4ed	45	MGGVLLTQRTLLSLVALLFSPMASMHSLCFNFTIKSLRPGQPWCEAVFLNKNFLQYNS DNNMVKPLGLGKKNVTATSTWGETLQTLGEVGRDLRMLCDIKPQKTSDDPSTLQVEMFCQ REAERCTGASWQFATNGEKSLFDAMNMTWTVINHEASKIKETWKKDRGLEKYFRKLSKG DCDHWLREFLGHWEAMPEPTVSPVNASDIHWSSSLPD
SP-RET1Ged	46	MGGVLLTQRTLLSLVALLFSPMASMGLADPHSLCYDITVTPKSRPEQWCEVQGLVDERP FLHYDCGNKTVTPVSPGLGKKNVTMAWKAQNPVLRVVDILTEQLRDIQLENYTPKEPLTLQ MSCEQKAEGHSGSWQFSDGQIFLLFDSNNRMWTTVHPGARKMKEKWEKNRDTMF FHYISMGDCTGWLEDFLMGMDSTLEPSAGAPPTMSSGTAQPR
SP-RAETIed	47	MGGVLLTQRTLLSLVALLFSPMASMRRDDPHSLCYDITVTPKSRPEQWCEVQGLVDERP FLHYDCGNKTVTPVSPGLGKKNVTMAWKAQNPVLRVVDILTEQLRDIQLENYTPKEPLTLQ ARMSCEQKAEGHSGSWQFSDGQIFLLFDSNNRMWTTVHPGARKMKEKWEKNRDTMF SFHYISMGDCTGWLEDFLMGMDSTLEPSAG

[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									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	기원
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] 비(non) 동종반응성 및 면역억제 내성 T 세포들

[0256] 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 회귀-절단 엔도뉴클레아제들을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드들, 벡터들이 포함된다.

[0260] 본 발명의 범위에는 또한 세포들을 조작하기 위한 상기 방법에 의하여 획득되기에 민감한 분리된 세포들 또는 세포주들, 특히 T 세포들과 같은 동종이계 면역 세포들이 포함되고, 이때 자가 및 비-자가 항원 인식에 관여되는 폴리펩타이드를 코딩하는 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 코딩하는 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 코딩하는 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(effector) 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. 이들 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 W02013176915에 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 뉴클레오타이드 서열들 및 그것들의 대응하는 왼쪽 및 오른쪽 TALEN을 나타낸다. 추가의 서열들은 출원 W02014/184741 and W02014/184744에서 찾을 수 있다.

표 7

타겟	타겟 서열	반 TALE-뉴클레아제
TRAC_T00	TGATCCTCTTGCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg CCGTGTACCAGCTGAGAGA (SEQ ID NO 51)	TRAC_T00-L TALEN (서열번호: 52)
		TRAC_T00-R TALEN (서열번호: 53)
TRAC_T01	TTGTCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg CCGTGTACCAGCTGAGAGA (서열번호: 54)	TRAC_T01-L TALEN (서열번호: 55)
		TRAC_T01-R TALEN (서열번호: 56)
TRAC_T02	TTTAGAAAGTTCCTGTG atgtcaagctggctg AGAAAAGCTTTGAAACA (서열번호: 57)	
TRAC_T03	TCCAGTGACAAGTCTGT ctgcctattcaccga TTTTGATTCTCAAACAA (서열번호: 58)	
TRAC_T04	TATATCACAGACAAAAC tgtgctagacatgag GTCTATGGACTTCAAGA (서열번호: 59)	
TRAC_T05	TGAGGTCTATGGACTTC aagagcaacagtgt GTGGCCTGGAGCAACAA (서열번호: 60)	
TRBC_T01	TGTGTTTGAGCCATCAG aagcagagatctccc ACACCCAAAAGGCCACA (서열번호: 61)	TRBC_T01-L TALEN (서열번호: 62)
		TRBC_T01-R TALEN (서열번호: 63)
TRBC_T02	TTCCACCCGAGGTCGC tgtgtttgagccatca GAAGCAGAGATCTCCCA (서열번호: 64)	TRBC_T02-L TALEN (서열번호: 65)
		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 대하여 향해지는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 뉴클레오타이드 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 펩타이드, 헤레굴린(heregulin) 또는 an IL-13 뮤테인(mutein), 항체 결합 도메인들, 항체 추가 변 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 세포의 리간드-결합 도메인 및 상기 막관통 도메인 사이의 스토크(stalk) 영역을 더 포함할 수 있다. 여기에서 사용되는 용어 "스토크 영역"은 일반적으로 세포의 리간드-결합 도메인에 대하여 막관통 도메인을 연결하는 기능을 하는 임의의 올리고- 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 특히 스토크 영역은 세포의 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 세포의 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 멤버 패밀리의 세포질내의 꼬리에 의하여 대체된다. 공자극 TNFR 패밀리의 멤버의 세포질 꼬리는 주요(major) 보존된 모티프 (P/S/A)X(Q/E/E) 또는 마이너한(minor) 모티프 (PXQXXD)로 구성되는 TRAF2 결합 모티프들을 포함하는데, 이때 X는 임의의 아미노산이다. TRAF 단백질들은 수용체 트리머화(trimerization)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. 또다른 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 세포의 리간드 결합-도메인;

[0301] o CD8알파, FcεRIII감마 및 IgG1로 구성되는 군으로부터 선택되는 힌지;

[0302] o CD8 α 막관통 도메인;

[0303] o CD3 제타 신호전달(signaling) 도메인을 포함하는 세포질 도메인 및;

[0304] o 4-1BB 공-자극 도메인.

[0305] 을 포함한다.

[0306] 막관통 도메인 (즉 CD8 α TM), 공-자극 도메인 (즉 4-1BB), 힌지 (CD8알파, FcεRIII감마, 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.

[0308] 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) 세포의 리간드-결합 도메인 및 FcεRI 알파 체인의 막관통 도메인을 포함하는 하나의 폴리펩타이드,

[0311] b) FcεRI 베타 체인의 막관통 도메인 및 N- 및 C-말단 세포질 꼬리의 부분을 포함하는 하나의 폴리펩타이드 및/또는

[0312] c) FcεRI 감마 체인의 막관통 도메인 및 세포질내의 꼬리의 부분을 각자 포함하여, 이로써 다른 폴리펩타이드들이 다이머, 트리머 또는 테트라머 CAR를 형성하기 위하여 자발적으로 멀티머화하는, 두 개의 폴리펩타이드들.

[0313] 본 발명의 CAR는 또한 전술한 바와 같이, "멀티-체인 CAR들"일 수 있고, 이는 세포의 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 세포의 리간드-결합 도메인에 의하여 FcεRI 알파 체인의 높은 친화성(affinity) IgE 결합 도메인을 대체함으로써 FcεRI로부터 유래될 수 있는 반면 (Ravetch et al, 1989), FcεRI 베타 및/또는 감마 체인들의 N 및/또는 C-말단 꼬리들은 각각 신호 전달(transducing) 도메인들 및 공-자극 도메인들에 융합된다. 세포의 리간드 결합 도메인은 세포 타겟들을 향한 T-세포 특이성의 방향전환의 역할을 갖는 반면, 신호 전달(transducing) 도메인들은 면역 세포 반응을 활성화시키거나 또는 감소시킨다. FcεRI로부터의 알파, 베타 및 감마 폴리펩타이드들로부터 유래되는 다른 다른 폴리펩타이드들이 막인접(juxtamembrane) 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 펩타이드인 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 기술한 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.

[0322] 이중특이적(bispecific) 항체들

[0323] 추가의 예에 따라, 기술한 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 림프구 항원 및 종양 마커에 대항하여 항해지고, 종양들에 대항하여 임의의 순환 T 세포들을 다시 항하게 하고 활성화시키는 잠재력을 갖는다.

[0324] 전달 방법들

[0325] 기술한 다른 방법들은 세포 내로 선택적으로, 외인성 핵산 또는 DNA-말단 가공 효소로, pT알파(alpha) 또는 그것의 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 펩타이드를 코드하는 서열과 같은 라이보솜 스킵 서열을 코드하는 핵산 서열을 포함하는 하나의 벡터 내에 포함될 수 있다. 피코르나바이러스들(picornaviruses)의 아프토바이러스(Aphthovirus) 서브그룹(subgroup)에서 확인된 2A 펩타이드들은 코돈들에 의하여 코드되는 두 아미노산들 사이의 펩타이드 결합의 형성 없이 하나의 코돈으로부터 옆으로 라이보솜 "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 라이보솜에 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 라이보솜 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 펩타이드들은 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 situ로 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 계층 내로 통합되는 안정적인 형질전환(transformation) 방법들, 폴리뉴클레오타이드 구조체가 세포 계층 내로 통합되지 않는 일시적인 형질전환(transformation) 방법 및 바이러스 매개 방법들을 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드들은 예를 들어, 재조합 바이러스 벡터들 (예컨대 레트로바이러스들, 아데노바이러스들), 리포솜(liposome) 등에 의하여 세포 내로 도입

될 수 있다. 예를 들어, 일시적 형질전환 방법들은 미세주입, 전기천공법 또는 입자 총을 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드들은 벡터들, 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 사이토펠스(cytoPulse) 기술을 사용하였다. PulseAgile (Collectis property)의 이용에 기초한 그 기술, 전기천공 파형들은 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 옮기는 것을 가능하게 한다. 본 발명의 한 측면에서, 본 발명자는 T 세포들에서 다른 종류의 단백질을 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 ms를 갖는 전압 범위 2250부터 3000 V까지를 갖는 하나의 전기적 펄스; 및

[0334] (c) 4 전기적 펄스들 각각 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 밀리시멘스(milliSiemens)에 걸치는 범위에서 전도성을 갖는다.

[0340] 제한되지 않는 예들로서, 상기 RNA는 회귀-절단 엔도뉴클레아제, 반(Half)-TALE-뉴클레아제와 같은 회귀-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. 20060121005 에 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(bryostatins))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) 상사성 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 상사성 비드들)이 버퍼, 바람직하게는 (칼슘 및 마그네슘과 같은 이가 양이온들이 없는) PBS,에서 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. 또다른 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- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, -10, -2, IL-15, TGF β , 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) 피루베이트(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, 페니실린 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% CO₂) 하 유지된다. 여러가지 자극 시간들에 노출되어 온 T 세포들과 같은 면역 세포들은 다른 특성들을 보일 수 있다.

[0345] 또다른 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.

[0346] 조작된 면역 세포들 및 숙주 면역 세포들과 그것들의 상호작용

[0347] 본 발명의 범위 내에는 또한 전술한 방법들 중 어느 하나에 따라 수득되는 분리된 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] 또다른 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 억제 특이적으로 유도하지 않는다.

[0350] 더 선호되는 예에 따라, 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드의 접촉 후, 조작된 동종이계 면역 세포들은 CD8+ T 세포들의 억제 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, 림프절 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. 또다른 예에서, 상기 세포는 건강한 기증자로부터, 암으로 진단받은 환자로부터 또는 감염으로 진단받은 환자로부터 유래될 수 있다. 상기 세포는 다른 표현형 특성들을 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] 또다른 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 코딩하는 하나의 불활성화된 내생의 유전자를 포함한다. 게다가 상기 조작된 동종이계 면역 세포들은, 적어도 하나의 분리된 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드를 발현시킴으로써, 또는 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드와 상기 면역 세포들을 배양시킴으로써, 적어도 하나의 내생이 아닌 면역억제 폴리펩타이드와 접촉된다.
- [0353] 치료적 적용들
- [0354] 또다른 예에서, 전술한 상기 분리된 세포로부터 유래되는 세포주 또는 다른 방법들에 의하여 수득되는 분리된 세포는 의약으로 사용될 수 있다. 또다른 예에서, 상기 의약은 그것을 필요로 하는 환자에게서 암 또는 감염들을 치료하는데 사용될 수 있다. 또다른 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] 또다른 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(allogenic) 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 조합된 치료일 수 있다.
- [0363] 본 발명의 바람직한 예에 따라, 상기 치료는 면역억제제 치료를 겪는 환자들에게 투여될 수 있다. 정말로, 본 발명은 바람직하게는 이러한 면역억제 제제와 같은 수용체를 코딩하는 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 값들을 포함하는 10^5 내지 10^6 세포들/kg 체중의 투여로 구성될 수 있다. 세포들 또는 세포들의 군집은 하나 이상의 투여량으로 투여될 수 있다. 또다른 예에서, 상기 효과적인 양의 세포들은 일회량으로 투여된다. 또다른 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 획득될 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] 또다른 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, 시토포비르 및 인터루킨-2와 같은 제제들로 하는 치료, MS 환자들을 위한 나탈리지맵(natalizimab) 또는 시트라빈(ARA-C로도 알려짐) 치료 또는 건선 환자들을 위한 에팔리즈티맵(efaliztimab) 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, 메토타렉사트, 마이코페놀레이트(mycophenolate), 및 FK506, 항체들과 같은, 면역억제 제제들, 방사선, 화학요법, 또는 CAMPATH와 같은 다른 면역제거 제제들, 항-CD3 항체들 또는 다른 항체 요법들, 사이토신, 플루다라빈, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신(rapamycin), 마이코프리예놀산(mycoplrienolic 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, 1 1; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Citrr. Opin. mm n. 5:763-773, 93). 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. 또다른 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 획득되는 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.

