



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0143926
(43) 공개일자 2021년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2014.01)
C07K 14/735 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7037383(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년05월13일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2015-7035331
원출원일자(국제) 2014년05월13일
심사청구일자 2019년04월16일
(85) 번역문제출일자 2021년11월16일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2014/061409
(87) 국제공개번호 WO 2014/184741
국제공개일자 2014년11월20일
(30) 우선권주장
13/892,805 2013년05월13일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
셀렉티스
프랑스, 에프-75013 파리, 튀 드 라 크로아 재리
8
(72) 발명자
갈레토, 로망
프랑스, 에프-75014 파리, 12 튀 어니스트 크레송
구블, 아네스
프랑스, 에프-75017 파리, 튀 드 토크빌, 65
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유한) 대아

전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 면역 요법을 위한 동종이형 및 고효율성 T 세포의 조작 방법들

(57) 요약

본 발명은 비(non)-동종반응성(alloreactive)인 면역요법을 위한 조작된 T-세포들을 발달시키는 방법들에 대한 것이다. 본 발명은 면역 반응의 잠재성(potential)을 불려일으키기(unleash) 위하여 면역 체크포인트 유전자 및 T-세포 수용체를 코딩하는 유전자들 둘다를 불활성화시킴으로써 T-세포들을 변형시키는 방법들에 대한 것이다. 이 방법은 일차(primary) 세포들의 배양으로부터 또는 도너들로부터 이용가능한, T-세포들에서 주요 유전자들의 선택을 정확히 타겟으로 하기 위하여, 이러한 폴리펩타이드들을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드들 및 특이적 희귀 절단 엔도뉴클레아제들, 특히 TALE-뉴클레아제들(TAL 이펙터(effector) 엔도뉴클레아제)의 사용을 포함한다. 본 발명은 바이러스 감염 및 암을 치료하기 위한 표준이며 입수가 가능한 입양 면역요법 전략들로의 길을 연다.

대표도 - 도1

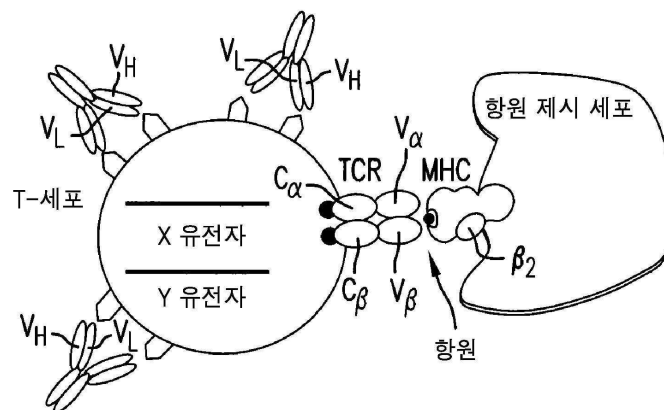


Fig.1

(52) CPC특허분류

C07K 14/70535 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
C12N 2501/39 (2013.01)
C12N 2501/51 (2013.01)
C12N 2501/515 (2013.01)
C12N 2501/599 (2013.01)
C12N 2502/99 (2013.01)

(72) 발명자

그로스, 스테파니

프랑스, 에프-77750 생 시르 쉬르 모랭, 뒤 드 모
라스, 7

쉬퍼-마니위, 세실

프랑스, 에프-94350 빌리에르 쉬르 마르네, 8 비스
뒤 모리스 로이

쁘아로, 로랑

프랑스, 에프-75018 파리, 뒤 드 토르쎈, 4

샤렌버그, 앤드류

미국, 워싱턴 98177, 시애틀, 엔더블유 노크로스
웨이, 1222

스미스, 질리안

프랑스, 에프-92350 르 블레시스 로빈슨, 뒤 드 라
페르메, 13

(30) 우선권주장

PCT/US2013/040755 2013년05월13일 미국(US)
PCT/US2013/040766 2013년05월13일 미국(US)
13/942,191 2013년07월15일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 적어도:

- 면역 체크포인트 단백질을 코드하는 첫 번째 유전자, 및
- T-세포 수용체 (TCR)의 요소(component)를 코드하는 두 번째 유전자를 불활성화시킴으로써 T-세포(들)을 변형시키는 단계; 및

(b) 상기 T-세포(들)을 확장시키는(expanding) 단계

를 포함하는, 면역요법을 위한 T-세포(들)을 준비하는(preparing) 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

(a) 상기 T-세포 내로 DNA 절단(cleavage)에 의하여 각각을 선택적으로 불활성화시킬 수 있는 적어도 하나의 희귀-절단 엔도뉴클레아제를 도입하는 단계:

- 면역 체크포인트 단백질을 코드하는 상기 유전자, 및
- T-세포 수용체 (TCR)의 한 요소(component)를 코드하는 적어도 하나의 유전자; 및

(b) 상기 T-세포들을 확장시키는 단계

에 의하여 T-세포들을 변형시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 면역 체크포인트 유전자는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법: PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 및 2B4.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 변형된 T-세포들은 환자의 혈액 내에서 확장(expand)되는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 변형된 T-세포들은 인-비보(in-vivo)에서 확장(expand)되는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,
상기 면역 체크포인트 유전자는 PD1 또는 CTLA-4인 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,
적어도 첫 번째 및 두 번째 불활성화된 유전자들이 PD1 및 TCR 알파, PD1 및 TCR 베타, CTLA-4 및 TCR 알파, CTLA-4 및 TCR 베타, LAG3 및 TCR 알파, LAG3 및 TCR 베타, Tim3 및 TCR 알파, Tim3 및 TCR 베타, BTLA 및 TCR 알파, BTLA 및 TCR 베타, BY55 및 TCR 알파, BY55 및 TCR 베타, TIGIT 및 TCR 알파, TIGIT 및 TCR 베타, B7H5 및 TCR 알파, B7H5 및 TCR 베타, LAIR1 및 TCR 알파, LAIR1 및 TCR 베타, SIGLEC10 및 TCR 알파, SIGLEC10 및 TCR 베타, 2B4 및 TCR 알파, 및 2B4 및 TCR 베타로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 8

제 2항에 있어서,
상기 적어도 하나의 희귀-절단 엔도뉴클레아제는 mRNA에 의하여 코딩되는 방법.

청구항 9

제 2항에 있어서,
RNA 전기천공법에 의하여 단계 (a)에서 상기 T-세포 내로 하나 또는 그보다 많은 희귀-절단 엔도뉴클레아제(들)을 도입하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 10

제 2항에 있어서,
상기 적어도 하나의 희귀-절단 엔도뉴클레아제는 TALE-뉴클레아제인 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,
적어도 하나의 TALE-뉴클레아제가 서열번호: 37, 또는 서열번호: 57 내지 서열번호: 60로부터 선택되는 TCR알파의 유전자 타겟 서열들 중 하나로 향해지는 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서,
적어도 하나의 TALE-뉴클레아제가 서열번호: 38 및 서열번호: 39로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR베타의 유전자 타겟 서열들 중 하나에 향해지는 방법.

청구항 13

제 10항에 있어서,

적어도 하나의 TALE-뉴클레아제가 서열번호: 77 및 서열번호: 78로 구성된 군으로부터 선택되는 PD1의 유전자 타겟 서열들 중 하나로 향해지는 방법.

청구항 14

제 10항에 있어서,

적어도 하나의 TALE-뉴클레아제가 서열번호: 74 및 서열번호: 76으로 구성된 군으로부터 선택되는 CTLA-4의 유전자 타겟 서열들 중 하나로 향해지는 방법.

청구항 15

제 1항에 있어서,

상기 T-세포(들) 내로 키메라 항원 수용체 (CAR)를 도입하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 16

제 1항에 있어서,

단계 a)의 상기 T-세포(들)은 염증성 T-림프구들, 세포독성 T-림프구들, 조절(regulatory) T-림프구들 또는 헬퍼(helper) T-림프구들로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 17

제 1항에 있어서,

단계 a)의 상기 T-세포(들)은 CD4+ T-림프구들 및/또는 CD8+ T-림프구들로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 18

제 1항의 방법, 또는 그것의 서브컬처(subculture)에 의하여 수득가능한 세포주 또는 분리된 T-세포.

청구항 19

분리된 T-세포로, 적어도 두 개의 유전자들이 불활성화되었고, 이 유전자들은: PD1 및 TCR 알파, PD1 및 TCR 베타, CTLA-4 및 TCR 알파, CTLA-4 및 TCR 베타, LAG3 및 TCR 알파, LAG3 및 TCR 베타, Tim3 및 TCR 알파, Tim3 및 TCR 베타, BTLA 및 TCR 알파, BTLA 및 TCR 베타, BY55 및 TCR 알파, BY55 및 TCR 베타, TIGIT 및 TCR 알파, TIGIT 및 TCR 베타, B7H5 및 TCR 알파, B7H5 및 TCR 베타, LAIR1 및 TCR 알파, LAIR1 및 TCR 베타, SIGLEC10 및 TCR 알파, SIGLEC10 및 TCR 베타, 2B4 및 TCR 알파, 2B4 및 TCR 베타: 로 구성된 군으로부터 선택되는, 분리된 T-세포.

청구항 20

제 19항에 있어서,

키메라 항원 수용체를 코딩하는 외인성(exogenous) 폴리뉴클레오타이드 서열을 더 포함하는 분리된 T-세포.

청구항 21

제 20항에 있어서,

상기 키메라(Chimeric) 항원(Antigen) 수용체(Receptor)는 다사슬(multi-chain) 키메라 항원 수용체인 분리된 T-세포.

청구항 22

제 19항에 있어서,

CD3 표면 발현을 지지하기 위하여 적어도 pT알파(pTalpha) 이식유전자(transgene)의 단편을 포함하는 외인성(exogenous) 핵산을 더 포함하는, 분리된 T-세포.

청구항 23

의약으로서 사용을 위한 제 19항의 분리된 T-세포.

청구항 24

암 또는 바이러스 감염을 치료하기 위한, 제 19항의 분리된 T-세포.

청구항 25

림프종(lymphoma)을 치료하기 위한, 제 19항의 분리된 T-세포.

청구항 26

제 19항의 적어도 하나의 분리된 T-세포를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 27

(a) 제 1항의 방법에 따라 변형된 T-세포들의 개체군(population)을 준비하는 단계; 및

(b) 상기 환자에 상기 변형된 T-세포들을 투여하는 단계를 포함하는

환자의 치료 방법.

청구항 28

제 27항에 있어서,

상기 환자는 암, 바이러스 감염, 자가면역 장애 또는 이식편대숙주(Graft versus Host) 질환(Disease) (GvHD) 으로 진단된 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 면역 요법을 위한 조작된 비(non)- 동종반응성(alloreactive) T-세포들을 개발하는 방법들 및 더욱 특이적으로는 면역 반응의 잠재성을 촉발시키기 위하여 적어도 하나의 면역 체크포인트(checkpoint) 및 T-세포

[0001]

수용체를 코드하는 유전자들 둘 다를 불활성화시킴으로써 T-세포들을 변형시키기 위한 방법들에 대한 것이다. 이 방법은 1차(primary) 세포들의 배양으로부터 또는 도너(donor)들로부터 이용가능한, T-세포들에서 핵심(key) 유전자들의 선택을 정확히 타겟(target)으로 하기 위한, 특이적인 희귀(rare) 절단(cutting) 엔도뉴클레아제들(endonucleases), 특히 TALE-뉴클레아제들(nucleases) (TAL 이펙터(effector) 엔도뉴클레아제(endonuclease)) 및 이러한 폴리펩타이드들을 코드하는 폴리뉴클레오타이드들의 용도를 포함한다. 본 발명은 또한 preTCR α ("pTalpha") 및 그것의 기능적 파생물(derivatives)과 같은, 이러한 조작된 T 세포들 내로 가져가질 수 있는 추가의 속성들(attributes), 키메라(Chimeric) 항원(Antigen) 수용체(Receptor) (CAR), 다사슬(multichain) CAR 및 면역요법의 효율을 증강시키기 위한 그것들의 용도에 대한 것이다. 본 발명은 암 및 바이러스 감염들을 치료하기 위한 표준 및 알맞은(affordable) 입양(adoptive) 면역요법(immunotherapy) 전략들로의 길을 연다.

배경 기술

- [0003] 엑스 비보(ex vivo)에서 만들어지는 자가(autologous) 항원-특이적 T 세포들의 이동을 수반하는 입양(adoptive) 면역요법(immunotherapy)은 바이러스 감염 및 암을 치료하는 유망한 전략이다. 입양 면역요법에 사용되는 T 세포들은 유전자 조작을 통한 T 세포들의 방향수정(redirection) 또는 항원-특이적 T 세포들의 확대(expansion)에 의하여 만들어질 수 있다(Park, Rosenberg et al. 2011). 바이러스 항원 특이적 T 세포들의 이동은 희귀 바이러스-관련 악성종양들(malignancies) 및 바이러스 감염들과 관련된 이식의 치료에 사용되는 잘 자리잡은 절차이다. 유사하게 종양(tumor) 특이적 T 세포들의 이동 및 분리는 흑색종(melanoma)을 치료하는데 성공적인 것으로 보여져 왔다.
- [0005] T 세포들의 신규한 특이성들은 키메라(chimeric) 항원(antigen) 수용체들(receptors) (CARs) 또는 형질전환(transgenic) T 세포 수용체들의 유전적 이동을 통하여 성공적으로 만들어져왔다(Jena, Dotti et al. 2010). CAR들은 단일 융합(fusion) 분자 내 하나 또는 그보다 많은 신호 도메인들(domains)과 관련된 타겟팅 모이어티(moiety)로 구성되는 합성(synthetic) 수용체들이다. 일반적으로 CAR의 결합(binding) 모이어티는, 플렉시블(flexible) 링커(linker)에 의하여 연결된(join) 단일클론 항체의 가벼운(light) 가변(variable) 단편들(fragment)을 포함하는, 단일(single)-사슬(chain) 항체(antibody)(scFv)의 항원-결합 도메일로 구성된다. 수용체 또는 리간드 도메인들에 기초한 결합 모이어티들은 또한 성공적으로 사용되어 왔다. 일 세대 CAR들을 위한 신호 도메인들은 Fc 수용체 감마 사슬들 또는 CD3제타(zeta)의 세포질 영역으로부터 유래된다. 일(first) 세대 CAR들은 T 세포 세포독성을 성공적으로 전용하는(redirect) 것으로 보여졌으나, 그것들은 인 비보(in vivo)에서 항-종양 활성 및 장기적인 확대를 제공하는 것에는 실패하였다. CD28, OX-40 (CD134), 및 4-1BB (CD137)을 포함하는 공자극(co-stimulatory) 분자들로부터의 신호 도메인들은 CAR 변형된(modified) T 세포들의 증식을 증가시키고 생존을 증강시키기 위하여 단독으로(이(second) 세대) 또는 조합하여(삼(third) 세대) 첨가되었다. CAR들은 림프종들(lymphomas) 및 고형 종양들을 포함하는 다양한 악성 종양들로부터 종양 세포들의 표면에서 발현되는 항원들에 향하여 T 세포들이 전용되는(redirect) 것을 성공적으로 허용하여 왔다(Jena, Dotti et al. 2010).
- [0007] 현재의 CAR 아키텍처들(architectures)은 그 안에 단일 폴리펩타이드 내에 포함되는 모든 관련 도메인들이 있는 디자인을 기반으로 한다. 이 디자인은 신호 도메인들의 순차적인 추가(appending)를 필요하게 만들어, 이런 식으로 그것들의 자연적인 가까운막(juxtamembrane) 위치들(positions)로부터 몇몇 도메인들을 필요로 하게 만든다. 이런 식으로 그 안에서 리간드들 및 신호 도메인들이 분리된 아키텍처들은, 공자극 도메인들의 개선된 작용을 위하여, 원형질(plasma) 막에서 먼 위치의 몇몇 도메인들과 함께 추가되는(appended) 것보다는 그것들의 정상적인 가까운막(juxtamembrane) 위치들에서 다른 체인들 상 위치하도록 허용할 수 있다. IgE (FcεRI)를 위한 높은 친화력(affinity) 수용체인, 자연적인 수용체는 이러한 아키텍처를 제공할 것이다. 호염기성 세포들(basophils) 및 비만(mast) 세포들 상 존재하는 FcεRI는 높은 친화력으로 IgE에 결합한다. FcεRI는 리간드 결합 알파 서브유닛, 베타 서브유닛 및 두 개의 신호-전달(transducing) 감마 서브유닛들의 호모다имер(homodimer)로 구성되는 사합체(tetrameric) 수용체 복합체이다(Metzger, Alcaraz et al. 1986). FcεRI 알파(alpha) 도메인은 IgE에 결합하는 두 개의 Ig-유사 도메인들을 포함하는 세포외(extracellular) 도메인, 막관통(transmembrane) 도메인 및 짧은 세포질 꼬리로 구성된다. 베타 서브유닛은 아미노 및 카르복시 말단 세포질 꼬리들을 분리하는 네 개의 막관통 부분들(segments)을 포함한다. 감마 사슬은 하나의 면역수용체

(immunoreceptor) 티로신(tyrosine)-기반의(based) 활성화(activation) 모티프(motif) (ITAM)를 포함하는 세포질 꼬리 및 막관통 영역을 근본적으로 포함한다(consist)(Cambier 1995). TCR 복합체의 제타(zeta) 사슬은 감마 사슬과 밀접하게 관련되며, Fc ϵ RI의 감마 사슬을 대신할 수 있다(Howard, Rodewald et al. 1990).

[0009]

입양 면역요법을 이용한 환자들의 치료를 위한 현재의 프로토콜은 자가(autologous) 세포 이동(transfer)을 기반으로 한다. 이 접근에서, T 림프구들(lymphocytes)은 환자들로부터 회수되고, 엑스 비보(ex vivo)에서 선택되거나 또는 유전적으로 변형되고, 만약 필요하다면 세포들의 수를 증폭시키기 위하여 인 비트로(in vitro)에서 배양하고 그리고 최종적으로 환자 내로 주입되었다(infuse). 림프구 주입(infusion)에 추가하여, 숙주는 예를 들어 (IL-2과 같은) 림프구 성장인자들의 투여 및 (방사선 또는 화학요법을 갖는) 예비(pre)-컨디셔닝(conditioning)인, 면역 반응에서 그것들의 참가 또는 T 세포들의 이식(engraftment)을 지지하는 다른 방식들로 다루어질 수 있다. 각각의 환자는 환자 자신의 림프구들(즉, 자가 치료)를 이용하여 개별적으로 조작된 치료를 받는다. 자가(autologous) 치료들(therapies)은 응용까지 상당한 기술적 및 로지스틱(logistic) 장애물들을 직면하는데, 그것들의 발생(generation)은 비싼 전용(dedicated) 설비 및 전문 인력을 요구하고, 그것들은 환자의 진단 뒤 빨리 발생되어야 하고, 그리고 많은 경우들에, 환자들의 전치료(pretreatment)가 저하된 면역 작용을 야기하여, 환자의 림프구들이 기능이 나쁘고 매우 낮은 수로 존재할 수 있다. 이들 장애물들 때문에, 각각의 환자의 자가 세포 조제용 물질(preparation)은 효과적으로 새로운 상품이고, 약효 및 안정성에 상당한 변화를 야기한다. 이상적으로, 동종이형(allogeneic) 치료적 세포들이 미리-제조되고(pre-manufactured), 상세하게 특징되고, 그리고 환자들에게 즉시 투여로 이용가능할 수 있는 표준화된 치료를 사용할 것이다. 동종이형(allogeneic)에 의하여, 세포들이 동일한 종들에 속하나 유전적으로 다른 개개인으로부터 수득된다는 것이 의미된다. 그러나 동종이형(allogeneic) 세포들의 사용은 현재 많은 문제점들을 갖는다. 면역(immune)-적격(competent) 숙주들에서, 동종이형(allogeneic) 세포들은 신속히 거부되고, 이식편대숙주거부(host versus graft rejection) (HvG)로 일컬어지는 공정, 그리고 이것은 이동된(transfer) 세포들의 약효를 상당히 제한한다. 면역(immune)-부적격(incompetent) 숙주들에서, 동종이형(allogeneic) 세포들은 이식(engraft)될 수 있으나, 그것들의 내생(endogenous) TCR 특이성들은 숙주 조직을 외래의 것(foreign)으로 인식하여, 이식편대숙주병(graft versus host disease)(GvHD)을 야기하는데, 이는 심각한 조직 손상 및 사망을 이끌 수 있다. 동종이형(allogeneic) 세포들을 효과적으로 이용하기 위하여, 이들 문제들 둘 다 극복되어야 한다.

[0011]

면역적격 숙주들에서, 동종이형(allogeneic) 세포들은 숙주 면역 시스템에 의하여 신속히 거부된다. 방사선 조사되지 않은 혈액 제품들 내 존재하는 동종이형(allogeneic) 백혈구들이 5 내지 6 일 이하로 지속될 것이라고 주장되어 왔다. (Boni, Muranski et al. 2008). 이런 식으로 동종이형(allogeneic) 세포들의 거부를 예방하기 위하여, 숙주의 면역 시스템은 효과적으로 억제되어야 한다. 글루코코르티코이드스테로이드들(glucocorticoidsteroid)은 면역억제(immunosuppression)에 치료적으로 널리 사용된다(Coutinho and Chapman 2011). 스테로이드 호르몬들 중 이 종류는 T 세포들의 시토솔(cytosol) 내 존재하는 글루코코르티코이드(glucocorticoid) 수용체(receptor) (GR)에 결합하여, 핵의 위치 변경 및 면역학적 공정에 관여하는 다수의 유전자들의 발현을 조절하는 특이적 DNA 모티프들(motifs)의 결합을 야기한다. 글루코코르티코이드(glucocorticoid) 스테로이드들로 T 세포들을 처리하는 것은 T 세포 활성화에 간섭하고 그리고 T 세포 무반응(anergy)을 이끄는 사이토카인(cytokine) 생산의 감소된 수준들을 야기한다. CAMPATH1-H로도 알려진 알렘투주맙(Alemtuzumab)은 12 아미노산 글리코실포스파티딜(glycosylphosphatidyl)-이노시톨(inositol)-(GPI) 링크된 당단백질인, CD52를 타겟팅하는 인간화된 단일클론 항체이다(Waldmann and Hale 2005). CD52는 과립구들(granulocytes) 및 골수 전구체들(precursor) 상에 없는 반면, T 및 B 림프구들 상에서 높은 수준으로 그리고 단핵구들(monocytes) 상에서 더 낮은 수준으로 발현된다. CD52를 향하는 인간화된 단일클론 항체인, 알렘투주맙(Alemtuzumab)으로 하는 치료는, 순환하는 림프구들 및 단핵구들(monocytes)의 급속한 소모를 유도하는 것으로 보여져 왔다. 그것은 이식(transplantation)을 위한 컨디셔닝(conditioning) 요법(regimen)의 부분으로서 특정 케이스들에서 그리고 T 세포 림프종들(lymphomas)의 치료에서 자주 사용된다. 그러나, 입양 면역요법의 케이스에서, 면역억제제들의 사용은 또한 도입된(introduced) 치료적 T 세포들에 해로운 영향을 가질 것이다. 그러므로 이들 질환들에서 입양 면역요법 접근을 효과적으로 이용하기 위하여, 도입된 세포들은 면역억제 치료에 저항력이 있을 필요가 있을 것이다.

[0013] 반면, T 세포 수용체들 (TCR)은 항원의 제시에 대하여 대응한 T 세포들의 활성화에 참여하는 세포 표면 수용체들이다. TCR은 두 개의 사슬들, 알파 및 베타로부터 보통 만들어지는데, 이는 헤테로다이머(heterodimer)를 형성하기 위하여 조립되고, 그리고 세포 표면에 있는 T-세포 수용체 복합체를 형성하기 위하여 CD3-형질도입(transducing) 서브유닛들과 연관된다(associate). TCR의 알파 및 베타 사슬 각각은 면역글로불린(immunoglobulin)-유사 N-말단 가변(variable) (V) 및 불변(constant) (C) 영역, 소수성 막관통 도메인 및 짧은 세포질(cytoplasmic) 영역으로 구성된다. 면역글로불린 분자들에 대하여, 알파 및 베타 사슬들의 가변 영역은 V(D)J 재조합(recombination)에 의하여 만들어지는데, 이는 T 세포들의 개체군(population) 내 항원 특이성의 큰 다양성을 만들어낸다. 그러나 온전한(intact) 항원을 인식하는 면역글로불린들과 대조적으로, T 세포들은, MHC 제한(restriction)으로 알려진, T 세포들에 의한 항원 인식에 여분의 규모(dimension)을 도입하는, MHC 분자와 관련된 가공된(processed) 펩타이드 단편들에 의하여 활성화된다. T 세포 수용체를 통한 도너(donor) 및 수용자(recipient) 사이의 MHC 차이들의 인식은 GVHD의 잠재적 발달 및 T 세포 증식을 이끈다. TCR의 정상적인 표면 발현은 복합체의 모든 일곱 개 요소들(components)의 조립 및 조정된(coordinated) 합성에 의존한다는 것이 보여져 왔다(Ashwell and Klusner 1990). TCR알파(alpha) 또는 TCR베타(beta)의 불활성화는 동종항원(alloantigen)의 인식을 예방하는 T 세포들의 표면으로부터 TCR의 제거 및 따라서 GVHD를 야기할 수 있다. 그러나 TCR 분열(disruption)은 CD3 신호전달(signaling) 요소(component)의 제거를 야기하고 그리고 추가의 T 세포 확장(expansion)의 수단(means)을 바꾼다.

[0015] T-세포 매개(mediated) 면역는 면역 반응을 미세조정하는 공자극 및 억제 신호들 사이의 균형에 의하여 조정되는 복수의 순차적 단계들을 포함한다. 면역 체크포인트들(checkpoints)로서 언급되는 억제 신호들은 면역-매개 부수적인(collateral) 조직 손상을 제한하는데 그리고 또한 자기면역관용(self-tolerance)에 결정적이다. 면역 체크포인트들 단백질의 발현은 종양들에 의하여 통제가 없어질(deregulate) 수 있다. 이들 억제 경로들을 끌어들이는(co-opt) 종양들의 능력은 면역 저항(resistance)의 중요한 메커니즘을 나타내고, 그리고 면역 요법의 성공을 제한한다. 치료적 T-세포 면역 반응을 활성화시키는 유망한 접근들 중 하나는 이들 면역 체크포인트들의 차단이다(Pardoll 2012). 면역 체크포인트들은 암에서 기능적 세포 면역의 활성화의 중요한 장벽들을 나타내며, 그리고 프로그램된(programmed) 죽음(death)-1 (PD-1) 및 CTLA4를 포함하는 T 세포들 상 억제 리간드들에 특이적인 길항제(antagonistic) 항체들은 임상에서 평가되는 타겟되는 제제들의 예들이다.