[0368] **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 또다른 것으로의 대체를 의미하며, 예를 들어 펩타이드 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)를 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 (피리미딘 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, 뉴클레오타이드 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 피리미딘 또는 퓨린 염기 모이어티들에서 변형을 가질 수 있다. 당 변형들은 예를 들어, 하나 이상의 하이드록실기들의 할로겐들, 알킬기들, 아민들, 및 아자이드(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 피리미딘들, 아크릴화된 퓨린들 또는 피리미딘들, 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 게놈 위치, 그리고 또한 플라스미드들, 에피솜(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 게놈 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-알과 프로모터 또는 T7 프로모터의 통제 하, 플라스미드들에서 코딩된, 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 특이성인, 타겟 세포 상에 존재하는 요소에 대항하여 결합 도메인을 결합하는 분자들이 의도된다. 일반적으로 CAR는 T 세포 항원 수용체 복합체 제타 체인 (scFvFc: ζ)의 세포내 신호전달(signaling) 도메인에 융합되는 세포의 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, 체제들/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 리포솜 전달 벡터들, 바이러스 전달 벡터들, 약물 전달 벡터들, 화학적 담체들, 폴리머 담체들, 리포플렉스들(ipoplexes), 폴리플렉스들(polyplexes), 덴드리머들, 마이크로버블들 (초음파 조영제들), 나노입자들, 에멀전들 또는 다른 적절한 이동(transfer) 벡터들을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 전달 벡터들은 분자들, 화학물질들, 거대분자들 (유전자들, 단백질들), Diatos에 의하여 개발된 펩타이드들, 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 또다른 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, 파코바이러스 (예컨대 아데노관련 바이러스들), 코로나바이러스, 오르소믹소바이러스(orthomyxovirus) (예컨대, 인플루엔자 바이러스)와 같은 음성 가닥 RNA 바이러스들, 람도바이러스(rhabdovirus) (예컨대, 광견병 및 수포성 구내염(vesicular stomatitis) 바이러스), 파라믹소바이러스(paramyxovirus) (예컨대 홍역 및 센다이), 피코르나바이러스 및 알파바이러스와 같은 양성 가닥 RNA 바이러스들, 및 including 아데노바이러스 헤르페스바이러스 (예컨대, 헤르페스 심브렙렉스 바이러스 타입들 1 및 2을 포함하는 이중 가닥 DNA 바이러스들, 엡스타인(Epstein)-바(Barr) 바이러스, 시토메갈로바이러스(cytomegalovirus)), 및 수두 바이러스 (예컨대, 우두, 계두 및 카나리아두창)을 포함한다. 다른 바이러스들은 노워크(Norwalk) 바이러스, 토가바이러스 플라비바이러스, 레오바이러스들(reociruses), 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 viruses 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 종양형성성인(tumorigenic) 또는 인공적으로 불멸화된 세포주들에 비교하여, 그것들이 유래된 조직의 특성들 및 주된 기능적 요소들의 더 대표적인, 세포들이 의도된다.
- [0382] 제한되지 않는 예들로서, 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 예들로서 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, 스물, 스물다섯, 서른, 마흔, 원, 또는 그보다 많은 뉴클레오타이드들/아미노산들의 치환, 결실, 삽입이 의도된다. 돌연변이는 유전자의 서열 또는 그것의 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, 크로모솜을 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 사이린서들을 더 포함할 수 있다.
- [0388] - 여기에서 사용된 대로, 용어 "자리(locus)"는 크로모솜 상 DNA 서열의 (예컨대 유전자의) 특정 물리적 위치이다. 용어 "자리(locus)"는 크로모솜 상 회귀-절단 엔도뉴클레아제 타겟 서열의 특정 물리적 위치를 가리킬 수 있다. 이러한 자리는 본 발명에 따른 회귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 인식 및/또는 절단되는 타겟 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 관심있는 자리는 세포의 (즉 크로모솜에서) 유전적 물질의 주요 부분에 존재하는 핵산 서열 뿐 아니라, 제한되지 않는 예들로서, 플라스미드들, 에피솜들, 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)를 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, 회귀-절단 엔도뉴클레아제들로 분류될 수 있다. 회귀-절단 엔도뉴클레아제들은 정의된 자리에서 DNA 이중-가닥 손상들 (breaks) (DSBs)을 유도함으로써 상당히 증가한다 (Rouet, Smih et al. 1994; Choulika, Perrin et al. 1995; Pingoud and Silva 2007). 회귀-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, Lanio et al. 2005; Arimondo, Thomas et al. 2006)일 수 있다. 화학적 엔도뉴클레아제에서, 화학적 또는 펩타이드적 절단자는 핵산들의 폴리머에 또는 특정 타겟 서열을 인식하는 또다른 DNA에 콘주게이트되고, 이로써 특정 서열에 대한 절단 활성을 타겟팅한다. 화학적 엔도뉴클레아제들은 또한 특정 DNA 서열들에 결합하는 것으로 알려진, 오르소페난트롤린(orthophenanthroline)의 콘주게이트들과 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 "엔도뉴클레아제"에 포함된다.
- [0390] 회귀-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 패밀리를 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 회귀-절단 엔도뉴클레아제들은 또한 TALE-뉴클레아제들로부터 유래될 수 있다.
- [0391] 회귀-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 중 잔토모나스(Xanthomonas)로부터의 단백질로 각 반복이 핵산 타겟팅 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) (MBBBD)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. 또다른 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 변형 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 (Cellestis, 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 뭉뚱한 말단들 또는 엇갈린(staggered) 말단들의 생산을 야기할 수 있다.
- [0394] - "융합 단백질"에 의하여, 분리된 단백질들 또는 그것들의 부분을 원래 코딩하는 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 비교 목적으로 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, 디폴트 세팅으로 사용될 수 있다. 예컨대, 여기에 기재된 특정 폴리펩타이드들에 적어도 70%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일성을 갖고 바람직하게는 이러한 폴리펩타이드들을 코딩하는 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. BLASTP가 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, 펩타이드가 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, 4-1BB, 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 라이게이션과 같은 일차 신호와 결합하여, T 세포 증식 및/또는 주요(key) 분자들의 상향조절 또는 하향조절을 이끄는 신호를 가리킨다.

[0400] -여기에서 사용된 용어 "세포의 리간드-결합 도메인"은 리간드에 결합할 수 있는 올리고- 또는 폴리펩타이드로 정의된다. 바람직하게는, 도메인은 세포 표면 분자와 상호작용할 수 있을 것이다. 예를 들어, 세포의 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. 세포의 배지에서 CTLA4의 방출은 항원 제시(presenting) 세포들 (APC)의 표면에서 노출되는 CD86/CD80 에 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 거부 방지 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 β 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(allogenic) 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(allogenic) CAR T 세포들이 바이러스 단백질들 (막-결합 또는 분비된 펩타이드들로서 ISU 또는 FP)로부터의 면역억제 폴리펩타이드들을 발현시켜, 환자 T 세포들의 억제를 가능하게 하고, 그러므로 환자 내로 주입되는 타생의(allogenic) 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 버퍼(buffy) 코트(coat) 샘플들로부터 정제되었다. PBMC 층은 회수되었고 T 세포들은 상업적으로 이용가능한 T-세포 풍부(enrichment) 키트를 이용하여 정제되었다. 정제된 T 세포들은 비드:세포 비율 1:1에서 20ng/mL 인간 IL-2, 5% 인간, 및 다이내비드들(Dynabeads) 인간 T 활성화인자 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 코딩하는 mRNA 15 μ g으로 형질주입되었다. scCAR mRNA들은 3000V/cm에서 두 개의 0.1 mS 펄스들을 적용함으로써, 사이토펙스 기술을 이용하여 이루어진 T7 mRNA 폴리메라제 형질주입들을 이용하여 생산되었고 뒤이어 "사이토펙 레이션(Cytoporation) 버퍼 T" (BTX Harvard Apparatus) 최종 부피 200 μ l에서 0.4cm 갭 큐벳들에서 325V/cm에서 네 개의 0.2 mS 펄스들이 이어졌다. 세포들은 X-VivoTM-15 배지에서 즉시 회수되었고 37 °C에서 5% CO2로 배양되었다. IL-2이 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 류린 IgG1 Fc 단편과 함께, 인간 CD123 단백질dIm 세포의 도메인의 융합으로 구성되는 재조합 단백질을 이용하여 이루어졌다. scCAR 분자에서의 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 코딩하는 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 활성화에 대한 이러한 발현의 영향을 기재한다. 일차 T 세포들의 표면에서 PD-L1을 발현시키기 위하여, 일차 T 세포들이 버퍼-

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

[0422] mRNA의 형질주입

[0423] 형질주입에 대하여, 그것들의 활성화 5 일 후, 5 백만의 CAR T 세포들 또는 T 세포들이 PD-L1을 코드하는 mRNA 20 μ g (pCLS27069, 서열번호 18)으로 형질주입되었다. 형질주입은 아질펄스 기술을 이용하여 수행되었다. 3,000 V/cm에서 두 개의 0.1 mS 펄스들이 적용되고 뒤이어 0.4 cm 갭 큐벳들에서 325 V/cm에서 네 개의 0.2 mS 펄스들 및 최종 부피 200 μ 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 회석되었다. 형질주입된 T 세포들이 1×10^6 /ml에서 결국 회석되었고 추가의 특성화를 위하여 5% 인간 AB 혈청 및 20 ng/ml IL-2 (최종 농도) 및 5% CO₂의 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 활성화에 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 세포들로부터 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 cDNA를 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 단백을 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 활성화에 대하여, 우리의 결과들은 CAR T 세포의 표면에서 PD-L1의 재발현은 그것들의 활성화에 뚜렷하게 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다 (도 13). 이 결과는 다른 혈액 기증자로부터 조작된 CAR T 세포들로부터 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 Oncia 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 CTLA4Ig를 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**

[0435] 일차 T 세포들에 의하여 CTLA4 Ig를 발현시키기 위하여, 일차 T 세포들이 베타-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 코딩하는 mRNA 20 µg (아바타셋트 또는 벨라타셋트 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 활성화에 대한 이러한 발현/분비의 영향을 결정하기 위하여 회수되었다.

[0436] 우리의 결과들은 CTLA4 a 또는 b Ig를 코딩하는 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 활성화**

[0438] CAR T 세포들의 활성화에 대한 CTLA4 Ig의 영향을 연구하기 위하여, 관련된 그리고 관련되지 않은 종양 세포주들을 향한 그것들의 세포독성 활성화가 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 Ig를 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 CTLA4Ig를 코딩하는 LV 벡터들로 T 세포들에 공동-형질도입된다. 도 17은 PD-L1 및 CTLA4Ig를 코딩하는 LV 벡터들로 공동 형질도입된 T 세포들에서 (평균=270 pg/µl) 또는 CTLA4Ig 단독을 코딩하는 LV 벡터로 형질도입된 T 세포에 의한 상청액에서 (평균= 250pg/µl) 분비된 CTLA4 Ig의 수준을 보여주는 반면, PD-L1-형질도입된 T 세포들에서는 발현이 검출되지 않았다. 그 결과들은 PD-L1이 PD-L1 단독을 코딩하는 LV 벡터로 형질도입된 T 세포에서 ((>70%인 세포들이 PD-L1을 발현시킨다, 도 17) 또는 PD-L1 및 CTLA4Ig (59%)을 코딩하는 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:

[0445] - (a) 어떠한 처리도 없이 기증자 1으로부터의 PBMC들은 단독으로 배양되었다,

[0446] - (b) 증가하는 농도의 PHA (피토헤마글루티닌(PhytoHemAgglutinin)), T 세포 미토겐(mitogen))으로 처리되어 온 기증자 1로부터의 PBMC들이 단독으로 배양된다;

[0447] - (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 림프구들 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 CTLA4Ig를 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 23B로부터의 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 녹아웃

[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 코딩하는 2 또는 10 μ g의 mRNA이 제조업자의 프로토콜에 따라 펄스 아질 기술을 이용하여 일차 T 세포들에 전기천공되었다. 형질주입 삼 일 후, 세포들이 회수되었고 피코에리스린(PhycoErythrin) 플루오로크롬에 커플링된 특이적 β 2-마이크로글로불린 항체로 표지되었다. 세포들은 그 다음에 β 2-m 발현 및 생존 능력에 대하여 유동세포 분석법에 의하여 분석된다. 그 결과들은 도 16에 나타나어 진다. 윗 패널에서, 거의 100%의 형질주입되지 않은 T 세포들이 β 2-m을 발현시킨다 (왼쪽 오른쪽 패널). 특이적 B2M TALEN으로 T 세포들의 형질주입은, 2 μ g 또는 10 μ 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 녹아웃이 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 펩타이드들에 결합되는 MHC 클래스 I 분자들과 높은 수준으로 AA 서열 동일성을 공유하는 타입 I 막관통 당단백질을 코딩한다. 우리의 목표가 B2M 유전자가 무효화된 T 세포들에서 이 분자를 발현시키는 것이기 때문에, 우리의 전략은 베타2-m 및 UL18이 단일 체인 폴리펩타이드로서 융합되는 키메라 분자를 생산하는 것이다. 서열번호 39는 키메라 단백질의 아미노산 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) 펩타이드 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 회색 (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 대하여 인식하고 증식하지 못한다는 것을 보여주는 것이다.

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

[0481] NK 세포는 건강한 기증자 A PBMC들로부터 정제된다.

[0482] 타겟들로서, 건강한 기증자 B로부터의 조작된 T 세포들이 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-RAET1Led (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-RAET1Led (서열번호 47))을 발현시킬 때, NK 매개된 세포 세포용해가 관찰되지 않거나 제한된 NK 매개된 세포 세포용해가 관찰된다는 것이 의도된다. 이 실험 결과들은 타생의(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

[0484] 몰로니(Moloney) 뮤린(Murine) 백혈병(Leukemia) 바이러스(Virus) (MMLV) (서열번호 78)로부터의 외피 단백질, 분비된 14-머(mer) ISU 펩타이드들 (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 바이러스로부터; 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 펩타이드의 발현이 웨스턴 블롯에 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 펩타이드들의 발현

[0486] 분비된 9-머(mer) FP 폴리펩타이드들을 지닌 렌티바이러스 입자들 (각각 서열번호 48 및 49-50의 HIV-1 바이러스로부터의 1 및 인공 서열 2)이 T 세포들 내로 형질도입된다. 분비된 FP 펩타이드들의 발현이 웨스턴 블롯에 의하여 세포 배양 상청액에서 모니터링된다. 이 실험 결과들은 분비된 FP 펩타이드들이 T 세포들에서 효율적으로 발현되는 것을 보여주는 것을 목표로 한다.

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

[0488] 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 회색 (FACS 분석)에 의하여 측정된다. 세포 증식이 대조군에서 관찰됨에도 불구하고, 조작된 T 세포들이 막 결합된 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 제한되는 것을 보여주는 것을 목표로 한다.

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

[0490] 건강한 기증자 A로부터의 BMC들이 기증자 B로부터의 방사선조사된 또는 마이토마이신-처리된 조작된 T 세포들과 공동-배양되어, FP를 발현시킨다. 대조군으로서, 건강한 기증자 A로부터의 PBMC들가 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 회색 (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] Chouluka, 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 (TALNs): 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.

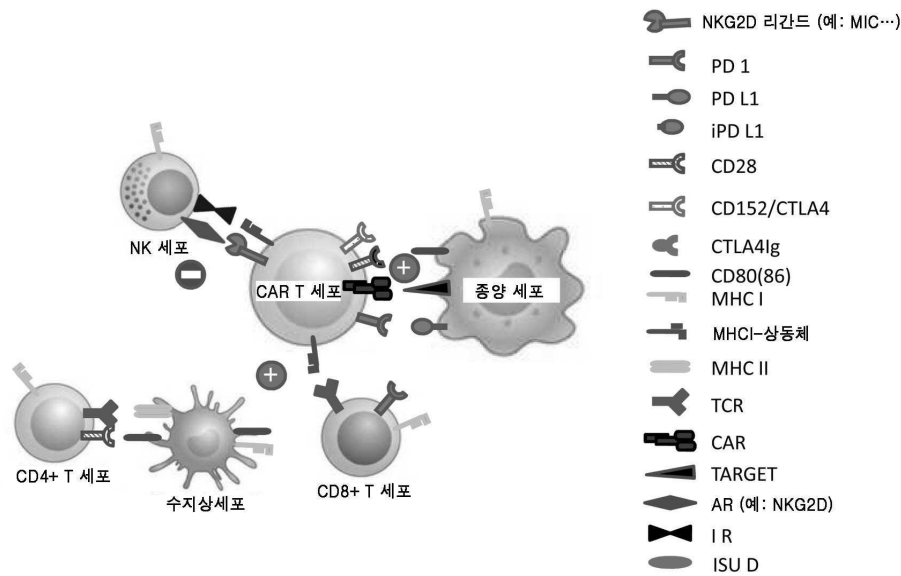
- [0513] Mahfouz, M. M., L. Li, et al. (2012). "Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein." *Plant Mol Biol* 78(3): 311-21.
- [0514] Mahfouz, M. M., L. Li, et al. (2011). "De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel 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.

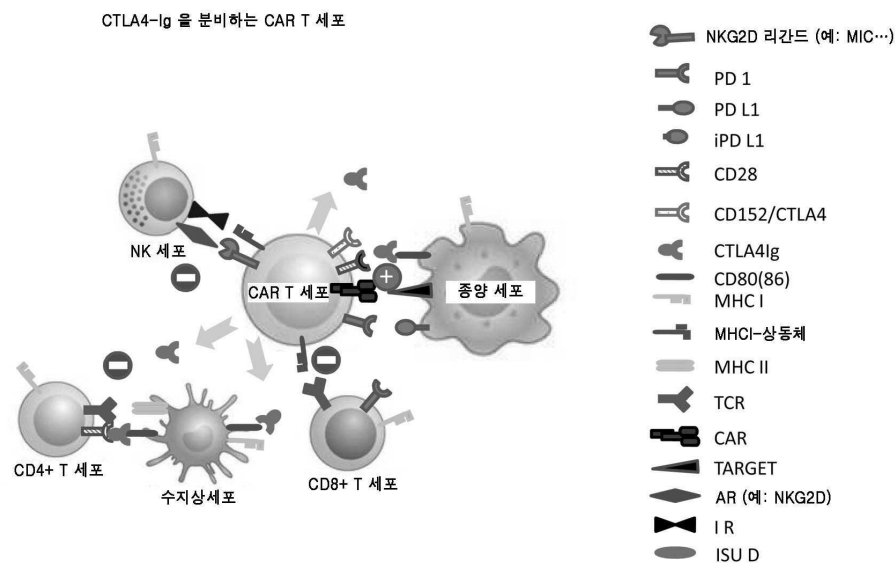
- [0533] Waldmann, H. and G. Hale (2005). "CAMPATH: from concept to clinic." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 360(1461): 1707-11.
- [0534] Weber, E., R. Gruetzner, et al. (2011). "Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning." PLoS One 6(5): e19722.
- [0535] Zhang, F., L. Cong, et al. (2011). "Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription." Nat Biotechnol 29(2): 149-53.