[0017] 세포독성(Cytotoxic)-T-림프구(lymphocyte)-관련(associated) 항원(antigen) 4 (CTLA-4; CD152로도 알려져 있음)은 T 세포 활성화의 진폭(amplitude)을 하향조절하고 그리고 길항제(antagonist) CTLA4 항체들(이필리무맙(ipilimumab))은 흑색종을 가진 환자들에서 생존 이익을 보여 왔다(Robert and Mateus 2011). 프로그램된(Programmed) 세포(cell) 죽음(death) 단백질(protein) 1 (PD1 또는 CD279로도 알려진 PDCD1)은 면역요법의 또 다른 매우 유망한 타겟을 나타낸다(Pardoll and Drake 2012; Pardoll 2012). CTLA-4과 대조적으로, PD1은 자가 면역을 억제하기 위하여 그리고 감염에 대한 염증 반응의 때에 말초(peripheral) 조직에서의 T 세포 이펙터(effector) 기능을 제한한다. PD1 항체로 하는 첫 번째 임상 실험은 종양 퇴보(regression)의 몇몇 케이스들을 보여준다(Brahmer, Drake et al. 2010). 복수의 추가의 면역 체크포인트 단백질들은 최근 연구에 기초한 치료적 차단(blockade)에 대한 유망한 타겟들을 나타낸다.

[0019] 정상적인 T-세포들에서, T 세포 수용체들은 미성숙 흉선세포들(thymocytes)에 의하여 발현되며, 그리고 이중 음성 (CD4- CD8-)부터 이중-양성 (CD4+ CD8+) 단계들까지 T 세포 발달에 결정적인, 프리(pre)-T 세포 수용체들(pTCR)로부터 나온다. TCR베타 자리(locus)의 생산적 재배열에 성공한 프리(pre)-T 세포들은, 프리(pre)-TCR 복합체를 형성하기 위하여 CD3 신호전달 요소들 및 불변(invariant) 프리T알파(preTalpha) 사슬과 짝을 이루는 기능적 TCR베타를 발현한다. 세포 표면에서 프리TCR(preTCR)의 발현은 발달하는 T 세포들의 확대를 유도하고, TCR 베타(TCRbeta) 자리의 대립(allelic) 배제(exclusion)를 강요하고(enforce) 그리고 TCR알파(TCRalpha) 자리에서 재배열의 유도를 야기하는 공적인 베타-선택을 촉발하는데 필요하다 (von Boehmer 2005). 생산적 TCR알파 재배열들 및 성숙 TCR을 형성하기 위한 TCR알파에 의한 pT알파(pTalpha)의 치환 후, 흉선세포들(thymocytes)은, 흉선의 상피 세포들 상에 발현되는 셀프(self) 펩타이드 MHC 복합체들이 결합하면 TCR알파/베타 선택 또는 양성(positive)로 불리는, 선택의 두 번째 단계를 겪는다. 그러므로 성숙 T 세포들은 인식하고 그것들의 TCR을 통하여 항원/MHC 복합체에 대응한다. TCR 활성화(activation)의 가장 즉각적인 결과는 T 세포들의 클론 확대

(expansion), 세포 표면의 활성화(activation) 마커들의 상향조절 및 세포독성 또는 사이토카인 분비의 유도를 포함하는 복수의 일들을 야기하는, 관련된 CD3 서브유닛들을 통한 신호전달 경로들의 시작이다.

- [0021] 흉선 발달 동안 프리T알파(preTalpha)와 짝짓는 것을 통한 TCR베타 사슬들의 선택의 특성 때문에, TCR알파가 불활성화되는 T 세포들에서, pT알파(pTalpha) 이식유전자(transgene)의 이종기원(heterologous) 도입은 프리TCR의 형성을 야기할 수 있다. 이 pTCR은 비-MHC 의존적인 방식으로 자극 또는 T 세포 활성화(activation)의 수단의 역할을 할 수 있고, 이런 식으로, 예를 들어, TCR알파 불활성화에 이은 알파/베타 T-세포들의 지속되는 확장을 허용한다. 중요하게, pTCR 복합체는 관련된 CD3 서브유닛들의 면에서 TCR로서 유사한 생화학적 조성물을 보여준다(Carrasco, Ramiro et al. 2001). 게다가, TCR과 대조적으로, 프리(pre)-TCR 신호전달(signaling)은 어느 정도는 리간드 독립적 이벤트(event)에 의하여 발생할 수 있다. pTCR 세포외(extracellular) 도메인(domain)의 결정 구조는 pTCR 신호전달의 가능한 리간드-독립의 구조적 기초를 제공하였다. pTCR은 두 개의 pT알파-TCR베타 헤테로다이머들(heterodimers)이 연관되는 머리 내지 꼬리 다이머를 형성하는 것으로 나타났다(Pang, Berry et al. 2010).
- [0023] 본 발명에서, 발명자들은 현재 면역 요법 전략들의 한계들을 극복하고, 그것들을 비-동종반응성(alloreactive)이며 매우 활성(active)으로 허용하는, 유전적으로 변형된 T-세포들의 생산을 달성하였다. 비록 면역 체크포인트들의 차단이 항체들을 이용하여 인식되었지만, 억제제를 완수하는 또다른 방법은 이상적으로는 "기성품(off the shelf)" 제품으로서인 조작된 동종이형(allogeneic) T 세포들의 생산을 가능하게 하는 T 세포들 내 면역 체크포인트 유전자들의 발현의 불활성화에 의한다. 이것은 PD1 및 CTLA-4와 같은 면역 체크포인트 단백질을 코딩하는 유전자들의 불활성화와 결부된 TCR베타 또는 TCR알파로 향하는 특이적 TALE-뉴클레아제들(nucleases)을 이용한 유전자 불활성화에 의하여 가능하게 만들어졌다.
- [0025] 특히, 동종이형(allogeneic) 도너(donor)로부터 유래된 T 림프구들 내 면역 체크포인트 유전자들의 불활성화와 결부된 TCR알파 또는 TCR베타의 불활성화는 도입된 림프구들의 활성 및 증식을 가능하게 하는 반면, MHC 차이들의 인식에 책임이 있는 TCR을 제거함으로써 GVHD의 위험을 상당히 감소시킨다. 그러므로 이들 변형된 동종이형(allogeneic) T 세포들은 그것들이 종양 세포들 또는 감염된 세포들을 타겟으로 할 수 있는, 환자의 혈액에서 매우 활성일 것으로 예상된다.
- [0027] 둘 다 비(non) 동종반응성(alloreactive)이며 매우 활성일 수 있는 유전적으로 변형된 T 세포들의 상기 컨셉에 추가하여, 본 발명자들은, 특이적 TALE-뉴클레아제들(nucleases)의 디자인 및 사용에 의하여, T-세포들 내 이들 다른 유전자들을 부수하여 불활성화시켰고, 이로써 이중(double) 돌연변이들을 수득하였다. 사실, DSB 에 의한 이중 유전자 타겟팅은, 시간이 지남에 따라 배양 내 T-세포들을 유지하고 생산하는 것의 어려움, 그것들의 낮은 형질전환(transformation) 비율들, 및 선택 절차들 동안 손실(loss) 때문에, 지금까지 T 세포들에서 달성되지 않았다. 이들 어려움들은 이러한 세포들을 수득하는 것에 대한 성공의 낮은 확률을 야기하였다.
- [0029] 그러므로, 본 발명의 하나의 중요한 부분은 본 발명에 따른 유전자들의 선택을 타겟으로 할 수 있는, (특히 공(co)-형질감염(transfection) 후), 세포들에 의하여 잘 견디지는, T-세포들 내 DSB 이벤트들의 더 높은 비율들을 가능하게 하는 디자인된 특이적 TALE-뉴클레아제들을 갖는 것이다. 여기에 기재된 TALE-뉴클레아제들과 같은, 희귀(rare)-절단(cutting) 엔도뉴클레아제들(endonucleases)을 이용함으로써, 형질감염된(transfected) T-세포들 내 유전자들의 이중 불활성화를 수득할 확률이 상당히 증가되고, 그래서 그것은 지금 표준 절차들을 이용하여, 정기적으로 도너들로부터 이용가능한 조작된 T 세포들을 생산할 수 있을 것으로 보인다.
- [0031] 게다가, 본 발명은 TCR알파가 불활성화될 때, 증식을 가능하게 하도록 T-세포들이 조작되는 예를 제안한다. TCR 서브유닛(subunit) 불활성화를 겪어 온 T-세포들이 갖는 중요한 문제는 세폴프이 더 이상 CD3 복합체를 통하여 확장될 수 없다는 것이다. 이 문제를 극복하기 위하여, 본 발명자들은, 그 안에서 세포들 내 프리T알파(preTalpha)의 발현에 의하여, CD3 복합체를 통하여 TCR알파가 불활성화되고, 이와 같이 기능적 알파/베타 TCR

의 부재 하 기능적 CD3 복합체를 복원하는, T-세포들을 확장하는 수단을 정말로 제공한다.

[0033] 최종적으로, MHC의 독립적 항원들과 관련된 종양들을 특이적으로 향하는 동종이형(allogeneic) 세포들을 전용하기(redirect) 위하여 T 세포들은 CAR로 더 형질전환(transformed)된다. 특히, 본 발명은 공자극 도메인들이 그것들의 기능들을 개선하기 위하여 그것들의 가까운막(juxtamembrane) 위치들에 위치되고, 그리고 그래서 조작된 T-세포들의 증식을 증가시키고 생존을 증강시키는, 다-사슬 CAR에 대한 것이다. 그 결과 본 발명은 입양 면역요법을 위한 동종이형(allogeneic) T 세포들의 효과적인 형질전환(transformation)을 가능하게 하는 폴리뉴클레오타이드들, 폴리펩타이드들 및 방법들 및 그것들의 순위한 확장을 제공한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0035] 본 발명은 비(non)-동종반응성(alloreactive)인 면역요법을 위한 조작된 T-세포들을 발달시키는 방법들에 대한 것이다.

과제의 해결 수단

[0036] 본 발명은 비(non)-동종반응성(alloreactive)인 면역요법을 위한 조작된 T-세포들을 발달시키는 방법들에 대한 것이다. 본 발명은 면역 반응의 잠재성(potential)을 불러일으키기(unleash) 위하여 면역 체크포인트 유전자 및 T-세포 수용체를 코딩하는 유전자들 둘다를 불활성화시킴으로써 T-세포들을 변형시키는 방법들에 대한 것이다. 이 방법은 일차(primary) 세포들의 배양으로부터 또는 도너들로부터 이용가능한, T-세포들에서 주요 유전자들의 선택을 정확히 타겟으로 하기 위하여, 이러한 폴리펩타이드들을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드들 및 특이적 희귀 절단 엔도뉴클레아제들, 특히 TALE-뉴클레아제들 (TAL 이펙터(effector) 엔도뉴클레아제)의 사용을 포함한다.

발명의 효과

[0037] 본 발명은 바이러스 감염 및 암을 치료하기 위한 표준이며 입수가능한 입양 면역요법 전략들로의 길을 연다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도면들 및 표들의 간단한 설명

이전의 특징들에 추가하여, 본 발명은 첨부되는 도면과, 하기 설명으로부터 나올 다른 특징들을 더 포함한다. 본 발명의 더 완전한 평가 및 그것의 수반되는 많은 이익들은 동일한 것이 자세한 설명과 연결된 하기 도면들을 참고로 하여 더 잘 이해될 수 있기 때문에 쉽게 수득될 것이다.

도 1: T-세포들 및 항원 제시 세포 사이의 정상적인 관계의 도식 표시.

도 2: 환자의 종양 세포들 및 본 발명에 따른 유전적으로 변형된 치료적 T-세포들의 도식 표시.

도 3: 다사슬(multi-chain) CAR의 도식 표시.

도 4: 다사슬(multi-chain) CAR들의 다른 버전들의 도식. A. Fc ϵ RI 수용체의 도식. B-C Fc ϵ RI 알파 사슬의 막관통 도메인에 융합된 CD8 스토크 영역 및 scFv 을 포함하는, 다사슬(multi-chain) CAR들 (csm1 내지 csm10)의 다른 버전들. 적어도 하나의 41BB, CD28 및/또는 CD3 제타 도메인들이 Fc ϵ RI 알파, 베타 및/또는 감마 사슬에 융합될 수 있다.

도 5: 면역요법을 위하여 인간 동종이형(allogenic) 세포들을 조작하는 방법의 한 예의 도식 표시.

도 6: 대조군들 또는 보체(complement)로 항-CD52 항체 (CAMPATH1-H)로 처리된 후 살아있는 CD52-양성 또는 CD52-음성 세포들의 밀리리터(milliliter) 당 세포들 내 농도.

도 7: 및 대조군으로서 비활성화된 세포들 및, TCR-양성 및 TCR-음성 세포들 사이, 또는 CD52-양성 및 CD52-음성 세포들 사이의, 세포 크기의 표시,포워드(forward) 사이드(side) 스캐터(scatter) (FSC) 분포(distribution)의 비교

도 8: 타겟된 CD52 및 TCR알파 불활성화된 T 세포들 상 CD107a 발현 (탈과립화의 마커)의 유동세포분석법 분석. CD107 발현은 Daudi 세포들로 배양 전 (A) 및 후 (B)에 CD52+TCR α β + 세포들 (첫 번째 칼럼), CD52-TCR α β - 세포들 (두 번째 칼럼), CD52-TCR α β + 세포들 (세 번째 칼럼) 및 CD52+TCR α β - 세포들 (네 번째 칼럼) 상에서 분석되었다. C)는 CAR로 더 형질감염(transfect)되고 Daudi 세포들로 불활성화된 T 세포들의 유동세포분석법(flow cytometry) 분석을 나타낸다; D)는 CAR로 형질감염(transfect)되었으나, Daudi 세포들로 배양되지 않은 T 세포들의 유동세포분석법(flow cytometry) 분석을 나타내고 그리고, E)는 CAR로 형질감염(transfect)되고 PMA/이오노마이신(ionomycin)으로 처리된 T 세포들의 유동세포분석법(flow cytometry) 분석을 나타낸다(양성 대조군).

도 9: CD52 및 TRAC TALE-뉴클레아제들 잠재적 오프(off)-위치(site) 타겟들의 덤 시퀀싱 분석.

도 10: T7-엔도뉴클레아제 분석에 위한 PDCD1 및 CTLA-4 게놈 위치(locus)의 분석. 화살표는 소화된 PCR 산물을 가리킨다.

도 11: 프리T알파(preTalpha) 구조체들의 몇몇 예들의 도식 표시.

도 12: TCR 알파 불활성화된 주르카트(Jurkat) 세포들에서 FL, Δ 18, Δ 48 pT알파(pTalpha) 구조체들의 활성(% CD3 표면 발현) 및 형질도입(transduction) 효율 (% BFP+ 세포들)의 유동세포분석법 분석

도 13: pT알파(pTalpha) 단백질 (preTCR α 을 코딩하는 렌티바이러스(lentiviral) 구조체(construct)의 도식 표시.

도 14: A: 실험 프로토콜의 표시. B: 정제 전 및 후 대조군 BFP 렌티바이러스(lentiviral) 벡터 (KO/BFP) 또는 BFP-2A-pTalpha Δ 48 (KO/ Δ 48)로 형질도입된(transduced) TCR알파 불활성화된 T 세포들 (KO) 상 TCR 알파/베타, CD3 발현 및 BFP 발현의 유동세포분석법 분석. C. BFP-2A-pTalpha Δ 48 렌티바이러스(lentiviral) 벡터로 형질도입되거나((BFPpos) 또는 되지 않은(BFPneg), 정제된 TCR 알파 불활성화된 세포들 상 TCR 알파/베타 및 CD3 발현의 유동세포 분석. NEP는 TRAC TALE-뉴클레아제들로 전기천공되지 않은 세포들을 나타낸다.

도 15: A-B. 대조군 BFP 벡터 (BFP) 또는 BFP-2A-pT α - Δ 48 렌티바이러스(lentiviral) 벡터 (pT α - Δ 48), BFP-2A-pT α - Δ 48.41BB 렌티바이러스(lentiviral) 벡터 (pT α - Δ 48.BB)로 형질도입된, 전기천공되지 않은 세포들 (NEP) 및 TCR알파 불활성화된 세포들 (KO) 상에 각각 항-CD3/CD28 비드들로 재활성화 24 및 48 시간 후 초기 (early) 활성화(activation) 마커(marker) CD69 (A), 늦은(late) 활성화(activation) 마커(marker) CD25 (B) 발현의 유동세포분석법 분석. pT α - Δ 48 막대그래프들은 pT α - Δ 48 (BFP+ 세포들)를 발현시키는 TCR 불활성화된 세포들에서 검출되는 신호에 대응하는 반면, KO 막대그래프들은 pT α - Δ 48 (BFP- 세포들)를 발현하지 않는 TCR 알파 불활성화된 세포들에 대응되고 pT α - Δ 48.BB 막대그래프들은 pT α - Δ 48.41BB (BFP+ 세포들)를 발현시키는 TCR 불활성화된 세포들에서 검출되는 신호에 대응되고 반면 KO 막대그래프들은 pT α - Δ 48.41BB (BFP- 세포들)를 발현시키지 않는 TCR알파 불활성화된 세포들에 대응된다. NEP (비(non) 전기천공된(electroporated)) 막대그래프들은 조작되지 않은 세포들에서 검출되는 신호에 대응한다. C. 대조군 BFP 벡터 (BFP) 또는 BFP-2A-pT α - Δ 48 렌티바이러스(lentiviral) 벡터 (pT α - Δ 48), BFP-2A-pT α - Δ 48.41BB 렌티바이러스(lentiviral) 벡터 (pT α - Δ 48.BB)로 형질도입(transduced)된 TCR알파 불활성화된 세포들 (KO) 및 전기천공되지 않은(non electroporated) 세포들 (NEP) 상 항-CD3/CD28 비드들로 재활성화 72 시간 후 세포들의 크기의 유동세포분석법 분석. 각각의 그래프의 윗 부분에 표시된 값들은 각각의 개체군(population)의 형광의 기하평균에 대응된다.

도 16: 다른 시점(time point)들에서 (x-축) 항- CD3/CD28 비드들로 IL2에서 또는 IL2에서 유지되는 대조군 BFP 벡터 (BFP) 또는 pTalpha- Δ 48 (pTa Δ 48)로 형질도입된(transduced) TCR 알파 불활성화된 세포들 (KO)의 세포 성장 분석. BFP+ 세포들 수는 각 조건들에 대하여 다른 시점(time point)들에서 추정되었고 이들 세포들의 배수(fold) 유도(induction)는 재활성화 2일 후에 수득된 값에 대하여 추정되었다. 결과들은 두 개의 독립적인 도너들로부터 수득되었다. 두 번째 도너를 위하여, 세포 성장이 또한 전장 pTalpha- (pTa-FL) 및 pTalpha- Δ 48.41BB (pTa- Δ 48.BB)로 형질도입된 세포들에 대하여 결정되었다.

도 17: 다섯 개의 다른 사이토피스(Cytopulse) 프로그램들로 전기천공된 PBMC들 상 GFP 양성 세포들의 유동세포 분석법 분석. 윗선은 큐벳 당 6×10^6 세포들의 형질감염(transfection)에 대응되고, 반면 아래쪽 선은 큐벳 당 3×10^6 세포들의 형질감염(transfection)에 대응된다.

도 18: 대조군 pUC DNA 및 GFP mRNA, GFP DNA 으로 전기천공 후 살아있는 개체군 중 GFP 양성 세포들 및 생존 능력(viability) 염료 (eFluor-450)를 이용하여 정제된 T 세포 사망(mortality)의 유동세포분석법 분석이다.

NEP은 전기천공 버퍼 내 유지되나, 전기천공되지 않은 세포들에 대응되고, NT는 배양 배지 내 유지되는 전기천공되지 않은 세포들에 대응된다.

도 19: TRAC TALE-뉴클레아제 mRNA 전기천공법(electroporation) 후 인간 일차(primary) T 세포들 상 TCR 알파/베타 및 CD3 발현의 유동세포분석법 분석.(위) TRAC TALE-뉴클레아제 mRNA 전기천공법 후 인간 일차(primary) T 세포들로부터 추출된 게놈 DNA의 딥 시퀀싱 분석(아래).

도 20: A. 단일 사슬 CAR를 코드하는 mRNA로 또는 없이, T 세포들의 전기천공 후 CAR 발현 (항F(ab')₂)의 유동세포분석법 분석. B. daudi 세포들과 공배양된 전기천공된 T 세포들 상 CD107a 발현(탈과립화의 마커)의 유동세포분석법 분석.

도 21: A. 다사슬(multi-chain) CAR를 코드하는 mRNA의 표시. B. 다사슬(multi-chain) CAR를 코드하는 포리스트론 mRNA로, 또는 없이, 전기천공된 살아있는(viable) T 세포들 상 CAR 발현 (항 F(ab')₂)의 유동세포분석법 분석. C. daudi 세포들과 공배양된 전기천공된 T 세포들 상 CD107a 발현(탈과립화의 마커)의 유동세포분석법 분석.

도 22: 폴리스트론 mRNA들의 전기천공법 후 인간 T 세포들 내 다(multi)-사슬 CAR들 발현.

도 23: 멀티서브유닛(multi-subunit) CAR들의 발현은 세 개 사슬들: α , β 및 γ 의 발현에 의하여 컨디션(condition)된다.

도 24 : 다사슬(multi-chain) CAR들을 일시적으로 발현시키는 인간 T 세포들은 타겟 세포들과의 공배양 후 탈과립된다(degranulate). A: csm1 내지 csm5 CAR 구조체들. B: csm6 내지 csm10 CAR 구조체들.

도 25: 다사슬(multi-chain) CAR들을 일시적으로 발현시키는 인간 T 세포들은 타겟 세포들과의 공배양 후 사이토카인들을 분비한다(T세포들 vs. Daudi 세포들 또는 K562). A: IL8 방출. B: IFN γ 방출. C: IL5 방출.

도 26: 다사슬(multi-chain) CAR들 (scm1 내지 csm10 구조체들)를 일시적으로 발현시키는 인간 T 세포들은 타겟 세포들을 용해(lyse)한다.

도 27: 형광 항체 및 유동세포분석법(flow cytometry) 분석을 이용한 세포내 염색에 의하여 측정된 일차(primary) T 세포들 내 CTLA4 불활성화.

도 28: TALENs T1, T2 및 T3로 형질감염(transfection)된 CTLA4를 발현시키는 형광 T-세포들의 분포. CTLA4를 발현시키는 세포들의 비율은 대조군 세포들에 대하여 극적으로 감소된다.

도 29: 형광 항체 및 유동세포분석법(flow cytometry) 분석을 이용한 세포내 염색에 의하여 측정된 일차(primary) T 세포들 내 PD1 불활성화. PD1을 발현시키는 세포들의 비율은 대조군 세포들에 대하여 극적으로 감소된다.

도 30: PD1 유전자를 타겟팅하는 TALEN T01 및 T03로 형질감염(transfection)된, T-세포들에서 관찰되는 결실들 빈도들을 보이는 도해.

도 31: 세포독성(cytotoxic) 활성이 실시예 3에 기재된 실험에 따라 PD1을 위하여 붕괴된 T-세포들에서 증강된다는 것을 보여주는 도해.

표 1: 면역요법에 더 활성인 동종이형(allogeneic) T-세포들을 만들기에 적합한 것으로 본 발명자들에 의하여 확인된 면역 체크포인트 유전자들의 리스트.

표 2: 인간 GR 유전자 내 TALE-뉴클레아제들 타겟 위치(sites)들의 서열들 및 GR TALE-뉴클레아제의 기재.

표 3: 효모에서 GR TALE-뉴클레아제들의 절단 활성. 값들은 0 및 1 사이에 포함된다. 최대값은 1이다.

표 4: 293 세포들에서 내생(endogenous) TALE-뉴클레아제 타겟 위치(sites)들에서 타겟된 돌연변이생성(mutagenesis)의 퍼센트.

표 5: 일차(primary) T 림프구들 내 내생(endogenous) TALE-뉴클레아제 타겟 위치(sites)들에서 타겟된 돌연변이생성(mutagenesis)의 퍼센트.

표 6: 인간 대응하는 유전자들에서 TALE-뉴클레아제들 타겟 위치(sites)들의 CD52, TRAC 및 TRBC TALE-뉴클레아제들 및 서열들의 기재.

표 7: TRAC 및 CD52 TALE-뉴클레아제들을 위한 추가의 타겟 서열들.

표 8: CD52_T02, TRAC_T01, TRBC_T01 및 TRBC_T02 타겟들을 타겟팅하는 TALE-뉴클레아제를 위한 삽입-결실들(indels)의 퍼센트.

표 9: 대응하는 TALE-뉴클레아제-발현 폴리뉴클레오타이드들의 형질감염(transfection) 후 CD52- 음성, TCR-음성 및 CD52/TCR-이중 음성 T 림프구들의 퍼센트.

표 10: TRBC TALE-뉴클레아제-발현 폴리뉴클레오타이드들의 형질감염(transfection) 후 TCR-음성 T 림프구들의 퍼센트.

표 11: 인간 대응하는 유전자들 내 TALE-뉴클레아제들 타겟 위치(sites)들의 CTLA4 및 PDCD1 TALE-뉴클레아제들 및 서열들의 기재.

표 12: pT알파(pTalpa) 구조체들의 서브셋(subset)의 기재.

표 13: 주르카트(Jurkat) TCR 알파 불활성화된 세포 내 다른 pT알파(pTalpa) 구조체들의 활성화. 활성화는 다른 프리T알파(preTalpa) 구조체들로 형질감염된 주르카트(jurkat_ TCR 알파 불활성화된 세포 상 CD3 발현의 유동세포분석법(flow cytometry) 분석에 의하여 측정되었다.

표 14: PBMC 유래된 T-세포들에서 전기천공에 요구되는 최소 전압을 결정하는데 사용되는 다른 사이토피스(cytopulse) 프로그램들.