도면

도면1

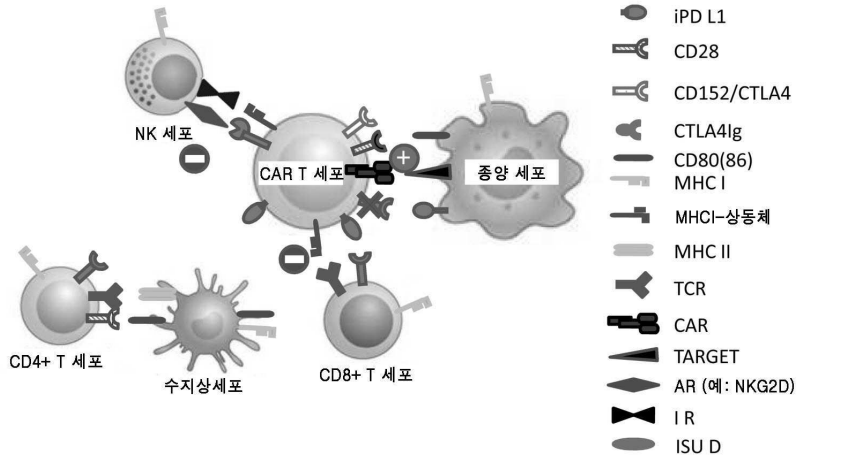


도면2



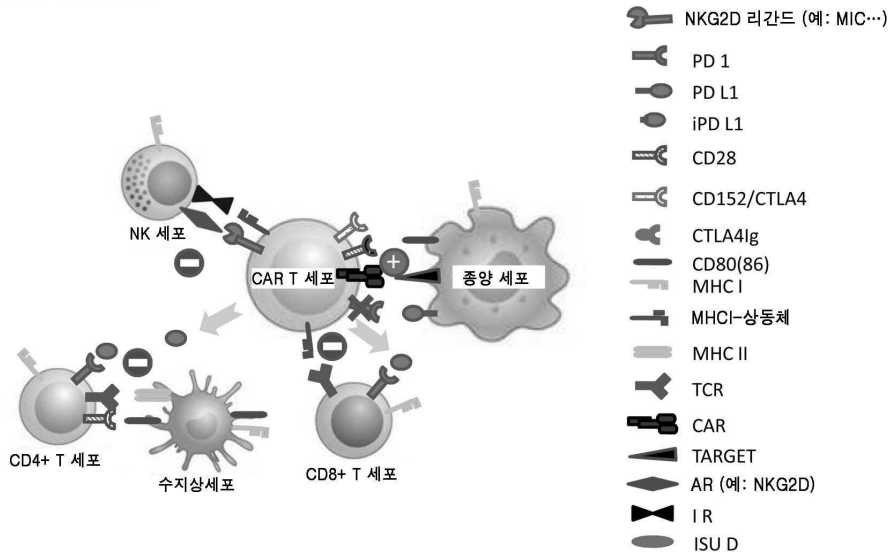
도면3

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



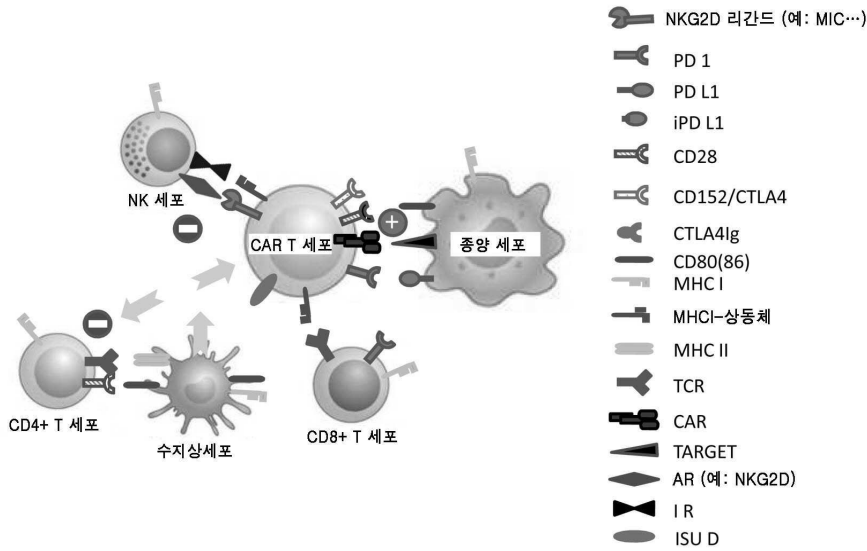
도면4

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



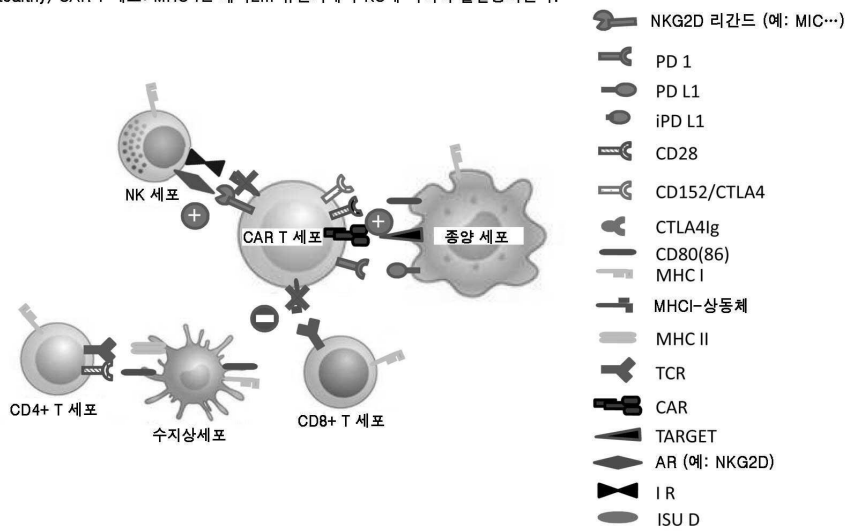
도면5

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



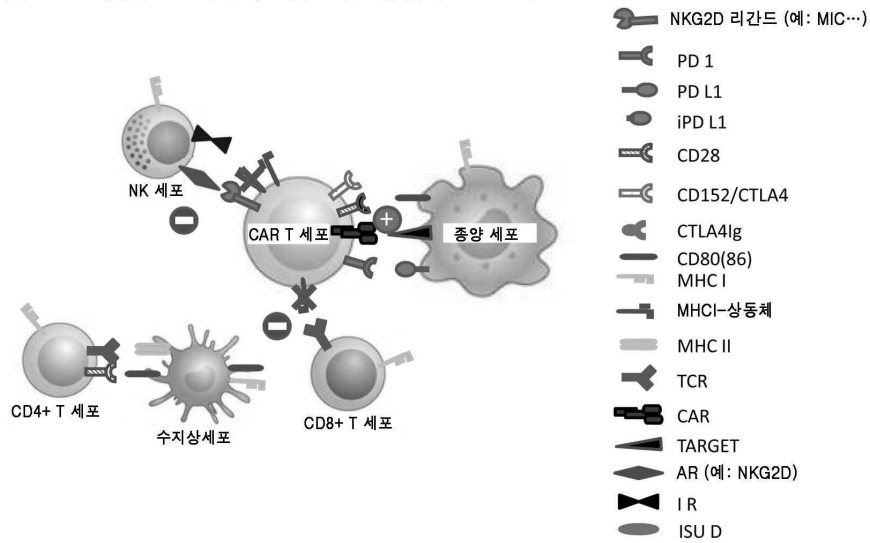
도면6

잠행 (stealthy) CAR T 세포: MHC I은 베타2m 유전자에서 KO에 의하여 불활성화된다.



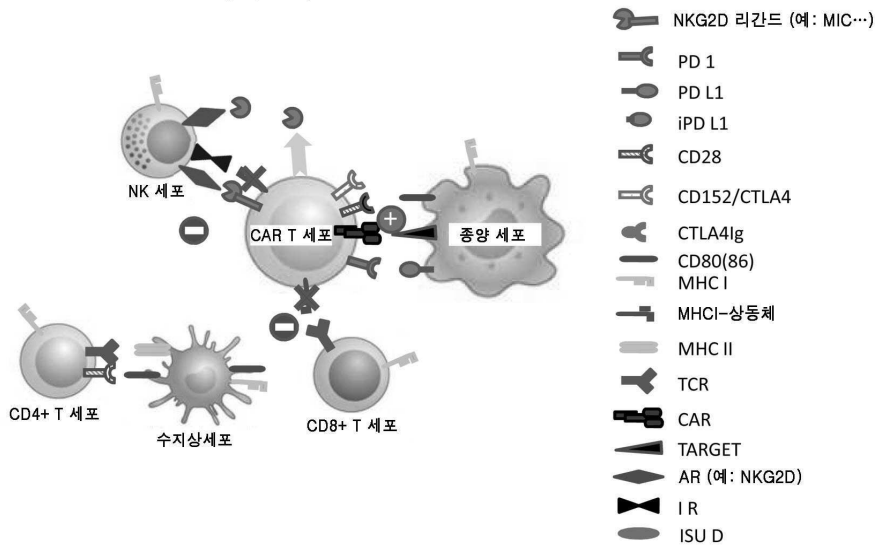
도면7

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

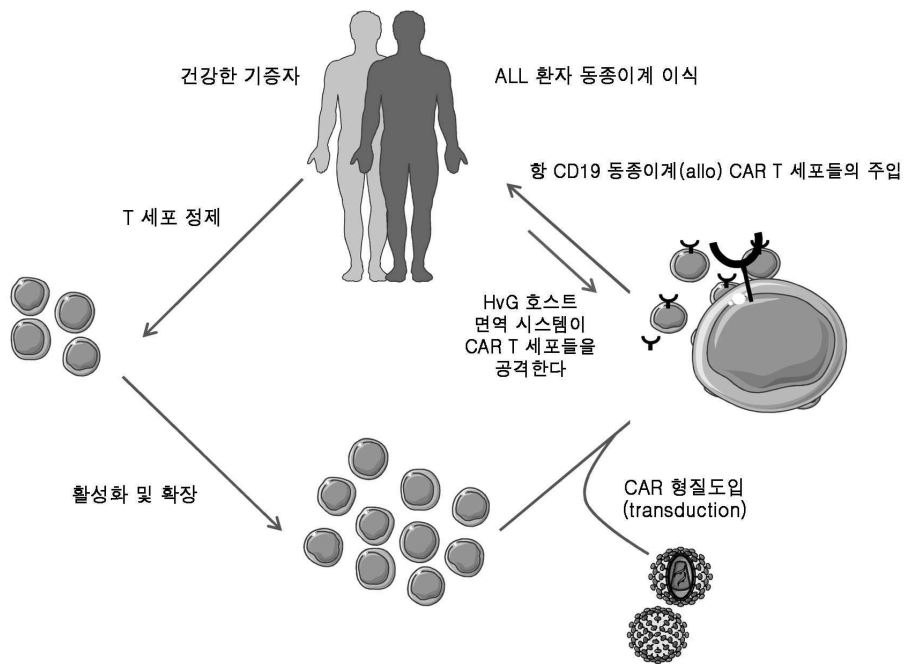


도면8

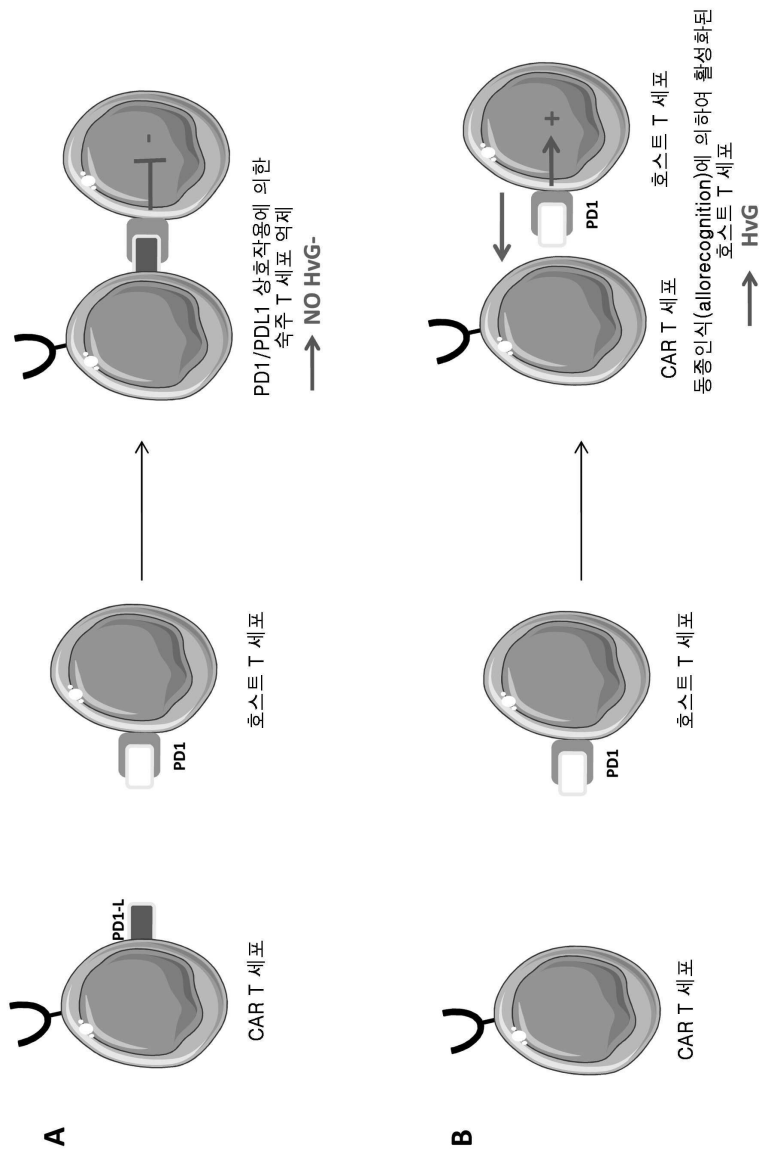
가용성 NKG2D 리간드를 발현시키고 $\beta 2$ 마이크로글로불린을 위한 CAR T 세포들 KO