표 15: 정제된 T-세포들을 전기천공하기 위하여 사용되는 사이토피스(Cytopulse) 프로그램.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명의 개요

한 측면에서, 본 발명은 면역요법 목적들에 적합하게 그것들을 만들기 위하여, T 세포들, 특히, 도너들로부터 수득가능한 동종이형(allogeneic) T 세포들을 조작하는 방법들을 공개한다. 더욱 특히, 본 발명의 방법들은 면역 체크포인트 단백질들 및/또는 MHC 인식에 관련된 유전자들을 대체하거나 또는 불활성화시킴으로써 면역요법에 관련 있는 세포들의 게놈(genome)의 정확한 변형을 가능하게 한다. 특정 예들에서, 면역요법과 관련이 있는 변형된 세포들은 특이적 세포 인식을 위한 CAR들을 코드하는 외인성(exogenous) 재조합 폴리뉴클레오타이드들을 추가로 포함한다. 현재의 CAR들은 신호전달 도메인들의 순차적 부가를 필요하게 만드는 신호 융합(fusion) 분자들이다. 신호전달 도메인들을 그것들의 자연적인 가까운막(juxtamembrane) 위치로부터 옮기는 것은 그것들의 기능을 방해할 수 있다. 그러므로 이 문제를 극복하기 위하여, 본 발명자들은 FcεRI로부터 유래된 다-사슬 CAR를 모든 관련 있는 신호전달 도메인들의 정상적인 가까운막(juxtamembrane) 위치를 가능하게 하도록 디자인한다. FcεRI 알파 사슬의 높은 친화력 IgE 결합 도메인은 세포 타겟들에 대한 T-세포 특이성을 전용(redirect)하기 위하여 scFv와 같은 세포의 리간드-결합 도메인에 의하여 대체되고 그리고 FcεRI 베타(beta) 사슬(chain)의 N 및/또는 C-말단 꼬리들은 정상적인 가까운막(juxtamembrane) 위치들에 공자극 신호들을 위치시키는데 사용된다.

또다른 측면에서, TCR알파가 불활성화되는 T 세포들의 활성화(activation) 또는 자극을 촉진하기 위하여, pT알파(pTalpa) 또는 그것의 기능적 변이체(variant)가 조작된 T-세포들 내로 도입된다. pT알파(pTalpa) 또는 사용되는 그것의 기능적 변이체(variant)는 전장(full-length) pT알파(pTalpa), 스플라이스(splice) 변종(Saint-Ruf, Lechner et al. 1998), 프리(pre)TCR 세포 표면 발현을 증가시키는 것으로 보여져 온 C-말단 잘린(truncated) 버전일 수 있다(Carrasco, Ramiro et al. 2001). 기재된 것보다 더 작거나 또는 더 큰 다른 추가적인 잘라버림(truncation)이 사용될 수 있다. 다른 프리T알파(preTalpa) 버전들이 증식을 촉진하기 위하여 다른 분자들(CD28, CD137, CD8, TCR알파(alpha) 등)로부터 신호전달 모이어티들을 추가로 포함하거나 또는 증식 잠재성을 감소시키기 위하여 인간들(Pang, Berry et al. 2010)에서 기재된 W46R 돌연변이 또는 마우스들(Yamasaki, Ishikawa et al. 2006)에서 전에 기재된 D22A, R24A, R102A 또는 R117A 돌연변이들과 같은 이합체화(dimerize)하는 능력에 영향을 미치는 돌연변이들을 포함할 수 있다. CAR의 scFv 부분(portion)은 또한 pT알파(pTalpa) 또는 그것의 기능적 변이체(variant)의 세포의 도메인에 융합(fuse)될 수 있고, 그런 식으로 타겟 항원들에 대한 특이성을 preTCR의 증식 활성화와 직접 연결한다.

- [0044] 또다른 측면에서, 본 발명은, 특히 TCR알파(alpha), TCR베타(beta), 면역 체크포인트 유전자들인, 관심있는 상기 유전자들을 정확하게 타겟으로 하여, 면역요법을 위한 T-세포들의 유전적 변형을 가능하게 하는, 회귀-절단 엔도뉴클레아제들을 코딩하는, 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드들에 대한 것이다. 본 발명은 더욱 특히 이들 유전자들을 각각 타겟하도록 디자인된 TALE-뉴클레아제들 및 이들 유전자들 내 특이적 타겟 서열들을 제공한다.
- [0046] 본 발명은 또한 여기에 기재된 단백질들, 폴리펩타이드들 또는 벡터들 중 임의의 것을 포함하는 분리된 세포들 또는 세포주들에 대한 것이다. 특정 예들에서, 본 발명의 T 세포들은 면역요법에서 그것들의 사용을 위하여 불활성화된 TCR알파(alpha), TCR베타(beta), 면역 체크포인트 유전자들을 포함한다. 본 발명의 분리된 세포들 또는 세포주들은 추가로 외인성(exogenous) 재조합 폴리뉴클레오타이드들, 특히 pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체(variant) CAR들(CARs) 또는 다사슬(multi-chain) CAR들을 포함할 수 있다.
- [0048] 바람직한 예에서, 변형된 T 세포들은 치료적 제품으로서, 이상적으로는 "기성품인(off the shelf)" 제품으로서 사용된다.
- [0050] 또다른 측면에서, 본 발명은 상기 방법들에 의하여 수득가능한 조작된 T-세포를 투여함으로써 환자에서 암 또는 감염들을 예방 또는 치료하는 방법에 대한 것이다.
- [0052] **본 발명의 자세한 설명**
- [0053] 여기에서 특별히 정의하지 않으면, 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 유전자 치료, 생화학, 유전학 및 분자 생물학의 영역에서 당업자에 의하여 보통 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0055] 여기에 기재된 그것들과 유사하거나 또는 등가의 물질들 및 방법들 모두가 여기에 기재된 적절한 물질들 및 방법들과 함께 본 발명을 시험하거나 또는 실시하는데 사용될 수 있다. 여기에 언급된 모든 문헌들, 특허 출원들, 특허들, 및 다른 참조문헌들이 그 전체가 참조로서 포함된다. 상충되는 경우, 정의들을 포함하는 본 명세서에 따른다. 나아가, 물질들, 방법들 및 예들은 설명적일 뿐이며, 다르게 특정하지 않는 한, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0057] 본 발명의 실시는, 다르게 표시되지 않는 한, 당업계의 기술 내인, 세포 생물학, 세포 배양학, 분자 생물학, 유전자식 생물학, 미생물학, 재조합 DNA, 및 면역학의 일반적인 기술들을 이용할 것이다. 이러한 테크닉들은 문헌에 완전히 설명된다. 예를 들어 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); 및 Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)을 참조하라.

- [0059] 일반적인 측면에서 본 발명은 암 및 감염들을 치료하는 새로운 입양 면역요법 전략들을 위한 방법들에 대한 것이다.
- [0061] **면역요법을 위한, 비 동종반응성(alloreactive)이며 고효율성인 T 세포들**
- [0062] 특정 측면에서, 본 발명은 T-세포들의 조작 방법, 특히 면역요법에 대한 것이다.
- [0063] 특정 예에서, 발명은 하기를 포함한다:
- [0064] (a) T 세포를 제공하는 단계,
- [0065] (b) 상기 T 세포 내로 DNA 절단(cleavage)에 의하여 면역 체크포인트 유전자를 선택적으로 불활성화시킬 수 있는 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 도입하는 단계; 및
- [0066] (c) 상기 세포들을 확장시키는(expanding) 단계.
- [0068] 특히, 이 방법은 하기를 포함한다:
- [0069] (a) 적어도 하기를 불활성화시킴으로써 T-세포들을 변형시키는 단계:
- [0070] - 면역 체크포인트 단백질을 코딩하는 첫 번째 유전자, 및
- [0071] - T-세포 수용체 (TCR)의 요소(component)를 코딩하는 두 번째 유전자
- [0072] (b) 상기 세포들을 확장시키는(expanding) 단계.
- [0074] T 세포-매개 면역은 항원 특이적 세포들의 클론적(clonal) 선택, 이차(secondary) 림프(lymphoid) 조직에서 그것들의 활성화 및 증식, 염증 및 항원의 위치들(sites)로의 그것들의 수송(trafficking), 직접적인 이펙터(effector) 기능의 수행 및 많은 이펙터(effector) 면역 세포들을 위한 (사이토카인들 및 멤브레인 리간드들을 통한) 도움의 제시를 포함하는 복수 개의 순차적 단계들을 포함한다. 이들 단계들 각각은 반응을 미세조정하는 자극 및 억제 신호들의 균형을 잡음으로써(counterbalancing) 조절된다. 용어 "면역 체크포인트들(checkpoints)"이 T 세포들에 의하여 발현되는 분자들의 그룹을 의미한다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 이들 분자들은 면역 반응을 억제 또는 하향조절(down-modulate)하기 위하여 "브레이크들(brakes)"로서 효과적으로 작용한다. 면역 체크포인트 분자들은 Programmed Death 1 (PD-1, PDCD1 또는 CD279로도 알려짐, 등록(accession) 번호: NM_005018), Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4, CD152로도 알려짐, GenBank 등록 번호 AF414120.1), LAG3 (CD223로도 알려짐, 등록 번호: NM_002286.5), Tim3 (HAVCR2로도 알려짐, GenBank 등록 번호: JX049979.1), BTLA (CD272로도 알려짐, 등록 번호: NM_181780.3), BY55 (CD160로도 알려짐, GenBank 등록 번호: CR541888.1), TIGIT (VSTM3로도 알려짐, 등록 번호: NM_173799), B7H5 (C10orf54로도 알려짐, 마우스 비스타(vista) 유전자의 상동체(homolog), 등록 번호: NM_022153.1), LAIR1 (CD305로도 알려짐, GenBank 등록 번호: CR542051.1), SIGLEC10 (GeneBank 등록 번호: AY358337.1), 2B4 (CD244로도 알려짐, 등록 번호: NM_001166664.1)로 면역 세포들을 직접 억제하는 것을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, CTLA-4은 특정 CD4 및 CD8 T 세포들 상 발현되는 세포-표면 단백질이다; 항원 제시 세포들 상 그것의 리간드들 (B7-1 및 B7-2)에 의하여 이용될(engaged) 때, T-세포 활성화(activation) 및 이펙터(effector) 기능이 억제된다. 그러므로 본 발명은 면역 체크-포인트, 특히 PD1 및/또는 CTLA-4에 관련된 적어도 하나의 단백질을 불활성화시킴으로써 T-세포들을 유전적으로 변형시키는 단계를 포함하는, T-세포들의 조작 방법, 특히 면역요법에 대한 것이다.
- [0076] 특정 예에서, 본 방법의 유전적 변형 단계는 하나의 유전자, 바람직하게는 PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 두 개의 유전자들의 불활성화에 의존한다. 또다른 예에서, 본 방법의 유전적 변형 단계는 PD1 및 TCR 알파, PD1 및 TCR 베타, CTLA-4 및 TCR 알파, CTLA-4 및 TCR 베타, LAG3 및 TCR 알파, LAG3 및 TCR 베타, Tim3 및 TCR 알파, Tim3

및 TCR 베타, BTLA 및 TCR 알파, BTLA 및 TCR 베타, BY55 및 TCR 알파, BY55 및 TCR 베타, TIGIT 및 TCR 알파, TIGIT 및 TCR 베타, B7H5 및 TCR 알파, B7H5 및 TCR 베타, LAIR1 및 TCR 알파, LAIR1 및 TCR 베타, SIGLEC10 및 TCR 알파, SIGLEC10 및 TCR 베타, 2B4 및 TCR 알파, 2B4 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 두 개의 유전자들의 불활성화에 의존한다. 또다른 예에서, 본 방법의 유전적 변형 단계는 둘보다 많은 유전자들의 불활성화에 의존한다. 그 유전적 변형은 바람직하게는 엑스-비보(ex-vivo)에서 작동한다.

[0078]

하기 표 1은, 철저한(exhaustive) 것 없이, 조작된 T-세포들의 적합함 및 효율을 개선하기 위하여 본 발명의 가르침에 따라 불활성화될 수 있는 면역 체크포인트 유전자들을 보여준다. 면역 체크포인트들 유전자는 바람직하게는, 공-억제 수용체 기능, 세포사, 사이토카인 신호전달, 아르기닌(arginine) 트립토판(tryptophan) 결핍(starvation), TCR 신호전달(signaling), 유도된(Induced) T-reg 억제(repression), 면역성결핍(anergy) 또는 고갈(exhaustion)을 통제하는 전사 인자들, 및 저산소증(hypoxia) 매개 내성(tolerance)과 연관된, 이 표에 리스트된 것들에 동일성(identity)을 갖는 그러한 유전자들로부터 선택된다.