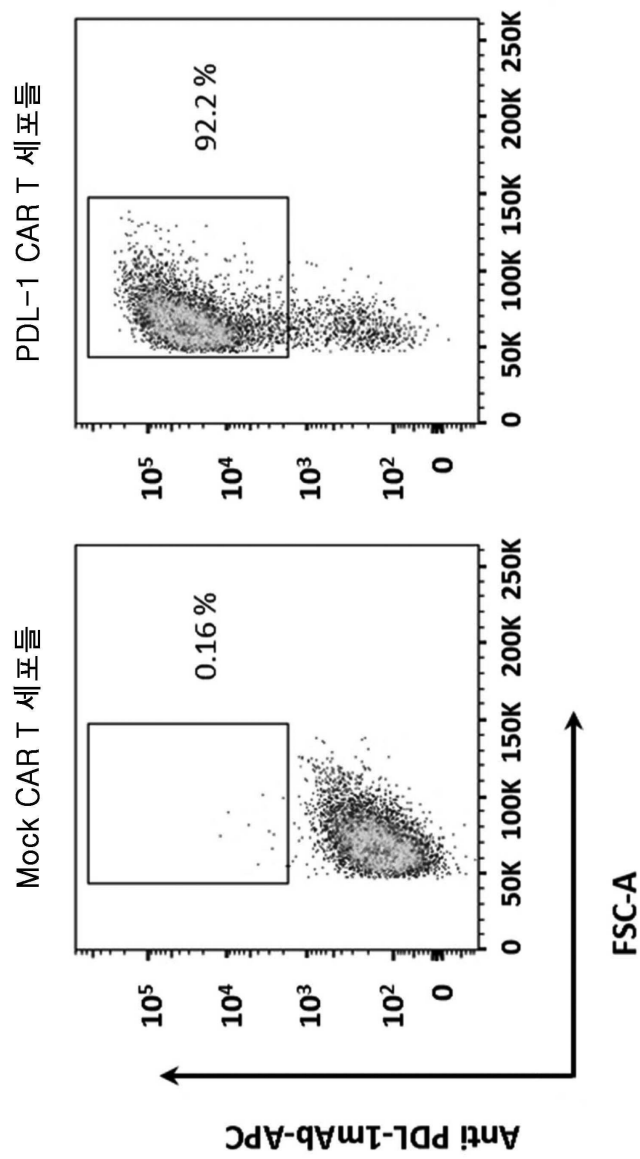
도면9



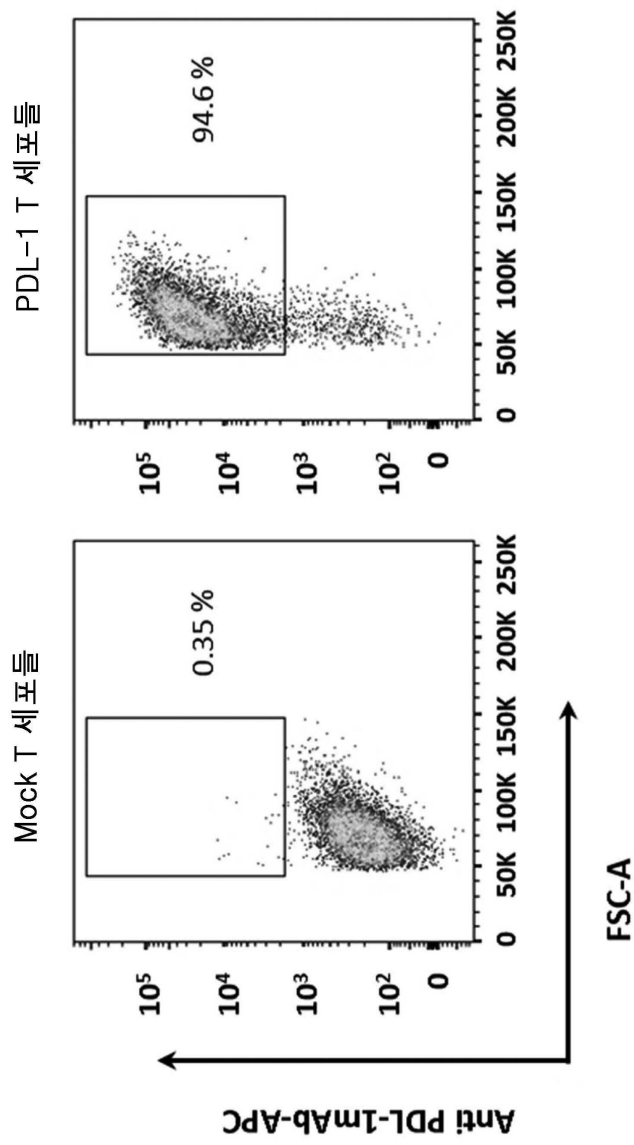
도면10



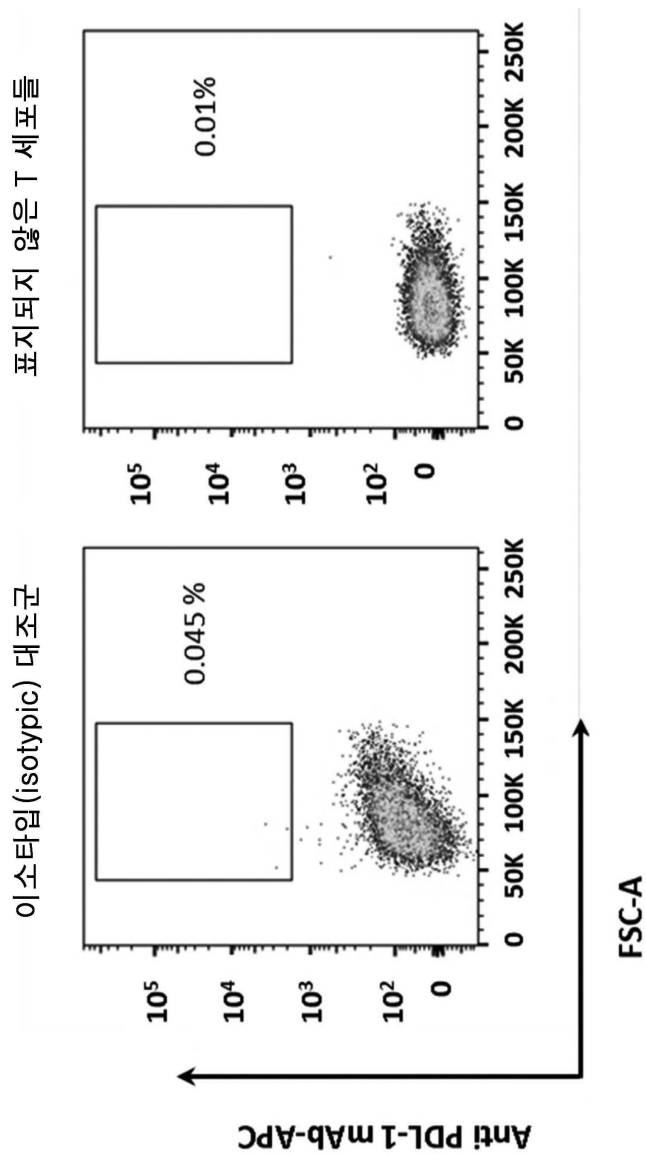
도면12a



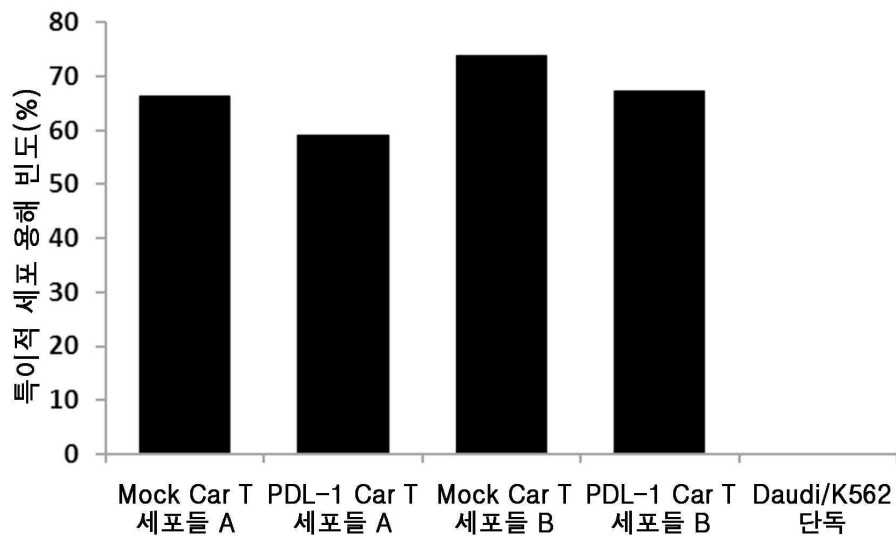
도면12b



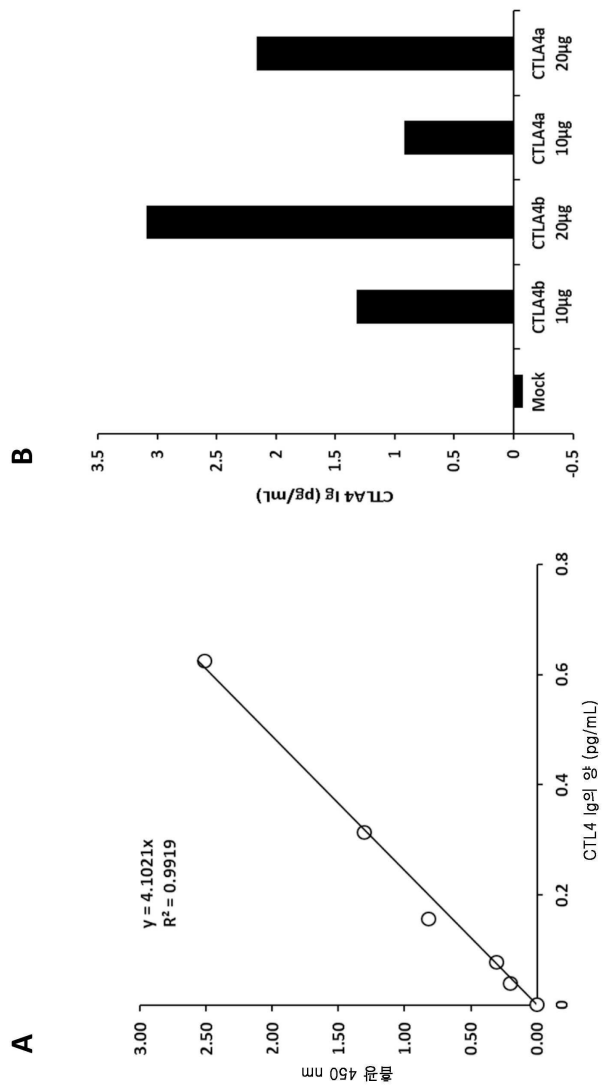
도면12c



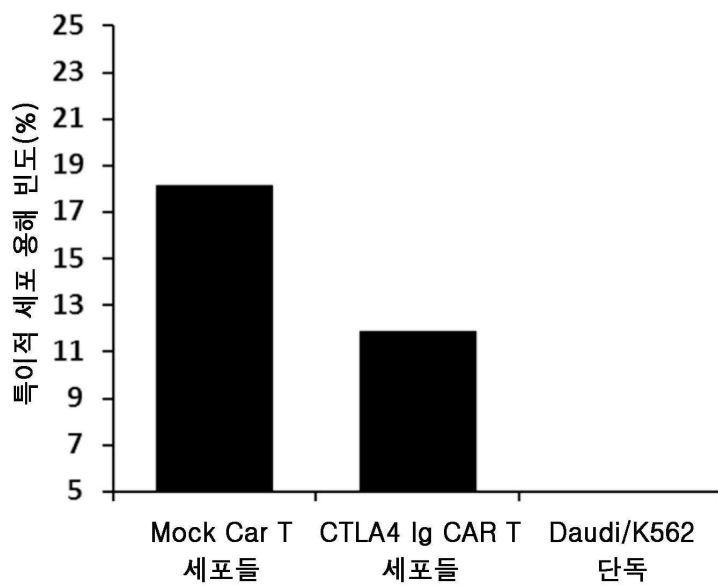
도면13



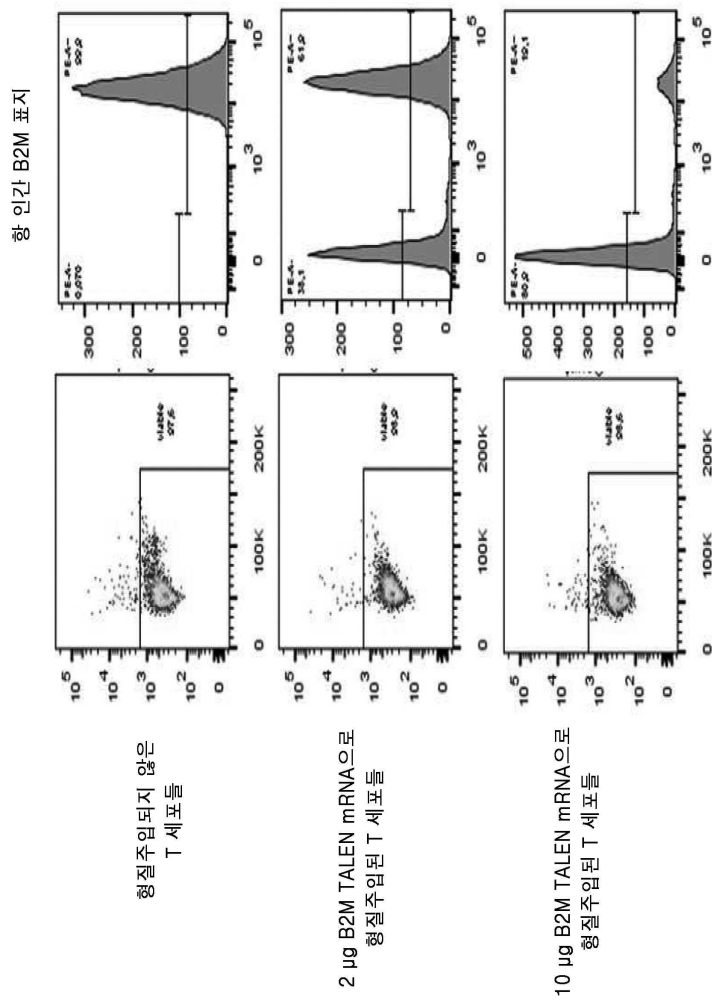
도면14



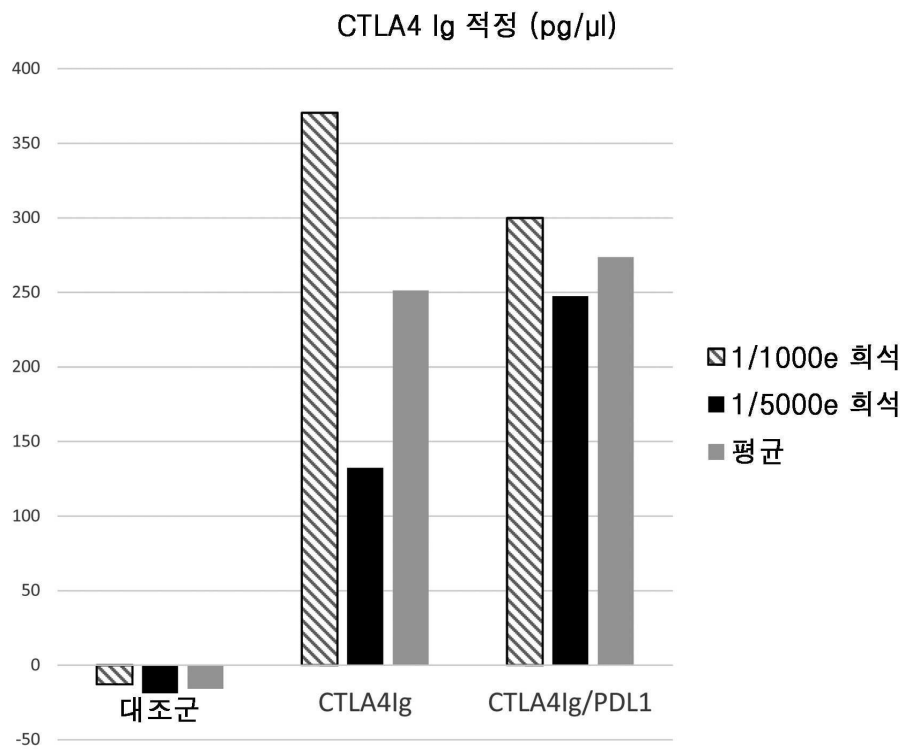
도면15



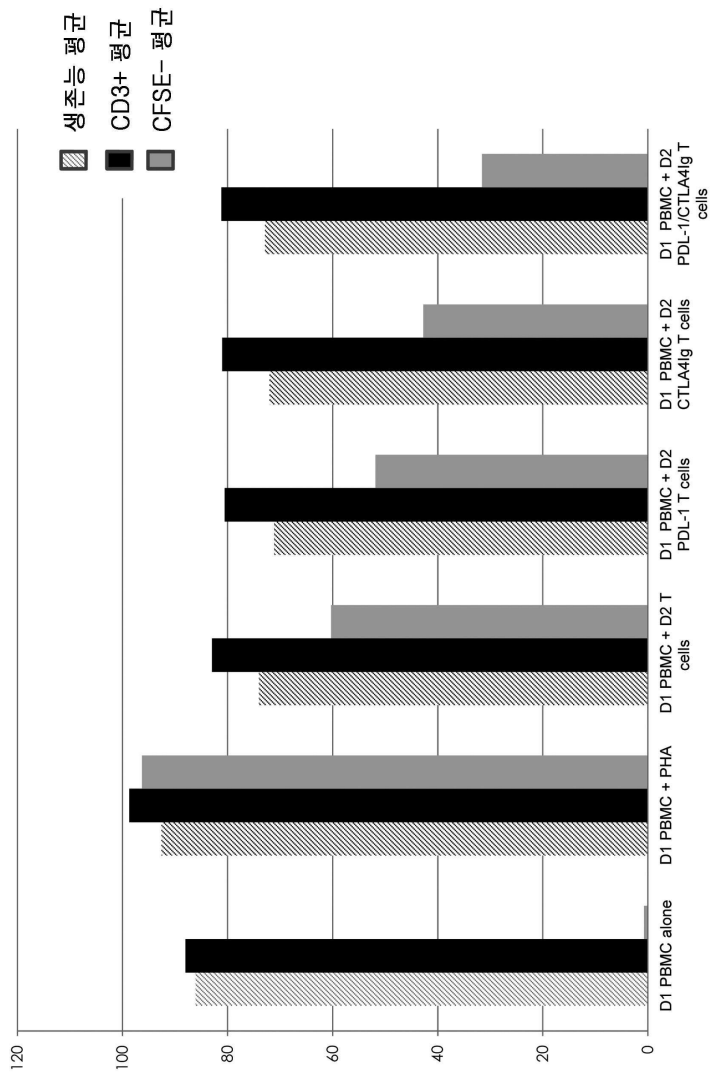
도면16



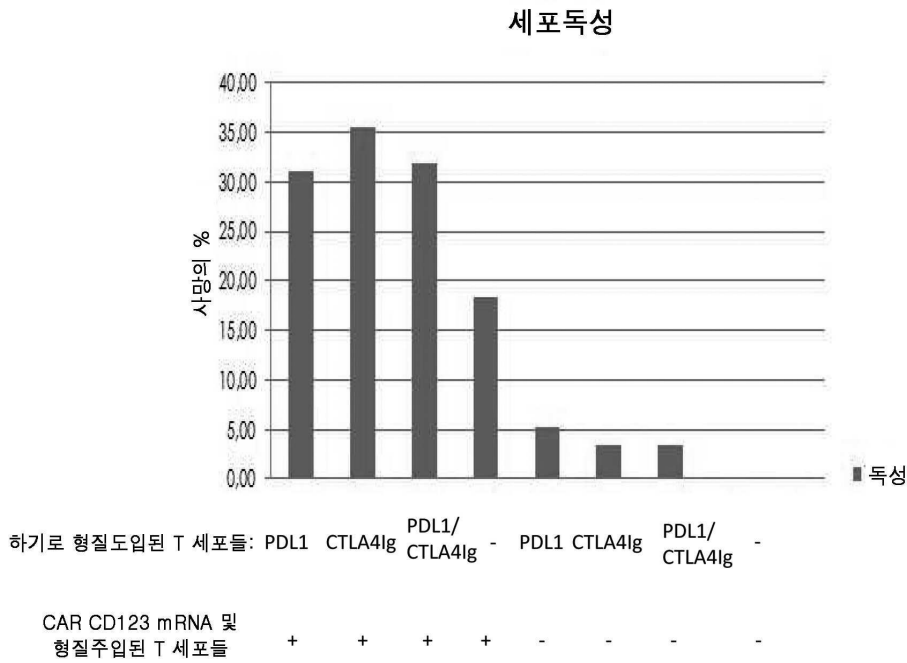
도면17



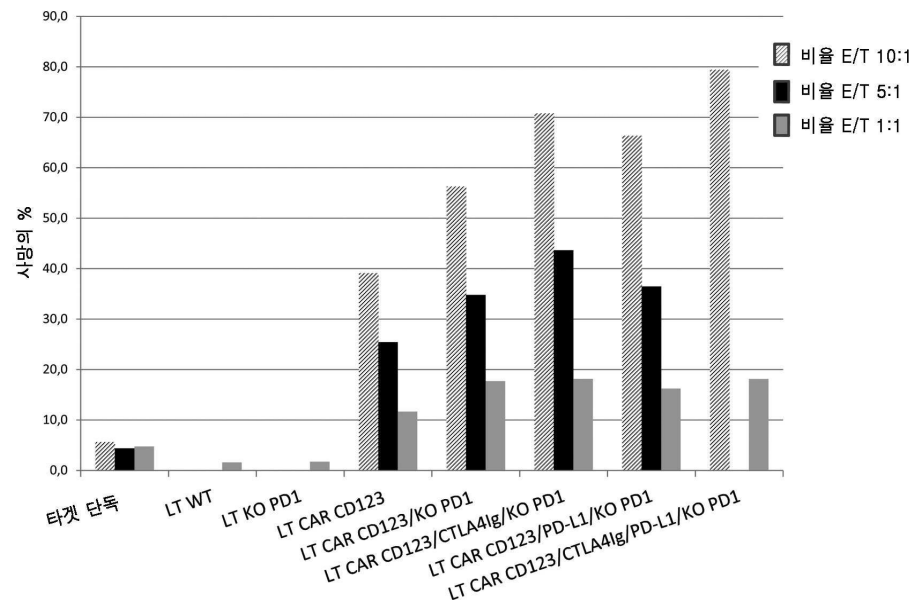
도면18



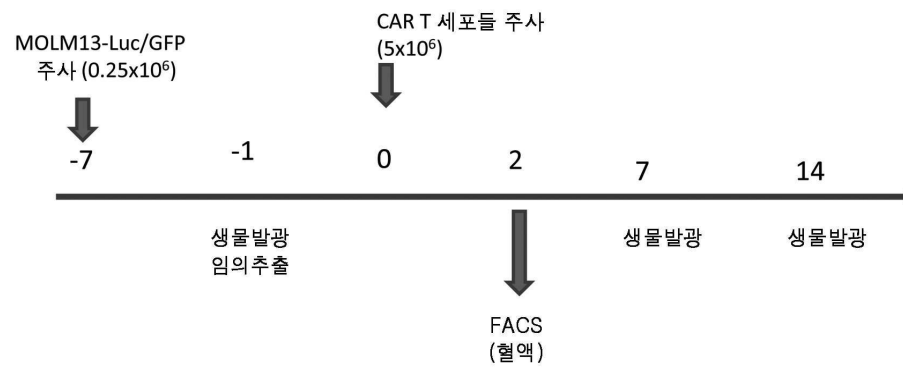
도면19



도면20



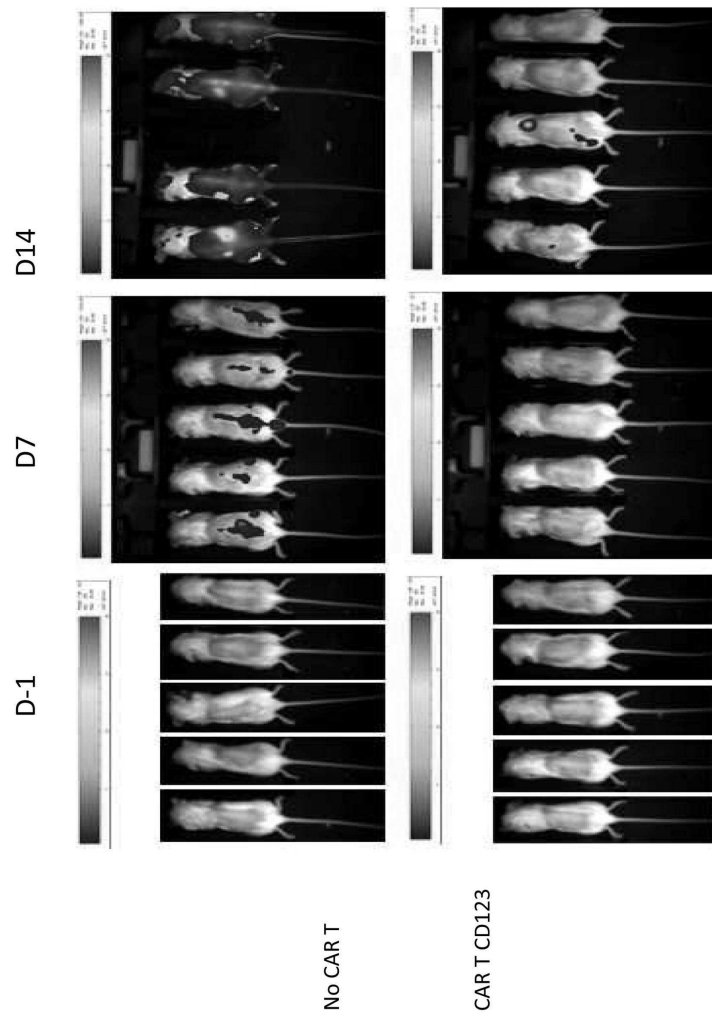
도면21



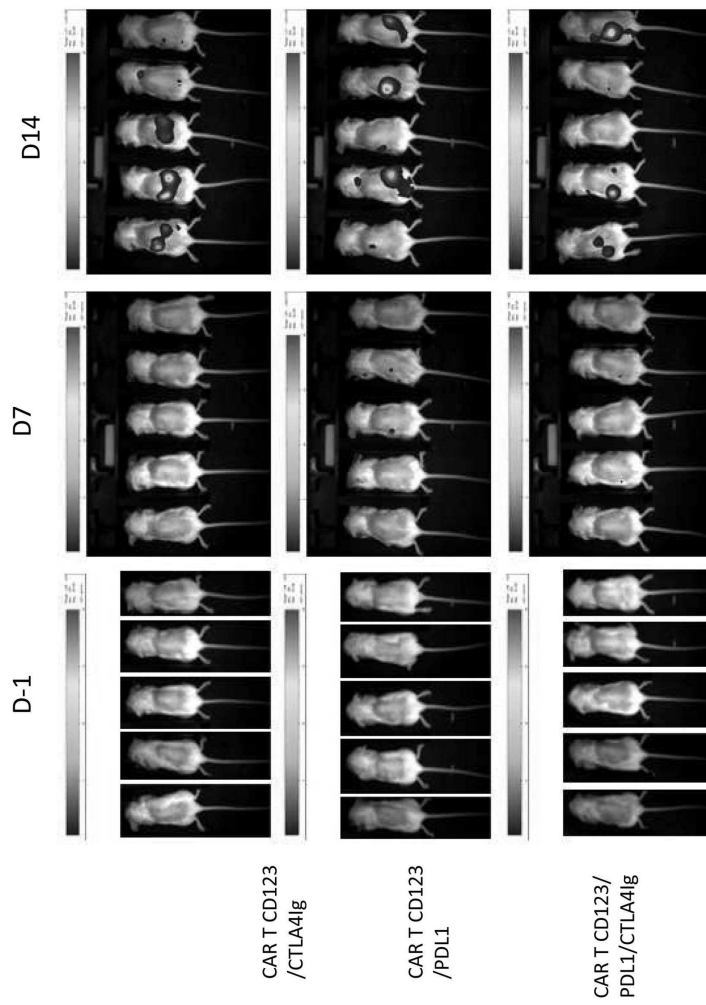
도면22

그룹	% CAR+ 세포들그룹	% PDL1+ 세포들	CTLA4 Ig 농도 (pg/μl)
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

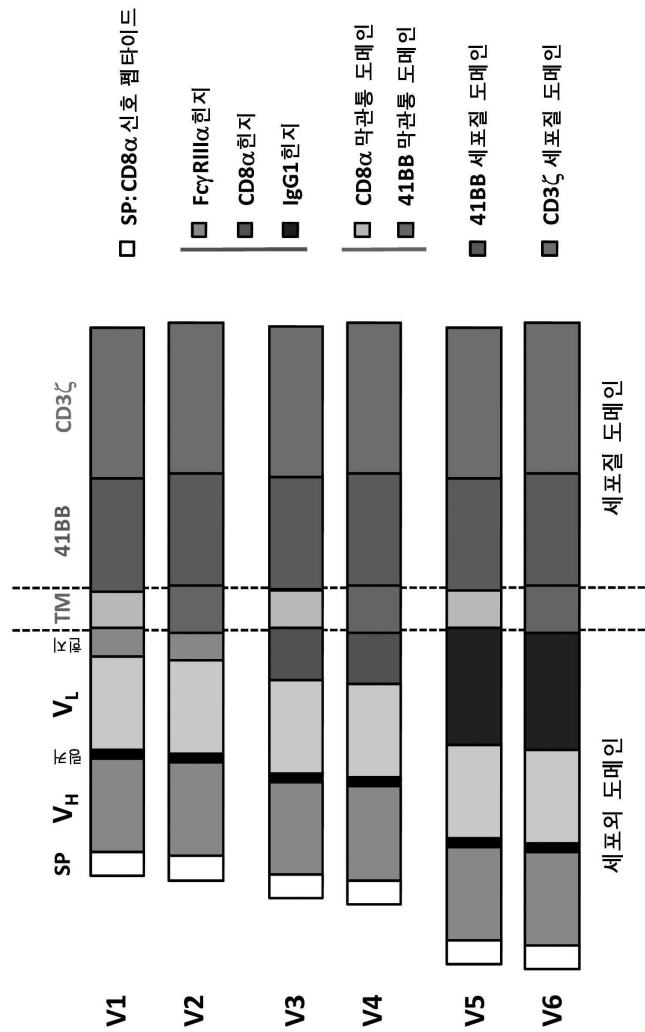
도면23a



도면23b



도면24



서열 목록

- <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> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 58
- <212> DNA
- <213> homo sapiens
- <220><221> gene

<222> (1)..(58)

<223> B2M TALEN T01targeting sequence

<400> 1

tctcgtccg tggccttagc tgtgctcgcg ctactctctc tttctggcct ggaggcta 58

<210> 2

<211> 2814

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta2M T01- TALEN - LEFT

<400> 2

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgaatg tccagattac 60

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120

aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180

acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccggcag cgtagggac cgtcgtgtc 240

aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcga cgttggcgtc 300

ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgtctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagtgt 360

agaggccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaa acgtggcggc 420

gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480

ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 540

acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgtc caggcccacg gcttgacccc ccagcagggtg 600

gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgttgg agacggtcca gcggtgttg 660

ccggtgtgt gccaggccca cggttgacc ccggagcagg tggtagccat cgccagccac 720

gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 780

cacggttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 840

ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 900

cagggtgtgg ccatcgccag caatggcgtt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 960

ctgttgccgg tctgtgtcca ggcccacggc ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc 1020

agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgtc 1080

caggcccacg gcttgacccc ggagcagggt gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag 1140

caggcgttgg agacggtgca ggcgtgttg ccggtgtgt gccaggccca cggcttgacc 1200

ccccagcagg tggtagccat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1260

cagcggctgt tgcgggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc 1320
atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcgggt 1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1500
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 1560
acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 1620

gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg 1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggcat cgccagcaat 1740
aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgcgggtgct gtgccaggcc 1800
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 1920
caggtggtgg ccatcgccag caatggcgggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccctc agcaggtggt ggccatcgcc 2040

agcaatggcg gggcaggcc ggcgtggag agcattgttg ccagttatc tcgcctgat 2100
ccggcgttgg ccgcgttgac caacgaccac ctgctgcct tggcctgcct cggcggcgct 2160
cctgcgttg atgcagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
aagtcagagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgcccac 2280
gagtacatcg agctgatcga gatcggcgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg 2340
aagtgatgg agttcttcat gaagtgtag ggctacaggg gcaagcacct gggcggctcc 2400
aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggtccccca tcgactacgg cgtgatctg 2460

gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag 2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc 2640
aactacaagg cccagctgac caggtgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760
gaggtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

<210> 3

<211> 2832

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta2M T01 TALEN -RIGHT

<400> 3

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggtt cgttcgacag tggcgagcga ccacaggcga	180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc	360
acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagtgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtg atgcatggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag caatatggt	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	600
ttgaccccc agcaggtggt ggccatgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	660
acgtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg	720
gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg	780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggaggccat cgccagccac	840
gatggcgga agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgt tgccggtgct gtgccaggcc	900
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcgct gttgccgtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag	1020
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatgcc	1140
agccacgatg gcggcaagca ggcgtggag acgtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1200
caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tggaggcaag	1260
caggcgctgg agacggtgca ggcgtgttg ccggtgctgt gccaggccca cgcttgacc	1320
ccccagcagg tggaggccat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc	1380
cagcggtgt tgccggtgct gtgccaggcc cagcgcttga cccccagca ggtggtggcc	1440
atcgccagca ataattggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcgct gttgccggtg	1500
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1620
ttgaccccg agcaggtggt ggccatgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag	1680
acgtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagcaatat tggaggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg	1800

ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggaggccat cgccagcaat 1860
aatgttgga agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1920
cacggttga ccccgagca ggtggtggcc atgccagca atattggtgg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040

caggtggtgg ccacgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg 2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc 2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccag 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggcgccatct acaccgtggg ctccccatc 2460

gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gccatcggc 2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcacctga cctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 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