표 1

| 경로 | 경로에서 불활성화될 수 있는 유전자들 | NCBI 데이터베이스 유전자 ID (<i>Homo sapiens</i>) on May 13 th , 2014 |
|----------------------------|----------------------|--|
| 공억제(Co-inhibitory) 수용체들 | LAG3 (CD223) | 3902 |
| | HAVCR2 (TIM3) | 84868 |
| | BTLA (CD272) | 151888 |
| | CD160 (NK1) | 11126 |
| | TIGIT (VSIG9) | 201633 |
| | CD96 (TACTILE) | 10225 |
| | CRTAM (CD355) | 56253 |
| | LAIR1 (CD305) | 3903 |
| | SIGLEC7 (CD328) | 27036 |
| | A2A (IGKV2-29) | 28882 |
| | SIGLEC9 (CD329) | 27180 |
| 세포사 | CD244 (2B4)) | 51744 |
| | TNFRSF10B (CD262) | 8795 |
| | TNFRSF10A (CD261) | 8797 |
| | CASP3 | 836 |
| | CASP6 | 839 |
| | CASP7 | 840 |
| | CASP8 | 841 |
| | CASP10 | 843 |
| | Arhgap5 (GFI2) | 394 |
| | Akap8i | 10270 |
| | FADD (GIG3) | 8772 |
| 사이토카인 신호전달 | FAS (RP11) | 355 |
| | Stk17b (DRAK2) | 9262 |
| | TGFBRII (AAT3) | 7048 |
| | TGFBRI | 7046 |
| | SMAD2 (JV18) | 4087 |
| | SMAD3 | 4088 |
| | SMAD4 | 4089 |
| | SMAD10 (SMAD7) | 394331 |
| | SKI (SGS) | 6497 |
| | SKIL (SNO) | 6498 |
| | TGIF1 (HPE4) | 7050 |
| | IL10RA (CD210) | 3587 |
| | IL10RB | 3588 |
| | HMOX2 (HO-2) | 3163 |
| | Jun (AP1) | 3725 |

[0080]

| | | |
|-----------------------------|-----------------|--------|
| | Ppp3cc | 5533 |
| | Ppm1g | 5496 |
| | Socs1 | 8651 |
| | Soc3 | 9021 |
| | IL6R (CD126) | 3570 |
| | IL6ST (CD130) | 3572 |
| | Lck | 3932 |
| | Fyn | 2534 |
| | ADAP (FYB) | 2533 |
| | Carma1 (CARD11) | 84433 |
| | Bcl10 | 8915 |
| | Malt1 (IMD12) | 10892 |
| | TAK1 (NR2C2) | 7182 |
| 아르기닌/트립토판 결핍 | EIF2AK4 (GCN2) | 440275 |
| | Nuak2 | 81788 |
| TCR 신호전달 | CSK | 1445 |
| | PAG1 (CBP) | 55824 |
| | SIT1 | 27240 |
| | CRTAM (CD355) | 56253 |
| | Egr2 (AT591) | 1959 |
| | DGK-a (DAGK) | 1606 |
| | DGK-z | 8525 |
| | Cblb | 868 |
| | Inpp5b | 3633 |
| | Ptpn2 (PTN2) | 5771 |
| | Vamp7 | 6845 |
| | Mast2 | 23139 |
| | tnk1 | 8711 |
| | stk17b (DRAK2) | 9262 |
| 유도된 Treg | Mdfic (HIC) | 29969 |
| | F11r (CD321) | 50848 |
| | FOXP3 (JM2) | 50943 |
| | Entpd1 (CD39) | 953 |
| 고갈/면역성결핍을 통제하는 전사 인자들 | PRDM1 (blimp1) | 12142 |
| | BATF | 10538 |
| | Ypel2 | 388403 |
| | Ppp2r2d | 55844 |
| | Rock1 | 6093 |
| | Sbf1 | 6305 |
| | Hipk1 (MYAK) | 204851 |
| | Map3k3 | 4215 |
| | Grk6 | 2870 |
| | Eif2ak3 (PEK) | 9451 |
| | Fyn | 2534 |
| | NFAT1 (NFATC2) | 4773 |

| | | |
|------------|---------|------|
| 저산소증 매개 내성 | GUCY1A2 | 2977 |
| | GUCY1A3 | 2982 |
| | GUCY1B2 | 2974 |
| | GUCY1B3 | 2983 |

표 1: 면역요법에 더욱 활성화된 동종이형(allogeneic) T-세포들을 만드는데 적합한 면역 체크포인트 유전자들

유전자를 불활성화시키므로써, 관심있는 유전자가 기능적 단백질 형태로 발현되지 않도록 의도된다. 특정 예에서, 본 방법의 유전적 변형은 조작할 제공된 세포들에서, 하나의 회귀-절단 엔도뉴클레아제의 발현에 의존하며, 그리하여 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 특이적으로 하나의 타겟된 유전자 내에서 절단(cleavage)을 촉매화하고, 이로써 상기 타겟된 유전자를 불활성화시킨다. 회귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 야기되는 핵산 가닥 손상(breaks)들은 상동(homologous) 재조합(recombination) 또는 비상동(non-homologous) 말단(end) 연결(joining) (NHEJ)의 구별되는 메커니즘들을 통하여 보통 수선된다. 그러나 NHEJ는 절단(cleavage)의 위치(site)에서 DNA 서열에 변화들을 종종 야기하는 불완전한 수선 공정이다. 메커니즘들은 직접적인 재-연결

(ligation)을 통한(Critchlow and Jackson 1998), 또는 소위 미세상동성(microhomology)-매개(mediated) 말단(end) 연결(joining) (Ma, Kim et al. 2003)을 통한, 두 개의 DNA 말단들(ends)의 남아있는 것의 재연결(rejoining)을 수반한다. 비상동성(non-homologous) 말단(end) 연결(joining) (NHEJ)을 통한 수선은 가끔 작은 삽입들 또는 결실들을 야기하고, 그리고 특이적 유전자 녹아웃들(knockouts)의 창조에 이용될 수 있다. 상기 변형은 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 치환, 결실 또는 첨가(addition)일 수 있다. 절단-유도된 돌연변이유발(mutagenesis) 이벤트, 즉, NHEJ 이벤트에 연이은 돌연변이유발(mutagenesis) 이벤트가 발생한 세포들은 당업계에 잘 알려진 방법에 의하여 선택되고 그리고/또는 확인될 수 있다.

- [0088] 특정 예에서, 세포들을 조작하는(engineer) 상기 방법은 하기 단계들 중 적어도 하나를 포함한다:
- [0089] (a) 바람직하게는 세포 배양으로부터 또는 혈액 샘플로부터, T-세포를 제공하는 단계;
- [0090] (b) DNA 절단(cleavage), 바람직하게는 이중-가닥 손상(break)에 의하여 각각 하기를 선택적으로 불활성화시킬 수 있는 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 상기 T-세포 내로 도입하는 단계;
- [0091] - 면역 체크포인트 단백질을 코딩하는 상기 유전자, 및
- [0092] - T-세포 수용체 (TCR)의 요소(component)를 코딩하는 적어도 하나의 유전자.
- [0093] (c) 상기 세포들을 확장하는(expanding) 단계.
- [0095] 더욱 바람직한 예에서, 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0096] (a) 바람직하게는 세포 배양으로부터 또는 혈액 샘플로부터, T-세포를 제공하는 단계;
- [0097] (b) DNA 절단(cleavage), 바람직하게는 이중-가닥 손상(break)에 의하여 각각 하기를 선택적으로 불활성화시킬 수 있는 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산으로 상기 T 세포를 형질전환(transform)시키는 단계;
- [0098] - 면역 체크포인트 단백질을 코딩하는 상기 유전자 및
- [0099] - T-세포 수용체 (TCR)의 요소(component)를 코딩하는 적어도 하나의 유전자
- [0100] (c) 상기 T-세포들 내로 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제들을 발현시키는 단계;
- [0101] (d) 그것들의 세포 표면 상에 TCR을 발현시키지 않는, 형질전환된(transformed) T-세포들을 분류하는 단계;
- [0102] (e) 상기 세포들을 확장(expanding)시키는 단계.
- [0104] 특정 예에서, 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 특이적으로 하기로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 유전자를 타겟으로 한다: PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4, TCR 알파 및 TCR 베타. 또다른 예에서, 본 방법의 유전적 변형은 조작할 제공된 세포들에서, 두 개의 회귀-절단 엔도뉴클레아제들의 발현에 의존하여, 두 개의 회귀-절단 엔도뉴클레아제들의 상기 각각이 특이적으로 그리고 각각 PD1 및 TCR 알파, PD1 및 TCR 베타, CTLA-4 및 TCR 알파, CTLA-4 및 TCR 베타, LAG3 및 TCR 알파, LAG3 및 TCR 베타, Tim3 및 TCR 알파, Tim3 및 TCR 베타, BTLA 및 TCR 알파, BTLA 및 TCR 베타, BY55 및 TCR 알파, BY55 및 TCR 베타, TIGIT 및 TCR 알파, TIGIT 및 TCR 베타, B7H5 및 TCR 알파, B7H5 및 TCR 베타, LAIR1 및 TCR 알파, LAIR1 및 TCR 베타, SIGLEC10 및 TCR 알파, SIGLEC10 및 TCR 베타, 2B4 및 TCR 알파, 2B4 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 유전자들의 쌍들의 각각에서 절단(cleavage)을 촉매화하고, 이로써 상기 타겟된 유전자들을 불활성화시킨다. 또다른 예에서, 둘 보다 많은 회귀-절단 엔도뉴클레아제들이 둘 보다 많은 유전자들을 불활성화시키고 그리고/또는 타겟으로 하도록 조작(engineer)하기 위하여 세포들에서 발현될 수 있다.
- [0106] 또다른 예에서, 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 메가뉴클레아제(meganuclease), 징크(Zinc) 핑거(finger) 뉴클레아제(nuclease) 또는 TALE-뉴클레아제(nuclease)일 수 있다. 바람직한 예에서, 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 TALE-뉴클레아제이다. TALE-뉴클레아제에 의하여 전사(Transcription) 액티베이터(Activator) 유사(Like) 이펙터(Effector) (TALE)로부터 유래된 DNA-결합 도메인 및 핵산 타겟 서열을 절단하기 위한 하나의 뉴

클레아제 촉매(catalytic) 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).

[0108] 본 발명에서 새로운 TALE-뉴클레아제들은 입양 번역요법 전략들을 위하여 관련된 유전자들을 정확하게 타겟팅하기 위하여 디자인되었다. 본 발명에 따라 선호되는 TALE-뉴클레아제들은 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 표적 서열을 인식하고 절단하는 것들이다: 서열번호(SEQ ID NO): 77 및 서열번호: 78 (PD1), 서열번호: 74 내지 서열번호: 76 (CTLA-4), 서열번호: 37, 57 내지 60 (TCR알파(alpha)), 서열번호: 38 또는 39 (TCR베타(beta)). 본 발명은 또한 서열번호: 79 내지 서열번호: 88 및 서열번호: 41 내지 46로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 TALE-뉴클레아제 폴리펩타이드들에 대한 것이다.

[0110] 본 발명은 또한 서열번호: 79 내지 서열번호: 88로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90 %, 95 % 97 % 또는 99 % 서열 동일성(identity)를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드들에 대한 것이다. 본 발명의 범위에는 또한, 본 발명에 따른 상기 기재된 회귀-절단 엔도뉴클레아제들을 코드하는 폴리뉴클레오타이드들, 벡터들이 포함된다. 이 방법은 본 공개에 기재된 다른 방법들 중 임의의 하나와 연관될 수 있다.

[0112] 또다른 예에서, 추가의 촉매 도메인이 타겟인 유전자들을 불활성화시키는 그것들의 능력을 증강시키기 위하여 돌연변이생성(mutagenesis)을 증강시키기 위하여 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제로 세포 내 추가로 도입될 수 있다. 특히, 상기 추가의 촉매 도메인은 DNA 말단(end) 가공(processing) 효소이다. DNA 말단-가공 효소들의 제한되지 않는 예들은 5'-3' 엑소뉴클레아제들(exonucleases), 3'-5' 엑소뉴클레아제들(exonucleases), 5'-3' 알칼라인 엑소뉴클레아제들(exonucleases), 5' 플랩(flap) 엔도뉴클레아제들, 헬리카제들(helicases), 호스파타제(hosphatase), 하이드롤라제들(hydrolases) 및 주형-독립적 DNA 폴리메라제들(polymerases)을 포함한다. 이러한 촉매 도메인의 제한되지 않는 예들은 hExoI (EX01_HUMAN), 효모(Yeast) ExoI (EX01_YEAST), 대장균(E.coli) ExoI, 인간 TREX2, 마우스 TREX1, 인간 TREX1, 소(Bovine) TREX1, 래트(Rat) TREX1, TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) 인간 DNA2, 효모 DNA2 (DNA2_YEAST)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 단백질 도메인 또는 단백질 도메인의 촉매적으로 활성인 파생물(derivate)을 포함한다. 바람직한 예에서, 상기 추가의 촉매 도메인은 3'-5'-엑소뉴클레아제(exonuclease) 활성을 갖고, 더욱 바람직한 예에서 상기 추가의 촉매 도메인은 TREX이고, 더욱 바람직하게는 TREX2 촉매(catalytic) 도메인 (WO2012/058458)이다. 또다른 바람직한 예에서, 상기 촉매 도메인은 단일 사슬 TREX 폴리펩타이드에 의하여 코드된다 (WO2013/009525). 상기 추가의 촉매 도메인은 펩타이드 링커(linker)에 의하여 선택적으로 본 발명에 따른 뉴클레아제 융합(fusion) 단백질 또는 키메라(chimeric) 단백질에 융합될 수 있다.