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggct atcgattacc catacgtatg tccagattac 60

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttctgttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt	180
acacacgcgc acatcgttgc gttaaagccaa caccgcgag cgtagggac cgtcgtgtc	240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcga cgttggcgtc	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg	360
agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggaagca ggcgctggag	540
acggtccagc ggctgttgc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgaccc ggagcaggtg	600
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg	660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtagccat cgccagcaat	720
attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc	780
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg	840
ctggagacgg tgcaggcgt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag	900
caggtggtgg ccatcgccag caatatgtgt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg	960
ctgttgccgg tgcgtgtcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc	1020
agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgc ggtgctgtgc	1080
caggcccacg gcttgaccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtagcaag	1140
caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc	1200
ccccagcagg tggtagccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc	1260
cagcgctgt tgcggtgct gtgccaggcc cagcgcttga cccccagca ggtggtggcc	1320
atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcgct gttgccggtg	1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccggag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgtcca ggcccacggc	1500
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag	1560
acggtgcagg cgctgttgc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgaccc ccagcaggtg	1620
gtggccatcg ccagcaataa tggtagcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg	1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtagccat cgccagcaat	1740
aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcgctgt tgcggtgct gtgccaggcc	1800

cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcgggtg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag	1920
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacctc agcaggtggt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat	2100
ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcct tggcctgcct cggcggggt	2160
cctgcgtgg atgcagtga aaagggttg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac	2280
gagtacatcg agctgatcg gatcgccgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg	2340
aagtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggctcc	2400
aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg cctactcgg cggtacaac ctgccatcg gccaggccga cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag	2580
gtgtacctt ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc	2640
aactacaagg ccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814
<210> 6	
<211> 2832	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Beta2M T02-TALEN RIGHT	
<400> 6	
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgcagca ccacaggca	180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgtgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc	360
acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg	480

acgggtgccc cgctcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	600
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag	660
acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg	720
gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg	780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggcat cgccagcaat	840
ggcgttgga agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgt tgccggtgct gtgccaggcc	900
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag	1020
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc	1140
agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1200
caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggaag	1260
caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc	1320
ccggagcagg tgggtggcat cgccagcaat attggtggca agcaggcgct ggagcaggtg	1380
caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc	1440
atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg	1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1620
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag	1680
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg	1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cgccagccac	1860
gatggcgga agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgt tgccggtgct gtgccaggcc	1920
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccctcag	2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggaggccgg cgctggagag cattgttgcc	2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg	2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc	2220

agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280

ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccacg 2340

gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttctttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400

aagcacctgg gcggctccag gaagcccacg ggcgccatct acaccgtggg ctcccccatc 2460

gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc 2520

caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580

cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640

tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700

tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760

ggcacctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820

gccgactgat aa 2832

<210> 7

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> B2M T03- TALEN targeting sequence

<400> 7

ttagctgtgc tcgcgtact ctctctttct ggctggagg ctatcca 47

<210> 8

<211> 2814

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 8

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120

aaaccgaagg ttctgttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180

acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccggcgag cgttagggac cgtcgtgtc 240

aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300

ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgtctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg 360

agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420

gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag	540
acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	600
gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg	660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtaggcat cgccagccac	720
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc	780
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcgggtg caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg ccacggctt gacccccag	900
caggtggtgg ccatcgccag caataatgt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc	1020
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1080
caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag	1140
caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc	1200
ccggagcagg tggtaggcat cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc	1260
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc	1320
atcgccagca atggcgggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg	1380
ctgtgccagg ccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	1560
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg	1620
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg	1680
ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc cccagcagg tggtaggcat cgccagcaat	1740
aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc	1800
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg ccacggctt gacccccag	1920
caggtggtgg ccatcgccag caatggcgg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg ccagttatc tcgccctgat	2100
ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcct tggcctgcct cggcgggcgt	2160
cctgcgtgg atgcagtga aaagggattg ggggattcta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtcgagc tggaggagaa gaaatccgag ttaggcaca agctgaagta cgtgccccac	2280

gagtacatcg agctgatcga gatcgcccgg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggctcc	2400
aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag	2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttcctgttcg tgtccggcca cttcaagggc	2640
aactacaagg ccagcgtgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacctt gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814
<210> 9	
<211> 2832	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Beta2M T03-TALEN -RIGHT	
<400> 9	
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggcca	180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgtgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgtctgga ggccttgctc	360
acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagtgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgtcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	540
ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc	600
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	660
acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgtgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg	720
gtggccatcg ccagcaatat tggtaggaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg	780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg ttgtaggcat cgccagcaat	840
ggcggtagga agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc	900
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg	960

ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag	1020
caggtggtgg ccatcgccag caataatggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc	1140
agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1200
caggccccag gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag	1260
caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc	1320
ccccagcagg tggtagccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc	1380
cagcgctgtg tgccggtgct gtgccaggcc cagggcttga ccccgagca ggtggtggcc	1440
atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcgctt gttgccggtg	1500
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1620
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag	1680
acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg	1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtagccat cgccagcaat	1860
aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc	1920
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagcgctt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccctcag	2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaaggcgg cgctggagag cattgttgcc	2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg	2160
gcctgcctcg gcgggcgtcc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc	2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc	2400
aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggcgccatct acaccgtggg ctccccatc	2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcgcc	2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg	2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc	2760
ggcacctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg	2820

gccgactgat aa

2832

<210> 10

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDCD1_T01

<400> 10

ttctccccag cctgctcgt ggtgaccgaa ggggacaacg ccaccttca

49

<210> 11

<211> 2814

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDCD1_T01-L TALEN

<400> 11

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac

60

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc

120

aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt

180

acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccggcag cgtagggac cgtcgtgtc

240

aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc

300

ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagtgtg

360

agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaa acgtggcggc

420

gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac

480

ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag

540

acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg

600

gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgtgg agacgggtcca gcggtgttg

660

ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tggtaggcat cgccagcaat

720

ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtgt gtgccaggcc

780

cacggcttga ccccgagca ggtgtgtggc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg

840

ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag

900

caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg

960

ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc

1020

agccacgatg gcggaagca ggcgtggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1080
cagggccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggaag 1140
caggcgtgg agacggtcca gcggtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccggagcagg tgggtggcat cgccagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacggtg 1260
caggcgtgt tgcgggtgct gtgccaggcc cagggcttga ccccccagca ggtggtggcc 1320
atgccagca ataattgtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggt gtgtccggtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatgccag ccacgatggc 1440

ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1500
ttgaccccg agcaggtggt ggccatgcc agccacgatg gcggaagca ggcgtggag 1560
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc cagggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 1620
tgggcatcg ccagccacga tggcggaag caggcgtgg agacggtcca gcggtgttg 1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggcat cgccagcaat 1740
ggcgtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgt tgccggtgct gtgccaggcc 1800
cagggcttga ccccccagca ggtggtggcc atgccagca ataattgtgg caagcaggcg 1860

ctggagacgg tccagcggt gtgtccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 1920
caggtggtgg ccatgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatgcc 2040
agcaattggc gggcaggcc ggcgtggag agcattgttg ccagttatc tcgccctgat 2100
ccggcgttg ccgcttgac caacgaccac ctctgcct tggcctgcct cggcggcgct 2160
cctgcgttg atgcagtga aaagggttg ggggatccta tcagccgtc ccagctggtg 2220
aagtcgagc tggaggagaa gaaatccgag ttaggcaca agctgaagta cgtgcccac 2280

gagtacatcg agctgatga gatcggcgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg 2340
aagtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggtcc 2400
aggaagccc acggcgcat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactcgg cggtacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag 2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc 2640
aactacaagg cccagctgac caggtgaac cacatcacca actgcaacgg cggcgtgctg 2700

tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag 2760
gagtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttc cggccgactg ataa 2814

<210> 12

<211> 2829

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDCD1_T01-R TALEN

<400> 12

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgataac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca	180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttcgct taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc	360
acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagtgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgtcaactt gacccccgag caagtcgtcg caatcgccag ccatgatgga	540
gggaagcaag cctcgaac cgtgcagcgg ttgcttctg tgctctgcca ggcccacggc	600
cttaccctc agcagggtgt ggccatcgca agtaacggag gaggaaagca agccttgag	660
acagtgcagc gcctgttgcc cgtgtgtgac caggcacacg gcctcacacc agagcaggtc	720
gtggccattg cctccatga cggggggaaa caggctctgg agaccgtcca gaggtgctg	780
cccgctctct gtcaagctca cggcctgact cccaacaag tggtcgcat cgcctctaat	840
ggcggcggga agcaggcact ggaaacagtg cagagactgc tccctgtgct ttgccaagct	900
catgggttga ccccccaaca ggtcgtcgct attgcctcaa acgggggggg caagcaggcc	960
cttgagactg tgcagaggct gttgccagtg ctgtgtcagg ctcacgggct cactccacaa	1020
caggtggtcg caattgccag caacggcggc ggaaagcaag ctcttgaaac cgtgcaacgc	1080
ctctgcccc tgctctgtca ggctcatggc ctgacaccac aacaagtcgt ggccatcgcc	1140
agtaataatg gcggaagaca ggctcttgag accgtccaga ggctgctccc agtgcctgc	1200
caggcacacg ggctgacccc cgagcagggt gtggctatcg ccagcaatat tgggggcaag	1260
caggccctgg aaacagtcca ggccctgctg ccagtgttt gccaggctca cgggctcact	1320
ccccagcagg tcgtggcaat cgcctccaac ggcggaggga agcaggctct ggagaccgtg	1380
cagagactgc tgcccgtctt gtgccaggcc cacggactca cacctgaaca ggtcgtcgcc	1440
attgcctctc acgatggggg caaacaagcc ctggagacag tgcagcggt gttgcctgtg	1500
ttgtgccaag cccacggctt gactcctcaa caagtgtg ccatcgctc aaatggcggc	1560

ggaaaacaag ctctggagac agtgcagagg ttgctgcccc tcctctgcca agcccacggc 1620
ctgactcccc aacaggctgt cgccattgcc agcaacaacg gaggaaagca ggctctcgaa 1680
actgtgcagc ggctgcttcc tgtgtgtgtg caggctcatg ggctgacccc cgagcaagtg 1740
gtggctattg ccctaatgg aggcaagcaa gcccttgaga cagtccagag gctgttgcca 1800
gtgctgtgcc agggccacgg gctcacaccc cagcaggtagg tcgccatcgc cagtaacaac 1860

gggggcaaac aggcattgga aaccgtccag cgcctgtctc cagtgtcttg ccaggcacac 1920
ggactgacac ccgaacaggt ggtggccatt gcatcccatg atgggggcaa gcaggccctg 1980
gagaccgtgc agagactcct gccagtgttg tgccaagctc acggcctcac ccctcagcaa 2040
gtcgtggcca tcgcctcaaa cggggggggc cggcctgcac tggagagcat tgttgcccag 2100
ttatctcgcc ctgatccggc gttggccgcg ttgaccaacg accacctcgt cgccttggcc 2160
tgccctggcg ggctgtctgc gctggatgca gtgaaaaagg gattggggga tcctatcagc 2220
cgttcccagc tggatgaagtc cgagctggag gagaagaaat ccgagttgag gcacaagctg 2280

aagtacgtgc cccacgagta catcgagctg atcgagatcg cccggaacag caccaggac 2340
cgtatcctgg agatgaaggt gatggagttc ttcatgaagg tgtacggcta caggggcaag 2400
cacctggcg gctccaggaa gcccagcggc gccatctaca ccgtgggctc ccccatcgac 2460
tacggcgtga tcgtggacac caaggcctac tccggcggct acaacctgcc catcgccag 2520
gccgacgaaa tgcagaggta cgtggaggag aaccagacca ggaacaagca catcaacccc 2580
aacgagtggg ggaaggtgta cccctccagc gtgaccgagt tcaagttcct gttcgtgtcc 2640
ggccacttca agggcaacta caaggcccag ctgaccagge tgaaccacat caccaactgc 2700

aacggcgccg tgctgtccgt ggaggagctc ctgatcggcg gcgagatgat caaggccggc 2760
accctgaccc tggaggaggt gaggaggaag ttcaacaacg gcgagatcaa cttcgcggcc 2820
gactgataa 2829

<210> 13

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDCD1_T03

<400> 13

tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgaga tcaaagaga 49

<210> 14

<211> 2814

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> PDCD1_T03-L TALEN

<400> 14

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggct atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt	180
acacacgcgc acatcggtgc gtttaagccaa caccggcgag cgttagggac cgtcgctgtc	240
aagtatcagg acatgatcgc agcggttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgctc	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagttg	360
agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc	420
gtgacgcgag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgaccccg agcagggtgt ggccatcgcc agcaatatgt gtggcaagca ggcgctggag	540
acggtgcagg cgtgtgtgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg	600
gtggccatcg ccagccagca tggcggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtgttg	660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cgccagccac	720
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc	780
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcgggtg caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggtt gttgccgttg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag	900
caggtggtgg ccacgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc	1020
agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1080
caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tgggtgcaag	1140
caggcgctgg agacgggtcca gcggtgttg ccggtgtgt gccaggccca cggttgacc	1200
ccccagcagg tgggtggcat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc	1260
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc	1320
atcgccagca ataattggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg	1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag cagggtggtg ccacgccag caataatggt	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	1560

acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	1620
gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg	1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggccat cgccagccac	1740
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc	1800
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tcacggcgt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag	1920
caggtggtgg ccatcgccag caatatgtgt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccctc agcaggtggt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgtggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat	2100
ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctctgcct tggcctgcct cggcggcgct	2160
cctgcgttg atgcagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac	2280
gagtacatcg agctgatcga gatcggcgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg	2340
aagtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggtacaggg gcaagcacct gggcggctcc	2400
aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggtacaac ctgcccacg gccaggccga cgaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag	2580
gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaaggcg	2640
aactacaagg ccagctgac caggtgaac cacatcaca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814
<210> 15	
<211> 2829	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PDCD1_T03-R TALEN	
<400> 15	
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgtcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggca	180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg	240

ttagggaccg tcgtgtcaa gtatcaggac atgacgcag cgttgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc	360
acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttag acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgtcaactt gacccccgag caagtctcg caatcgccag ccatgatgga	540
gggaagcaag cctcgaaac cgtgcagcgg ttgcttcctg tgctctgcca ggcccacggc	600
cttaccctc agcaggtggt ggccatcgca agtaacggag gaggaaagca agccttgag	660
acagtgcagc gcctgttgc cgtgtgtgc caggcacacg gcctcacacc agagcaggtc	720
gtggccattg cctcccatga cggggggaaa caggctctgg agaccgtcca gaggtgctg	780
cccgtcctt gtcaagctca cggcctgact cccaacaag tggtcgcat cgcctctaat	840
ggggcgggga agcaggcact ggaaacagtg cagagactgc tcctgtgtt ttgccaagct	900
catgggttga ccccccaaca ggtcgtcgt attgcctcaa acgggggggg caagcaggcc	960
cttgagactg tgcagaggt gttgccagt ctgtgtcagg ctcacgggt cactccaaa	1020
caggtggtcg caattgccag caacggcggc ggaaagcaag ctcttgaaac cgtgcaacgc	1080
ctcctgccc tgctctgca ggctcatggc ctgacaccac aacaagtcgt ggccatcgcc	1140
agtaataatg gcgggaaaca ggctcttag accgtccaga ggctgctccc agtgcctgc	1200
caggcacacg ggctgacccc cgagcagggt gtggctatcg ccagcaatat tgggggcaag	1260
caggccctgg aaacagtcca ggccctgtg ccagtgttt gccaggctca cgggtcact	1320
ccccagcagg tcgtggcaat cgctccaac ggcgaggga agcaggctct ggagaccgtg	1380
cagagactgc tgcccgtctt gtgccaggcc caggactca cactgaaca ggtcgtcgcc	1440
attgcctctc acgatggggg caaacaagcc ctggagacag tgcagcggct gttgcctgtg	1500
ttgtgccaag cccacggctt gactcctcaa caagtgtcg ccatcgctc aaatggcggc	1560
ggaaaacaag ctctggagac agtgagagg ttgctgccc tcctctgcca agcccacggc	1620
ctgactcccc aacaggtcgt cgccattgcc agcaacaac gaggaaagca ggctctcgaa	1680
actgtgcagc ggctgcttcc tgtgtgtgt caggctcatg ggctgacccc cgagcaagtg	1740
gtggctattg cctctaatgg aggcaagca gcccttgaga cagtccagag gctgttgcca	1800
gtgtgtgcc agggccacgg gctcacacc cagcaggtgg tcgcatcgc cagtaacaac	1860
gggggcaaac aggcattgga aaccgtccag cgctgtctc cagtgtctg ccaggcacac	1920
ggactgacac ccgaacaggt ggtggccatt gcatccatg atgggggcaa gcaggccctg	1980

gagaccgtgc agagactcct gccagtgttg tgccaagctc acggcctcac ccctcagcaa 2040

gtcgtggcca tcgcctcaaa cggggggggc cggcctgcac tggagagcat tgttgcccag 2100

ttatctcgcc ctgateccgc gttggccgcg ttgaccaacg accacctcgt cgccttgccc 2160

tgccctggcg ggcgtcctgc gctggatgca gtgaaaaagg gattggggga tcctatcagc 2220

cgttcccagc tggatgaagc cgagctggag gagaagaaat ccgagttgag gcacaagctg 2280

aagtactgac ccacagagta catcgagctg atcgagatcg cccggaacag caccagagac 2340

cgtatcctgg agatgaaggt gatggagtgc ttcataaagg tgtacggcta caggggcaag 2400

cacctgggcg gctccaggaa gcccgcggc gccatctaca ccgtgggctc ccccatcgac 2460

tacggcgtga tcgtggacac caaggcctac tccggcggct acaacctgcc catcggccag 2520

gccgacgaaa tgcagaggtg cgtggaggag aaccagacca ggaacaagca catcaacccc 2580

aacgagtggg ggaaggtgta cccctccagc gtgaccgagt tcaagttcct gttcgtgtcc 2640

ggccacttca agggcaacta caaggcccag ctgaccaggc tgaaccacat caccaactgc 2700

aacggcgccg tgctgtccgt ggaggagctc ctgacggcgc gcgagatgat caaggccggc 2760

accctgaccc tggaggaggt gaggaggaag ttcaacaacg gcgagatcaa cttcgcggcc 2820

gactgataa 2829

<210> 16

<211> 386

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCLS27068: CTLA4a expression plasmid