[0114] 엔도뉴클레올리틱(endonucleolytic) 손상들(breaks)은 상동 재조합의 비율을 자극하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 또다른 예에서, 본 방법의 유전적 변형 단계는 타겟 핵산 서열의 부분에 상동인(homologous) 서열을 적어도 포함하여, 상동 재조합이 핵산 서열 및 외인성(exogenous) 핵산 사이에서 발생하는, 외인성(exogenous) 핵산을 세포들 내로 도입하는 단계를 더 포함한다. 특정 예들에서, 상기 외인성(exogenous) 핵산은 각각 타겟 핵산 서열의 5' 및 3' 영역에 상동인 첫 번째 및 두 번째 부분들을 포함한다. 이들 예들에서 상기 외인성(exogenous) 핵산은 또한 타겟 핵산 서열의 5' 및 3' 영역들과 상동성(homology)이 없는, 첫 번째 및 두 번째 부분 사이에 위치하는 세 번째 부분을 포함한다. 타겟 핵산 서열의 절단(cleavage) 후, 상동 재조합 이벤트(event)가 타겟 핵산 서열 및 외인성(exogenous) 핵산 사이에서 자극된다. 바람직하게는 적어도 50 bp, 바람직하게는 100 bp보다 많은, 그리고 더욱 바람직하게는 200 bp 보다 많은 상동 서열들이 상기 도너(donor) 매트릭스(matrix) 내에 사용된다. 그러므로, 외인성(exogenous) 핵산은 바람직하게는 200 bp 부터 6000 bp까지, 더욱 바람직하게는 1000 bp 부터 2000 bp 까지이다. 정말, 공유된(shared) 핵산 상동성들(homologies)은 손상

(break)의 위치의 다운스트림(downstream) 및 업스트림(upstream)의 측면의 영역들에 위치되고, 도입될 핵산 서열은 두 암들(arms) 사이에 위치되어야 한다.

- [0116] 특히, 상기 외인성(exogenous) 핵산은 상기 절단(cleavage)의 업스트림 서열들에 상동성(homology)의 첫 번째 영역, 면역 체크포인트 유전자들, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 표적된 유전자를 불활성화시키기 위한 서열 및 절단(cleavage)의 다운스트림 서열들에 상동성(homology)의 두 번째 영역을 연속적으로 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드 도입 단계는 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제의 발현 또는 도입과 동시, 전, 또는 후일 수 있다. 손상(break) 이벤트가 발생하는 타겟 핵산 서열의 위치에 의존하여, 이러한 외인성(exogenous) 핵산은 예컨대, 외인성(exogenous) 핵산이 상기 유전자의 오픈(open) 리딩(reading) 프레임(frame) 내 위치될 때, 유전자를 녹아웃(knock-out)시키는데, 또는 관심있는 유전자들 또는 신규 서열들을 도입하는데 사용될 수 있다. 이러한 외인성(exogenous) 핵산을 이용한 서열 삽입들은 상기 유전자의 대체(replacement) 또는 수정(correction)(제한되지 않는 예로서 대립형질(allele) 교체(swap))에 의하여 타겟인 기존 유전자를 변형하는데, 또는, 상기 타겟인 유전자 수정(correction) 또는 대체(replacement), 타겟인 유전자의 발현을 상향- 또는 하향-조절하는데(제한되지 않는 예로서 프로모터 교체(swap)) 사용될 수 있다. 바람직한 예에서, 면역 체크포인트 유전자들, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터의 유전자들의 불활성화는 특이적 TALE-뉴클레아제에 의하여 타겟되는 정확한 게놈 위치에서 될 수 있고, 이 때, 상기 특이적 TALE-뉴클레아제는 절단(cleavage)을 촉매화하고 그리고 이 때 상기 외인성(exogenous) 핵산은 적어도 상동성(homology)의 한 영역 및 상동 재조합에 의하여 통합되는, 면역 체크포인트 유전자들, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 타겟된 유전자를 불활성화시키기 위한 서열을 연속적으로 포함한다. 또다른 예에서, 몇몇의 유전자들은, 연속적으로 또는 동시에, 각각 몇몇의 TALE-뉴클레아제들에 의하여 불활성화되고, 특이적 유전자 불활성화를 위하여 몇몇 특이적 폴리뉴클레오타이드들 및 하나의 정의된 유전자를 특이적으로 타겟팅할 수 있다.
- [0118] 추가적인 게놈 변형 단계에 의하여, 면역 체크포인트 유전자들, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 또다른 유전자의 불활성화가 또한 의도될 수 있다. 전술한 바와 같이, 상기 추가의 게놈 변형 단계는 하기를 포함하는 불활성화 단계일 수 있다:
- [0119] (a) 상기 세포들 내로 적어도 하나의 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 도입하여, 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제가 상기 세포의 게놈의 하나의 타겟된 서열 내 절단(cleavage)을 특이적으로 촉매화하는 단계.
- [0120] (b) 상기 세포들 내로 상기 절단(cleavage)의 업스트림 서열들에 대한 상동성(homology)의 첫 번째 영역, 상기 세포의 게놈 내 삽입되는 서열 및 상기 절단(cleavage)의 다운스트림 서열들에 대한 상동성(homology)의 두 번째 영역을 연속적으로 포함하는 외인성(exogenous) 핵산을 선택적으로 도입하는 단계,
- [0121] 이 때, 상기 도입되는 외인성(exogenous) 핵산은 유전자를 불활성화시키고 그리고 관심있는 적어도 하나의 재조합 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 외인성(exogenous) 폴리뉴클레오타이드 서열을 통합(integrates)한다. 또 다른 예에서, 상기 외인성(exogenous) 폴리뉴클레오타이드 서열은 면역 체크포인트 유전자들, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 유전자 내에 통합된다.
- [0123] 특정 예에서, 세포를 조작하는 상기 방법은 추가의 게놈 변형 단계를 더 포함한다. 추가의 게놈 변형 단계에 의하여, 관심있는 하나의 단백질을 조작하기 위하여 세포들 내로 도입이 의도될 수 있다. 상기 관심있는 단백질은, 제한되지 않는 예로서, 본 공개에 기재된 바와 같이, pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체(variant), 키메라(Chimeric) 항원(Antigen) 수용체(Receptor) (CAR), 다사슬(multi-chain) CAR, 이중특이성(bispecific) 항체일 수 있다. 세포를 조작하는 상기 방법은 또한 본 공개에서 기재된 바와 같이 상기 면역억제제를 위한 타겟을 코딩하는 유전자를 DNA 절단(cleavage)에 의하여 선택적으로 불활성화시킬 수 있는 회귀-절단 엔도뉴클레아제의 도입을 더 포함할 수 있다.
- [0125] 본 발명은 또한 TALE-뉴클레아제들에 대한 것이다. 일반적으로, 본 발명은 하기를 포함하는 TALE-뉴클레아제에 대한 것이다:

- [0126] (a) 면역 체크포인트 유전자들, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 유전자들 내 타겟 서열에 결합하기 위하여 조작된 전사(Transcription) 액티베이터(Activator)-유사(Like) 이펙터(Effector) (TALE) DNA 결합 도메인;
- [0127] (b) 절단(cleavage) 도메인 또는 절단(cleavage) 반(half)-도메인.
- [0129] 본 발명에 따른 선호되는 TALE-뉴클레아제들은 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 타겟 서열을 인식하고 절단하는 것들이다:
- [0130] - 서열번호: 77 및 서열번호: 78 (PD1)
- [0131] - 서열번호: 74 내지 서열번호: 76 (CTLA-4),
- [0132] - 서열번호: 37, 57 내지 60 (TCR알파(alpha)), 및
- [0133] - 서열번호: 38 또는 39 (TCR베타(beta)),
- [0135] 상기 TALE-뉴클레아제들은 각각의 타겟 서열번호: 74 내지 78 를 절단하기 위하여 서열번호: 79 내지 서열번호: 88 및 바람직하게는 각각의 타겟 서열들 서열번호: 37 내지 39를 절단하기 위하여, 서열번호: 41 내지 서열번호: 46 로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.
- [0137] 몇몇 가변성(variability)은 이들 폴리펩타이드들이 유래하는 게놈 데이터들로부터 일어날 수 있기 때문에, 그리고 또한 활성의 중요한 손실 없이 이들 폴리펩타이드들 내 존재하는 아미노산들의 일부를 치환하는 것을 고려하기 위하여(기능적 변이체들), 본 발명은 이 특허 출원에서 제공되는 서열들과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80 %, 더욱 바람직하게는 적어도 90 % 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 95 % 동일성(identity)을 공유하는 상기 폴리펩타이드들의 폴리펩타이드들 변이체들(variants)을 포함한다.
- [0139] 본 발명은 그러므로 서열번호: 79 내지 서열번호: 88 및 서열번호: 41 내지 서열번호: 46 으로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90 %, 95 % 97 % 또는 99 % 서열 동일성(identity)을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 폴리펩타이드들에 대한 것이다.
- [0141] 본 발명에 따른 전술한 회귀-절단 엔도뉴클레아제들을 코딩하는 벡터들, 폴리뉴클레오타이드들 또한 본 발명의 범위 내 포함된다.
- [0143] 본 발명의 범위에는 상기 세포들을 조작하는 방법에 따라 수득되기 쉬운 분리된 세포들 또는 세포주들, 특히, 면역 체크포인트 유전자들, 바람직하게는 하기 군으로부터 선택되는 유전자들이 불활성화된, T 세포들이 또한 포함된다: PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4, TCR 알파 및 TCR 베타. 바람직하게는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 두 개의 유전자들이 불활성화되었다: PD1 및 TCR 알파, PD1 및 TCR 베타, CTLA-4 및 TCR 알파, CTLA-4 및 TCR 베타, LAG3 및 TCR 알파, LAG3 및 TCR 베타, Tim3 및 TCR 알파, Tim3 및 TCR 베타, BTLA 및 TCR 알파, BTLA 및 TCR 베타, BY55 및 TCR 알파, BY55 및 TCR 베타, TIGIT 및 TCR 알파, TIGIT 및 TCR 베타, B7H5 및 TCR 알파, B7H5 및 TCR 베타, LAIR1 및 TCR 알파, LAIR1 및 TCR 베타, SIGLEC10 및 TCR 알파, SIGLEC10 및 TCR 베타, 2B4 및 TCR 알파, 2B4 및 TCR 베타.
- [0145] 본 발명에 따라, 이들 유전자들은 바람직하게는 적어도 하나의 회귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 불활성화된다. 본 발명자들에 의하여 TALE-뉴클레아제들의 사용이 T-세포들 내 이중 불활성화를 달성하는데 특히 유리하다는 것이 보여졌다. 본 발명은 적어도 두 개의 폴리뉴클레오타이드들을 포함하는 분리된 T-세포를 포함하는데, 상기 폴리뉴클레오타이드들은 적어도 첫 번째 및 두 번째 TALE-뉴클레아제들을 코딩하고, 바람직하게는 첫 번째 TALE-뉴클레아제는 TCR을 코딩하는 유전자에 직접 향하고 그리고 두 번째는 PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA,

BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4 와 같은, 면역 체크포인트 단백질을 코딩하는 유전자에 직접 향한다. 또다른 예에서, 상기 분리된 세포는 하나의 추가적인 계층 변형을 더 포함한다. 또다른 예에서, 상기 추가적인 계층 변형은 적어도 하나의 외인성(exogenous) 폴리뉴클레오타이드 서열의 통합(integration)이다. 또 다른 예에서, 상기 외인성(exogenous) 서열은 PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 유전자 내로 통합된다.

[0147] 비 동종반응성(alloreactive)이고 면역억제 저항성인 T 세포들:

[0148] 특정 측면에서, 본 발명은 T-세포들을 조작하는 방법, 특히 면역요법에 대한 것이다. 특히 이 방법은 하기를 포함한다:

[0149] (a) 적어도 하기를 불활성화시킴으로써 T-세포들을 변형(modifying)하는 단계:

[0150] - 면역억제제를 위하여 타겟을 발현하는 첫 번째 유전자, 및

[0151] - T-세포 수용체 (TCR)의 요소를 코딩하는 두 번째 유전자

[0152] (b) 선택적으로 상기 면역억제제의 존재 하, 상기 세포들을 확장시키는(expand) 단계.

[0154] 면역억제제는 활동(action)의 몇몇 메커니즘들 중 하나에 의하여 면역 기능을 억제하는 제제이다. 다른 말로, 면역억제제는 면역 반응의 집착(voracity) 및/또는 규모를 줄이는 능력에 의하여 보여지는 화합물에 의하여 하는 역할이다. 제한되지 않는 예로서, 면역억제제는 칼시뉴린(calcineurin) 억제제, 라파마이신(rapamycin), 인터루킨(interleukin)-2 α-사슬(chain) 차단제(blocker), 이노신(inosine) 모노포스페이트(monophosphate) 디하이드로게나제(dehydrogenase)의 억제제, 디하이드로엽산(dihydrofolic acid) 리덕타제(reductase)의 억제제, 코르티코스테로이드(corticosteroid) 또는 면역억제(immunosuppressive) 항대사물질(antimetabolite)일 수 있다. 고전적인 세포독성 면역억제제는 DNA 합성의 억제에 의하여 작용한다. 다른 것들은 헬퍼(helper) 세포들의 활성화를 억제함으로써 또는 T-세포들의 활성화를 통하여 작용할 수 있다. 본 발명에 따른 방법은 T 세포들 내 면역억제제의 타겟을 불활성화시킴으로써 면역요법을 위한 T 세포들에 대하여 면역억제(immunosuppressive) 저항성(resistance)을 부여하는 것을 가능하게 한다. 제한되지 않는 예로서, 면역억제제에 대한 타겟들은 하기와 같은 면역억제제에 대한 수용체일 수 있다: CD52, 글루코코르티코이드(glucocorticoid) 수용체 (GR), FKBP 패밀리(family) 유전자 멤버(member) 및 사이클로필린(cyclophilin) 패밀리 유전자 멤버.