<400> 16

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu

1 5 10 15

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln

20 25 30

Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys

35 40 45

Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu

50 55 60

Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met

65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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	Pr	

130 135 140
 Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
 145 150 155 160
 His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser
 165 170 175
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 180 185 190
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 195 200 205
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

 210 215 220
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 225 230 235 240
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 245 250 255
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 260 265 270
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 275 280 285

 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 290 295 300
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 305 310 315 320
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 325 330 335
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 340 345 350
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

 355 360 365
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

Gly Ser

385

<210> 18

<211> 293

<212> PRT

<213> 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 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

<400> 34

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

1 5 10

<210> 35

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Syncitin 1 virus, ISU peptide from gp41 env protein

<400> 35

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

1 5 10

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Syncitin 2 virus, ISU peptide from gp41 env protein

<400> 36

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

1 5 10

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HERV-K virus, ISU peptide from gp41 env protein

<400> 37

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

1 5 10

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FELV virus, ISU peptide from gp41 env protein

<400> 38

Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Ile Leu Phe Leu Gln Glu

1 5 10

<210> 39

<211> 526

<212> PRT

<213> 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 15

His Ala Ala Arg Pro Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu

20 25 30

Leu Ser Leu Ser Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln

35 40 45

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

50 55 60

Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro

100 105 110

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

115 120 125

Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met

145 150 155 160

Thr Met Trp Cys Leu Thr Leu Phe Val Leu Trp Met Leu Arg Val Val

165 170 175

Gly Met His Val Leu Arg Tyr Gly Tyr Thr Gly Ile Phe Asp Asp Thr

180	185	190
Ser His Met Thr Leu Thr Val Val Gly Ile Phe Asp Gly Gln His Phe		
195	200	205
Phe Thr Tyr His Val Asn Ser Ser Asp Lys Ala Ser Ser Arg Ala Asn		
210	215	220
Gly Thr Ile Ser Trp Met Ala Asn Val Ser Ala Ala Tyr Pro Thr Tyr		
225	230	235
240		
Leu Asp Gly Glu Arg Ala Lys Gly Asp Leu Ile Phe Asn Gln Thr Glu		
245	250	255
Gln Asn Leu Leu Glu Leu Glu Ile Ala Leu Gly Tyr Arg Ser Gln Ser		
260	265	270
Val Leu Thr Trp Thr His Glu Cys Asn Thr Thr Glu Asn Gly Ser Phe		
275	280	285
Val Ala Gly Tyr Glu Gly Phe Gly Trp Asp Gly Glu Thr Leu Met Glu		
290	295	300
Leu Lys Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Gly Pro Asn Tyr Glu Ile Ser		
305	310	315
320		
Trp Leu Lys Gln Asn Lys Thr Tyr Ile Asp Gly Lys Ile Lys Asn Ile		
325	330	335
Ser Glu Gly Asp Thr Thr Ile Gln Arg Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Cys		
340	345	350
Thr Gln Trp Ser Val Ile Tyr Ser Gly Phe Gln Thr Pro Val Thr His		
355	360	365
Pro Val Val Lys Gly Gly Val Arg Asn Gln Asn Asp Asn Arg Ala Glu		
370	375	380
Ala Phe Cys Thr Ser Tyr Gly Phe Phe Pro Gly Glu Ile Asn Ile Thr		
385	390	395
400		
Phe Ile His Tyr Gly Asn Lys Ala Pro Asp Asp Ser Glu Pro Gln Cys		
405	410	415
Asn Pro Leu Leu Pro Thr Phe Asp Gly Thr Phe His Gln Gly Cys Tyr		
420	425	430

Val Ala Ile Phe Cys Asn Gln Asn Tyr Thr Cys Arg Val Thr His Gly
435 440 445
Asn Trp Thr Val Glu Ile Pro Ile Ser Val Thr Ser Pro Asp Asp Ser
450 455 460
Ser Ser Gly Glu Val Pro Asp His Pro Thr Ala Asn Lys Arg Tyr Asn
465 470 475 480

Thr Met Thr Ile Ser Ser Val Leu Leu Ala Leu Leu Leu Cys Ala Leu
485 490 495
Leu Phe Ala Phe Leu His Tyr Phe Thr Thr Leu Lys Gln Tyr Leu Arg
500 505 510
Asn Leu Ala Phe Ala Trp Arg Tyr Arg Lys Val Arg Ser Ser
515 520 525
<210> 40
<211> 310
<212> PRT
<213> 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 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

160

Ala Leu His Pro Gly Ala Lys Lys Met Thr Glu Lys Trp Glu Lys Asn

165

170

175

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

180

185

190

Met Trp Leu Glu Glu Phe Leu Met Tyr Trp Glu Gln Met Leu Asp Pro

195

200

205

Thr

<210> 43

<211> 211

<212> PRT

<213> 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 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 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 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

tgatcctctt gtccacaga tatccagaac cctgaccctg ccgtgtacca gctgagaga 59

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

<400> 52
 atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggct atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc 60
 gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgtcgg ctacagccag 120

cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggca	180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgctgg caaacagtgg tccggcgac gcgctctgga ggccttgctc	360
acggtggcgg gagagttag aggtccaccg ttacagtgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaac gtggcggtt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	600
ttgaccccc agcaggtggt ggccatgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag	660
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc cagggccacg gcttgacccc ggagcaggtg	720
gtggccatcg ccagccagca tggcggaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg	780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtgccat cgccagcaat	840
attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc	900
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcgctt gttgccgtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag	1020
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatgcc	1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1200
cagggccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tgggtgcaag	1260
caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc	1320
ccccagcagg tgggtggcat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc	1380
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cagggcttga cccccagca ggtggtggcc	1440
atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcgctt gttgccggtg	1500
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag caatatggt	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1620
ttgaccccg agcaggtggt ggccatgcc agccacgatg gcgcaagca ggcgctggag	1680
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc cagggccacg gcttgacccc ggagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagcaatat tgggtgcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg	1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cgccagccac	1860
gatggcgga agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc	1920
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	1980

ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag	2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc	2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg	2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc	2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tgcgccgaa cagcaccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc	2400
aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggcgccatct acaccgtggg ctccccatc	2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc	2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg	2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc	2760
ggcacctga cctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg	2820
gccgactgat aa	2832
<210> 53	
<211> 2814	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TALEN TRAC RIGHT	
<400> 53	
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgaatg tccagattac	60
gctatcgata tgcggatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgcag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt	180
acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccggcgag cgtagggac cgtcgtgtc	240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcga cgttggcgtc	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg	360
agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgaaa acgtggcggc	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag	540
acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgtc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	600

gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg	660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtaggcat cgccagcaat	720
ggcggtaggca agcaggcgct ggagacggtc caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc	780
cacggcttga ccccgagca ggtgtaggccc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag	900
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc	1020
agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1080
caggccacag gcttgacccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtaggcaag	1140
caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc	1200
ccggagcagg tggtaggcat cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc	1260
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtgtaggccc	1320
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg	1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg gtgcaagca ggcgctggag	1560
acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcagggtg	1620
gtggccatcg ccagcaatgg cggtaggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg	1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtaggcat cgccagcaat	1740
attgtaggca agcaggcgct ggagacgggt caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc	1800
cacggcttga ccccccagca ggtgtaggccc atcgccagca atggcggtag caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag	1920
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg ccagttatc tcgccctgat	2100
ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctctgcctt tggcctgcct cggcggcgct	2160
cctgcgttg atgcagtga aaagggttg ggggattcta tcagccgtt ccagctggtg	2220
aagtcagagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac	2280
gagtacatcg agctgatcga gatcggcgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg	2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtcc	2400

aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460

gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgccatcg gccaggccga cgaaatgcag 2520

aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580

gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc 2640

aactacaagg ccagcgtgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700

tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760

gaggtgagga ggaagttaa 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

ttgtcccaca gatatccaga accctgacct tgccgtgtac cagctgaga 49

<210> 55

<211> 2814

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TALEN TRAC T01 LEFT

<400> 55

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggta atcgattacc catacgtgt tccagattac 60

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120

aaaccgaagg ttctgttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt 180

acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccggcgag cgtagggac cgtcgtgtc 240

aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300

ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagttg 360

agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420

gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480

ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 540

acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	600
gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg	660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtaggcat cgccagcaat	720
ggcggtagga agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc	780
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag	900
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc	1020
agccacgatg gcggaagca ggcgtggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1080
caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtaggcaag	1140
caggcgctgg agacggtgca ggcgtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc	1200
ccggagcagg tggtaggcat cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc	1260
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc	1320
atgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg	1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg tgggaagca ggcgtggag	1560
acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	1620
gtggccatcg ccagcaatgg cggtaggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg	1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtaggcat cgccagcaat	1740
attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc	1800
cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atgccagca atggcgtgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag	1920
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgtggag agcattgttg cccagttatc tcgcctgat	2100
ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctgcctgcct tggcctgcct cggcggcgct	2160
cctgccttgg atgcagtga aaagggttgg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccag ttgaggcaca agctgaagta cgtgcccac	2280

gagtacatcg agctgatcga gatcgcccgg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggctcc	2400
aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggtiacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag	2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttctg tgtccggcca cttaagggc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tcctggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacctt gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttct cggccgactg ataa	2814
<210> 56	
<211> 2832	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TALEN TRAC T01 RIGHT	
<400> 56	
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggct atcgataagg agaccgccgc tgccaagtgc	60
gagagacagc acatggacag catcgatctc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgagca ccacaggca	180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgtgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgac gcgctctgga ggccttgctc	360
acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagtgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgtcaactt gaccccgag caggtggtgg ccatgccag ccacgatggc	540
ggcaagcagg cgtggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	600
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag	660
acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgac caggccacg gcttgaccc ggagcaggtg	720
gtggccatcg ccagccagca tggcggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg	780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtagccat cgccagcaat	840
attggtgga agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc	900
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataaggtgg caagcaggcg	960

ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag	1020
caggtggtgg ccatgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc	1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1200
caggccccag gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tgggtgcaag	1260
caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc	1320
ccccagcagg tgggtggccat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc	1380
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cagggttga cccccagca ggtggtggcc	1440
atgccagca atggcgggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg	1500
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatgccag caatatggt	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1620
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag	1680
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccccag gcttgacccc ggagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg	1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggccat cgccagccac	1860
gatggcgga agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc	1920
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atgccagca ataatggtgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag	2040
caggtggtgg ccatgccag caatggcggc ggcaaggcgg cgctggagag cattgttgcc	2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg	2160
gcctgcctcg gcgggcgtcc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc	2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tgccccagca gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc	2400
aagcacctgg gcggtccag gaagcccgac ggcgcatct acaccgtggg ctccccatc	2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gccatcggc	2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg	2640
tccggccact tcaagggaac ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700

tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760

ggcacctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 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

tttagaaagt tctgtgatg tcaagctggt cgagaaaagc tttagaaaca 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 gatattgatt ctcaaaca 49

<210> 59

<211> 49

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> gene

<222> (1)..(49)

<223> Target TRAC-T04

<400> 59

tatatcacag 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
 tgtgtttgag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa aaggccaca 49

<210> 62
 <211> 2814
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> TALEN TRBC_T01 LEFT
 <400> 62
 atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgaatgt tccagattac 60

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
 aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgcag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt 180
 acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccgcgcag cgttagggac cgtcgtgtc 240
 aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300
 ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagtgtg 360
 agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaa acgtggcggc 420
 gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480

ttgaccccc agcagggtgtt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 540
 acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgtc caggccccag gcttgacccc ccagcaggtg 600
 gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg 660
 ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg ttgtggccat cgccagcaat 720

aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc	780
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggagg caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag	900
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc	1020
agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1080
caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tgggtgcaag	1140
caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc	1200
ccggagcagg tgggtggcat cgccagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacggtg	1260
caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc	1320
atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg	1380
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgtggag	1560
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg	1620
gtggccatcg ccagcaatat tgggtgcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgtgttg	1680
ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc cccagcagg tgggtggcat cgccagcaat	1740
ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc	1800
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag	1920
caggtggtgg ccatcgccag caatatgtt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgtggag agcattgttg ccagttatc tcgccctgat	2100
ccggcgttgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcctgcct tggcctgcct cggcgggcgt	2160
cctgccttgg atgcagtga aaagggttgg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac	2280
gagtacatcg agctgatcga gatcggcgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg	2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggctcc	2400
aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg cctactcgg cggtctacaac ctgccatcg gccaggccga cgaaatgcag	2520

aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag	2580
gigtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttaagggc	2640
aactacaagg ccagcgtgac cagcgtgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tccgtggagg agtcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacctt gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814
<210> 63	
<211> 2832	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TALEN TRBC_T01 RIGHT	
<400> 63	
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggca	180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca ccgggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgagc cgttgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc	360
acggtggcgg gagagtttag aggtccaccg ttacagttag acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaac gtggcgcgct gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc	600
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag	660
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	720
gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag caggcgctgg agacggtcca gcgctgttg	780
ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc cccagcagg tggtagccat cgccagcaat	840
aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc	900
cacggttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggtt gttgccgttg ctgtgccagg cccacggctt gacccccgag	1020
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc	1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1200

caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaatgg cggtaggaag	1260
caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc	1320
ccccagcagg tggtaggcat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc	1380
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc	1440
atgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtg gttgccggtg	1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatgccag caataatgt	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1620
ttgaccccc agcaggtggt ggccatgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	1680
acgtccagc ggtgtgtgcc ggtgtgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagcaataa tggtaggaag caggcgctgg agcgggtcca gcggctgttg	1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtaggcat cgccagcaat	1860
ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc	1920
cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atgccagca ataagtgtgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagcggtg gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag	2040
caggtggtgg ccatgccag caatggcggc ggccaggcgg cgctggagag cattgtgtcc	2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg	2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgtggat gcagtaaaa agggattggg ggatcctatc	2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tgccccagca gtacatcgag ctgatcgaga tgcgccgaa cagcaccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc	2400
aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggcccatct acaccgtggg ctccccatc	2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc	2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg	2640
tccggccact tcaagggaac ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc	2760
ggcacctga cctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg	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

ttcccccccg aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctccca 50

<210> 65

<211> 2814

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TALEN TRBC_T02 LEFT

<400> 65

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggct atcgattacc catacgatgt tccagattac 60

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120

aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgagc caccacgagg cactggctcg ccacgggttt 180

acacacgcgc acatcgttgc gtttaagcaa caccgcgagc cgttagggac cgtcgctgtc 240

aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300

ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtgc gggagagtgc 360

agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420

gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480

ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 540

acggtccagc ggctgttgc ggtgctgtgc caggccacgc gcttgacccc ggagcaggtg 600

gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg 660

ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cgcagccac 720

gatggcggca agcaggcgct ggagacggct cagcggtgtg tgccggtgct gtccagggc 780

cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atatgtgtgg caagcaggcg 840

ctggagacgg tgcaggcgt gttgccgtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag 900

caggtggtgg ccacgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 960

ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc 1020

agccacgatg gcggcaagca ggcgtggag acggtccagc ggctgttgc ggtgctgtgc 1080

caggccacgc gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag 1140

caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc	1200
ccccagcagg tggtagccat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc	1260
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cagggcttga ccccgagca ggtggtggcc	1320
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg	1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatgccag caataatggt	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	1560
acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgtgtgct caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	1620
gtggccatcg ccagcaatgg cggtaggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg	1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtagccat cgccagccac	1740
gatggcgga agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc	1800
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag	1920
caggtggtgg ccatgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat	2100
ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcctt tggcctgcct cggcgggctg	2160
cctgcctggt atgcagttaa aaagggttg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac	2280
gagtacatcg agctgatcga gatgccccgg aacagcacc caggaccgat cctggagatg	2340
aagtgatggt agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggtccc	2400
aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggtccccca tcgactacgg cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca acccaacga gtggtggaag	2580
gtgtacccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc	2640
aactacaagg ccagcgtgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814
<210> 66	
<211> 2832	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> TALEN TRBC_T02 RIGHT

<400> 66

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgagca ccacaggcca	180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cggtgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgctgg caaacagtgg tccggcgac gcgctctgga ggccttgctc	360
acggtggcgg gagagttag aggtccaccg ttacagtgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	600
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	660
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	720
gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtgttg	780
ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc ccggagcagg tgggtgcat cgccagcaat	840
attgttgcca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc	900
cacggttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag	1020
caggtggtgg ccatcgccag caatatgtgt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg	1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc	1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1200
caggccccac gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggaag	1260
caggcgctgg agacgggtcca gcggtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc	1320
ccccagcagg tgggtgcat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc	1380
cagcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc caggttga ccccgagca ggtggtggcc	1440
atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg	1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcgtt	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1620
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	1680

acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg 1740
 gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg 1800
 ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tggtagccat cgccagcaat 1860
 ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 1920

cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atgccagca atggcgggtg caagcaggcg 1980
 ctggagacgg tccagcggtt gttgccgttg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
 caggtggttg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc 2100
 cagttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg 2160
 gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc 2220
 agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
 ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccgaa cagcaccag 2340

gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
 aagcacctgg gcggctccag gaagcccac ggcgccatct acaccgtggg ctccccatc 2460
 gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc 2520
 caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
 cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
 tccggccact tcaaggcga ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
 tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760

ggcacctga cctggagga ggtgaggagg aagttaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
 gccgactgat aa 2832

<210> 67

<211> 557

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> murine, CD19 antigen

<400> 67

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met

1 5 10 15

Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp

20 25 30

Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln

35 40 45
 Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu
 50 55 60
 Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile
 65 70 75 80
 Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu
 85 90 95
 Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr

 100 105 110
 Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp
 115 120 125
 Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro
 130 135 140
 Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala
 145 150 155 160
 Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro
 165 170 175

 Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro
 180 185 190
 Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser
 195 200 205
 Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
 210 215 220
 Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
 225 230 235 240
 Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala

 245 250 255
 Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
 260 265 270
 Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
 275 280 285
 Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu

290 295 300
 Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg
 305 310 315 320

 Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val
 325 330 335
 Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu
 340 345 350
 Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala
 355 360 365
 Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp
 370 375 380
 Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly

 385 390 395 400
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu
 405 410 415
 Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu
 420 425 430
 Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly
 435 440 445
 Pro Glu Asp Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu
 450 455 460

 Asp Glu Glu Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser
 465 470 475 480
 Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Ala
 485 490 495
 Gly Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro
 500 505 510
 Gln Leu Arg Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp
 515 520 525
 Ala Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala

 530 535 540

Trp Gly Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg

545 550 555

<210> 68

<211> 300

<212> PRT

<213> 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 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	Leu	Val	Pro	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu		
225					230					235					240		
Phe	Val	Leu	Gly	Leu	Phe	Leu	Trp	Phe	Leu	Lys	Arg	Glu	Arg	Gln	Glu		
				245					250						255		
Glu	Tyr	Ile	Glu	Glu	Lys	Lys	Arg	Val	Asp	Ile	Cys	Arg	Glu	Thr	Pro		
			260					265					270				
Asn	Ile	Cys	Pro	His	Ser	Gly	Glu	Asn	Thr	Glu	Tyr	Asp	Thr	Ile	Pro		
		275					280					285					
His	Thr	Asn	Arg	Thr	Ile	Leu	Lys	Glu	Asp	Pro	Ala	Asn	Thr	Val	Tyr		
	290					295					300						
Ser	Thr	Val	Glu	Ile	Pro	Lys	Lys	Met	Glu	Asn	Pro	His	Ser	Leu	Leu		
305					310					315					320		
Thr	Met	Pro	Asp	Thr	Pro	Arg	Leu	Phe	Ala	Tyr	Glu	Asn	Val	Ile			
				325					330					335			
<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 80

Asn Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu

85 90 95

Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu

100 105 110

Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys

115 120 125

Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe

130 135 140

Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys

145 150 155 160

Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu

165 170 175

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 Asp Asn Gly
 385 390 395 400
 Tyr Ser Ile Ser Lys Phe Cys Asn His Lys His Gln Pro Gly Glu Tyr

 405 410 415
 Ile Phe His Ala Glu Asn Asp Asp Ala Gln Phe Thr Lys Met Phe Thr
 420 425 430
 Leu Asn Ile Arg Arg Lys Pro Gln Val Leu Ala Glu Ala Ser Ala Ser
 435 440 445
 Gln Ala Ser Cys Phe Ser Asp Gly Tyr Pro Leu Pro Ser Trp Thr Trp
 450 455 460
 Lys Lys Cys Ser Asp Lys Ser Pro Asn Cys Thr Glu Glu Ile Thr Glu
 465 470 475 480

 Gly Val Trp Asn Arg Lys Ala Asn Arg Lys Val Phe Gly Gln Trp Val
 485 490 495
 Ser Ser Ser Thr Leu Asn Met Ser Glu Ala Ile Lys Gly Phe Leu Val
 500 505 510
 Lys Cys Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Gly Thr Ser Cys Glu Thr Ile Leu
 515 520 525
 Leu Asn Ser Pro Gly Pro Phe Pro Phe Ile Gln Asp Asn Ile Ser Phe
 530 535 540

Tyr Ala Thr Ile Gly Val Cys Leu Leu Phe Ile Val Val Leu Thr Leu

545 550 555 560

Leu Ile Cys His Lys Tyr Lys Lys Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu

565 570 575

Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val

580 585 590

Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Glu

595 600 605

Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Lys Val

610 615 620

Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val Ser Ile Gln

625 630 635 640

Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Lys Ala Asp Ser Ser Glu Arg Glu

645 650 655

Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Met Met Thr Gln Leu Gly Ser His Glu

660 665 670

Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Leu Ser Gly Pro Ile Tyr

675 680 685

Leu Ile Phe Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu Asn Tyr Leu Arg

690 695 700

Ser Lys Arg Glu Lys Phe His Arg Thr Trp Thr Glu Ile Phe Lys Glu

705 710 715 720

His Asn Phe Ser Phe Tyr Pro Thr Phe Gln Ser His Pro Asn Ser Ser

725 730 735

Met Pro Gly Ser Arg Glu Val Gln Ile His Pro Asp Ser Asp Gln Ile

740 745 750

Ser Gly Leu His Gly Asn Ser Phe His Ser Glu Asp Glu Ile Glu Tyr

755 760 765

Glu Asn Gln Lys Arg Leu Glu Glu Glu Glu Asp Leu Asn Val Leu Thr

770 775 780

Phe Glu Asp Leu Leu Cys Phe Ala Tyr Gln Val Ala Lys Gly Met Glu

785 790 795 800
 Phe Leu Glu Phe Lys Ser Cys Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn
 805 810 815
 Val Leu Val Thr His Gly Lys Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu
 820 825 830
 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

<400> 73

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala

1 5 10 15

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln

20 25 30

Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro

35 40 45

Tyr Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly

50 55 60

Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln

65 70 75 80

Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro

85 90 95

Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp

100 105 110

Asn Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser

115 120 125

Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg

130 135 140

Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn

145 150 155 160

Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile

165 170 175

Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr

180 185 190

His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr

195 200 205

Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu

210 215 220

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

[illegible]

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
 385 390 395 400
 Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu
 405 410 415
 Gln Glu Arg Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro
 420 425 430
 Asn Gln Ala Leu Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile
 435 440 445

 Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp
 450 455 460
 Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu
 465 470 475 480
 Arg Glu Ala Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala
 485 490 495
 Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly
 500 505 510
 Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe

 515 520 525
 Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser
 530 535 540
 Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr
 545 550 555 560
 Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val
 565 570 575
 Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala

580 585 590
 Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys
 595 600 605
 Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr
 610 615 620
 Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu
 625 630 635 640
 Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile
 645 650 655
 Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys
 660 665 670
 Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala
 675 680 685
 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 Gly Cys Ala Leu Pro Val
85 90 95

Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly
 100 105 110
 Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro
 115 120 125

 Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro
 130 135 140
 Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe
 145 150 155 160
 Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg
 165 170 175
 Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln
 180 185 190
 Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser

 195 200 205
 Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly
 210 215 220
 Thr Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro
 225 230 235 240
 Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu
 245 250 255
 Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr
 260 265 270

 Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro
 275 280 285
 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met
 290 295 300
 Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly His Ser Thr
 305 310 315 320
 Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln
 325 330 335
 Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg

340 345 350
 Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr
 355 360 365
 Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg
 370 375 380
 Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly
 385 390 395 400
 Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser
 405 410 415

 Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys
 420 425 430
 Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His
 435 440 445
 Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 450 455 460
 Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 465 470 475 480
 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala

485 490 495
 Leu

<210> 77
 <211> 671
 <212> PRT
 <213> 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 15
 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 Thr Ala Cys Pro Tyr Ser
 50 55 60
 Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro
 65 70 75 80
 Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
 85 90 95
 Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
 100 105 110

 Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
 115 120 125
 Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg
 130 135 140
 Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Arg Ala Glu
 145 150 155 160
 Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
 165 170 175
 Pro Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val

 180 185 190
 Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
 195 200 205
 Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 210 215 220
 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
 225 230 235 240
 Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
 245 250 255

 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
 260 265 270
 Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 275 280 285
 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr

290 295 300
 Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 305 310 315 320
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly

 325 330 335
 Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly
 340 345 350
 Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg
 355 360 365
 Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr
 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 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 Gly Pro Asp Ser Phe Tyr Cys Ala Tyr Trp Gly
 165 170 175
 Cys Glu Thr Thr Gly Arg Ala Tyr Trp Lys Pro Ser Ser Ala Trp Asp
 180 185 190
 Phe Ile Thr Val Asn Asn Asn Leu Thr Ser Asp Gln Ala Val Gln Val
 195 200 205
 Cys Lys Asp Asn Lys Trp Cys Asn Pro Leu Val Ile Arg Phe Thr Asp
 210 215 220
 Ala Gly Arg Arg Val Thr Ser Trp Thr Thr Gly His Tyr Trp Gly Leu
 225 230 235 240
 Arg Leu Tyr Val Ser Gly Gln Asp Pro Gly Leu Thr Phe Gly Ile Arg
 245 250 255
 Leu Arg Tyr Gln Asn Leu Gly Pro Arg Val Pro Ile Gly Pro Asn Pro
 260 265 270
 Val Leu Ala Gly Gln Gln Pro Leu Ser Lys Pro Lys Pro Val Lys Ser
 275 280 285
 Pro Ser Val Thr Lys Pro Pro Ser Gly Thr Pro Leu Ser Pro Thr Gln
 290 295 300
 Leu Pro Pro Ala Gly Thr Glu Asn Arg Leu Leu Asn Leu Val Asp Gly
 305 310 315 320
 Ala Tyr Gln Ala Leu Asn Leu Thr Ser Pro Asp Lys Thr Gln Glu Cys
 325 330 335

Trp Leu Cys Leu Val Ala Gly Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Val Ala Val
 340 345 350

 Leu Gly Thr Tyr Ser Asn His Thr Ser Ala Pro Ala Asn Cys Ser Val
 355 360 365
 Ala Ser Gln His Lys Leu Thr Leu Ser Glu Val Thr Gly Gln Gly Leu
 370 375 380
 Cys Ile Gly Ala Val Pro Lys Thr His Gln Ala Leu Cys Asn Thr Thr
 385 390 395 400
 Gln Thr Ser Ser Arg Gly Pro Tyr Tyr Leu Val Ala Pro Thr Gly Thr
 405 410 415
 Met Trp Ala Cys Asn Thr Gly Leu Thr Pro Cys Ile Ser Thr Thr Ile

 420 425 430
 Leu Asn Leu Thr Thr Asp Tyr Cys Val Leu Val Glu Leu Trp Pro Arg
 435 440 445
 Val Thr Tyr His Ser Pro Ser Tyr Val Tyr Gly Leu Phe Glu Lys Ser
 450 455 460
 Asn Arg His Lys Arg Glu Pro Val Ser Leu Thr Leu Ala Leu Leu Leu
 465 470 475 480
 Gly Gly Leu Thr Met Gly Gly Ile Ala Ala Gly Val Gly Thr Gly Thr
 485 490 495

 Thr Ala Leu Met Ala Thr Gln Gln Phe Gln Gln Leu His Ala Ala Val
 500 505 510
 Gln Asp Asp Leu Arg Glu Val Glu Lys Ser Ile Ser Asn Leu Glu Lys
 515 520 525
 Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu
 530 535 540
 Asp Leu Leu Phe Leu Lys Glu Gly Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu
 545 550 555 560
 Glu Cys Cys Phe Tyr Ala Asp His Thr Gly Leu Val Arg Asp Ser Met

 565 570 575
 Ala Lys Leu Arg Glu Arg Leu Asn Gln Arg Gln Lys Leu Phe Glu Ser

580 585 590
 Thr Gln Gly Trp Phe Glu Gly Leu Phe Asn Arg Ser Pro Trp Phe Thr
 595 600 605
 Thr Leu Ile Ser Thr Ile Met Gly Pro Leu Ile Val Leu Leu Met Ile
 610 615 620
 Leu Leu Phe Gly Pro Cys Ile Leu Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys
 625 630 635 640

Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala Leu Val Leu Thr Gln Gln Tyr His
 645 650 655
 Gln Leu Lys Pro Ile Glu Tyr Glu Pro
 660 665

<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 Leu Met Leu Arg Gly Val Ser

20 25 30
 Arg Glu Pro Val Ser Leu Thr Leu Ala Leu Leu Leu Gly Gly Leu Thr
 35 40 45
 Met Gly Gly Ile Ala Ala Gly Val Gly Thr Gly Thr Thr Ala Leu Met
 50 55 60
 Ala Thr Gln Gln Phe Gln Gln Leu His Ala Ala Val Gln Asp Asp Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Val Glu Lys Ser Ile Ser Asn Leu Glu Lys Ser Leu Thr Ser
 85 90 95

Leu Ser Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe
 100 105 110
 Leu Lys Glu Gly Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys Phe

115 120 125
 Tyr Ala Asp His Thr Gly Leu Val Arg Asp Ser Met Ala Lys Leu Arg
 130 135 140
 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