[0156] 특정 예에서, 본 방법의 유전적 변형 단계는 CD52, GR, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 유전자의 불활성화에 의존한다. 또다른 예에서, 본 방법의 유전적 변형 단계는 CD52 및 GR, CD52 및 TCR 알파, CDR52 및 TCR 베타, GR 및 TCR 알파, GR 및 TCR 베타, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 두 유전자들의 불활성화에 의존한다. 또다른 예에서, 본 방법의 유전적 변형 단계는 둘보다 많은 유전자들의 불활성화에 의존한다. 유전적 변형은 바람직하게는 엑스-비보(ex-vivo)로 작동된다.

[0158] 유전자를 불활성화시킴으로써, 관심있는 유전자가 기능적 단백질 형태로 발현되지 않는 것이 의도된다. 특정 예에서, 본 방법의 유전적 변형은 조작하도록 제공된 세포들에서, 하나의 회귀-절단 엔도뉴클레아제의 발현에 의존하여, 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제가 하나의 타겟된 유전자에서 절단(cleavage)을 특이적으로 촉매화하고 이로써 상기 타겟된 유전자를 불활성화시킨다. 특정 예에서, 상기 세포들을 조작하는 방법은 하기 단계들 중 적어도 하나를 포함한다:

[0159] (a) 바람직하게는 세포 배양물(culture)로부터 또는 혈액 샘플로부터 T-세포를 제공하는 단계;

[0160] (b) 면역 억제제를 위한 타겟을 발현시키는 상기 T-세포 내 유전자를 선택하는 단계;

[0161] (c) DNA 절단(cleavage)에 의하여, 바람직하게는 이중-가닥 손상(break)에 의하여 선택적으로 불활성화시킬 수 있는 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 각각 상기 T-세포에 도입하는 단계:

[0162] - 상기 면역억제제를 위한 타겟을 코딩하는 상기 유전자, 및

- [0163] - T-세포 수용체 (TCR)의 요소를 코드하는 적어도 하나의 유전자.
- [0164] (d) 선택적으로 상기 면역억제제의 존재 하 상기 세포들을 확장시키는(expanding) 단계.
- [0166] 더욱 바람직한 예에서, 상기 방법은 하기를 포함한다:
- [0167] (a) 바람직하게는 세포 배양물(culture)로부터 또는 혈액 샘플로부터 T-세포를 제공하는 단계;
- [0168] (b) 면역억제제에 대한 타겟을 발현시키는 상기 T-세포에서 유전자를 선택하는 단계;
- [0169] (c) DNA 절단(cleavage)에 의하여, 바람직하게는 이중-가닥 손상(break)에 의하여 하기를 각각 선택적으로 불활성화시킬 수 있는 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 코드하는 핵산으로 상기 T 세포를 형질전환(transforming)시키는 단계;
- [0170] - 상기 면역억제제에 대한 타겟을 코드하는 상기 유전자, 및
- [0171] - T-세포 수용체 (TCR)의 요소를 코드하는 적어도 하나의 유전자;
- [0172] (d) 상기 T-세포들 내로 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제들을 발현시키는 단계;
- [0173] (e) 그것들의 세포 표면 상에 TCR을 발현시키지 않는, 형질전환된 T-세포들을 분류하는 단계;
- [0174] (f) 선택적으로 상기 면역억제제의 존재 하, 상기 세포들을 확장시키는 단계.
- [0176] 특정 예에서, 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 CD52, GR, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 유전자를 특이적으로 타겟으로 한다. 또다른 예에서, 본 방법의 유전적 변형은 가공하기 위하여 제공된 세포들에서, 두 회귀-절단 엔도뉴클레아제들의 발현에 의존하여, 두 회귀-절단 엔도뉴클레아제들의 상기 각각은 특이적으로 그리고 각각 CD52 및 GR, CD52 및 TCR 알파, CDR52 및 TCR 베타, GR 및 TCR 알파, GR 및 TCR 베타, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자들의 쌍의 각각에서 절단(cleavage)을 촉매화하여, 이로써 상기 타겟된 유전자들을 불활성화시킨다. 또다른 예에서, 둘보다 많은 회귀-절단 엔도뉴클레아제들은 둘보다 많은 유전자들을 불활성화시키고 그리고/또는 타겟으로 하기 위하여 조작하기 위하여 세포들에서 발현될 수 있다.
- [0178] 또다른 예에서, 면역억제 처리에 특이적인, 단계 (b)의 상기 유전자는 CD52이고, 그리고 단계 (d) 또는 (e)의 면역억제 처리는 CD52 항원을 타겟으로 하는 인간화된(humanized) 항체를 포함한다.
- [0180] 또다른 예에서, 면역억제 처리에 특이적인 단계 (b)의 상기 유전자는 글루코코르티코이드(glucocorticoid) 수용체 (GR)이고 그리고 단계 d) 또는 (e)의 면역억제 처리는 덱사메타손(dexamethasone)과 같은 코르티코스테로이드(corticosteroid)를 포함한다.
- [0182] 또다른 예에서, 면역억제 처리에 특이적인 단계(step) (b)의 상기 target 유전자는 FKBP 패밀리의 유전자 멤버 또는 그것의 변이체이고, 그리고 단계(step) (d) 또는 (e)의 면역억제 처리는 타크롤리무스(Tacrolimus) 또는 후지마이신(fujimycin)으로도 알려진 FK506 를 포함한다. 또다른 예에서, 상기 FKBP 패밀리 유전자 멤버는 FKBP12 또는 그 변이체이다.
- [0184] 또다른 예에서, 면역억제 처리에 특이적인 단계 (b)의 상기 유전자는 사이클로필린(cyclophilin) 패밀리 유전자 멤버 또는 그 변이체이고 그리고 단계 (d) 또는 (e)의 면역억제 처리는 사이클로스포린(cyclosporine)을 포함한다.
- [0186] 또다른 예에서, 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 메가뉴클레아제(meganuclease), 징크 핑거 뉴클레아제 또는

TALE-뉴클레아제일 수 있다. 바람직한 예에서, 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 TALE-뉴클레아제이다. 본 발명에 따른 바람직한 TALE-뉴클레아제들은 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 타겟 서열을 인식하고 절단하는 그것이다:

- [0187] - 서열번호: 1 내지 6 (GR),
- [0188] - 서열번호: 37, 57 내지 60 (TCR알파(alpha)),
- [0189] - 서열번호: 38 또는 39 (TCR베타(beta)), 및
- [0190] - 서열번호: 40, 61 내지 65 (CD52)

[0192] 상기 TALE-뉴클레아제들은 바람직하게는 각각의 타겟 서열들 서열번호: 1 내지 6 및 서열번호: 37 내지 40 을 절단하기 위하여, 서열번호: 7 내지 서열번호: 18 및 서열번호: 41 내지 서열번호: 48 로부터 선택되는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0194] 또다른 예에서, 추가의 촉매 도메인은 타겟된 유전자들을 불활성화시키는 그것들의 능력을 증강시키기 위하여 돌연변이생성(mutagenesis)을 증가시키기 위하여 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제로 세포 내에 더 도입될 수 있다. 특히, 상기 추가의 촉매 도메인은 DNA 말단 가공 효소이다. DNA 말단-가공 효소들의 제한되지 않는 예들은 5-3' 엑소뉴클레아제들(exonucleases), 3-5' 엑소뉴클레아제들(exonucleases), 5-3' 알칼라인(alkaline) 엑소뉴클레아제들(exonucleases), 5' 플랩(flap) 엔도뉴클레아제들, 헬리카제들(helicases), 호스파타제(hosphatase), 하이드롤라제들(hydrolases) 및 주형(template)-독립적 DNA 폴리메라제들(polymerases)를 포함한다. 이러한 촉매 도메인의 제한되지 않는 예들은 hExoI (EX01_HUMAN), 효모(Yeast) ExoI (EX01_YEAST), 대장균(E.coli) ExoI, 인간 TREX2, 마우스 TREX1, 인간 TREX1, 소(Bovine) TREX1, 래트(Rat) TREX1, TdT (터미널 terminal) 디옥시뉴클레오티딜(deoxynucleotidyl) 트랜스페라제(transferase)) 인간 DNA2, 효모 DNA2 (DNA2_YEAST)로 구성되는 군으로부터 선택되는 단백질 도메인의 촉매적으로 활성인 파생물 또는 단백질 도메인을 포함한다. 바람직한 예에서, 상기 추가의 촉매 도메인은 3'-5'-엑소뉴클레아제(exonuclease) 활성을 가지며, 그리고 더욱 바람직한 예에서, 상기 추가의 촉매 도메인은 TREX이고, 더욱 바람직하게는 TREX2 촉매 도메인이다 (W02012/058458). 또다른 바람직한 예에서, 상기 촉매(catalytic) 도메인은 단일 사슬 TREX 폴리펩타이드에 의하여 코드된다. 상기 추가의 촉매 도메인은 펩타이드 링커에 의하여 선택적으로 본 발명에 따른 키메라 단백질 또는 뉴클레아제 융합 단백질에 융합될 수 있다.

[0196] 엔도뉴클레오라이틱(Endonucleolytic) 손상들(breaks)은 상동 재조합의 비율을 자극하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 또다른 예에서, 본 방법의 유전적 변형 단계는 타겟 핵산 서열의 부분에 적어도 상동성인 서열을 포함하는 외인성(exogenous) 핵산을 세포들 내로 도입하는 단계를 더 포함한다. 특정 예들에서, 상기 외인성(exogenous) 핵산은 각각 타겟 핵산 서열의 영역 5' 및 3' 에 상동인 첫 번째 및 두 번째 부분들을 포함한다. 이들 예들의 상기 외인성(exogenous) 핵산은 또한 타겟 핵산 서열의 영역들 5' 및 3' 에 상동성(homology)을 갖지 않는 첫 번째 및 두 번째 부분 사이에 위치하는 세 번째 부분을 포함한다. 타겟 핵산 서열의 절단(cleavage) 후, 상동 재조합 이벤트는 타겟 핵산 서열 및 외인성(exogenous) 핵산 사이에서 자극된다. 바람직하게는 적어도 50 bp, 바람직하게는 100 bp보다 많은, 그리고 더욱 바람직하게는 200 bp 보다 많은 상동 서열들이 상기 도너(donor) 매트릭스 내에 사용된다. 그러므로 외인성(exogenous) 핵산은 바람직하게는 200 bp 부터 6000 bp 까지, 더욱 바람직하게는 1000 bp 부터 2000 bp 까지이다. 정말, 공유된 핵산 상동성들(homologies)은 손상(break) 위치의 업스트림 및 다운스트림의 측면의(f flank) 영역들에 위치하고, 그리고 도입될 핵산 서열은 두 암들(arms) 사이에 위치하여야 한다.

[0198] 특히, 상기 외인성(exogenous) 핵산은 상기 절단(cleavage)의 업스트림 서열들에 대한 상동성(homology)의 첫 번째 영역, CD52, GR, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 타겟된 유전자를 불활성화시키기 위한 서열, 및 절단(cleavage)의 다운스트림 서열에 상동성(homology)의 두 번째 영역을 연속적으로 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드 도입 단계는 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제의 발현 또는 도입과 동시, 전 또는 후에 될 수 있다. 이때, 손상(break) 이벤트가 발생하는 타겟 핵산 서열의 위치에 의존하여, 그러한 외인성

(exogenous) 핵산은, 예컨대, 외인성(exogenous) 핵산이 상기 유전자의 오픈 리딩 프레임 내 위치할 때, 유전자를 녹아웃(knock-out)시키는데 또는 관심있는 유전자들 또는 신규 서열들을 도입하는데 사용될 수 있다. 이러한 외인성(exogenous) 핵산을 이용함으로써 서열 삽입들은, 상기 유전자의 수정(correction) 또는 대체(replacement)(제한되지 않는 예로서 대립형질 교체(swap))에 의하여, 타겟된 기존 유전자를 변형시키는데, 또는, 상기 타겟된 유전자 수정(correction) 또는 대체(replacement), 타겟된 유전자의 발현을 상향- 또는 하향-조절하는데(제한되지 않는 예로서 프로모터 교체) 사용될 수 있다. 바람직한 예에서, CD52, GR, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터의 유전자들의 불활성화는 특이적 TALE-뉴클레아제에 의하여 타겟된 정확한 게놈 위치에서 이루어질 수 있고, 이 때, 상기 특이적 TALE-뉴클레아제는 절단(cleavage)을 촉매화하고, 그리고 이때, 상기 외인성(exogenous) 핵산은 연속적으로 적어도 상동성(homology)의 영역을 포함하고 그리고 상동 재조합에 의하여 통합되는 CD52, GR, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 타겟된 유전자를 불활성화시키기 위한 서열이다. 또다른 예에서, 몇몇의 유전자들은 연속적으로 또는 동시에, 특이적 유전자 불활성화를 위한 몇몇의 특이적 폴리뉴클레오타이드 및 하나의 정의된 유전자를 특이적으로 각각 타겟팅하는 몇몇의 TALE-뉴클레아제들을 이용하여 불활성화될 수 있다.

- [0200] 추가의 게놈 변형 단계에 의하여, CD52, GR, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 또다른 유전자의 불활성화가 또한 의도될 수 있다. 전술한 바와 같이, 상기 추가의 게놈 변형 단계는 하기를 포함하는 불활성화 단계일 수 있다:
- [0201] (a) 적어도 하나의 희귀-절단 엔도뉴클레아제를 상기 세포들 내로 도입하여, 상기 희귀-절단 엔도뉴클레아제가 상기 세포의 게놈의 하나의 타겟된 서열에 특이적으로 절단(cleavage)을 촉매화하는 단계.
- [0202] (b) 상기 세포들 내로 상기 절단(cleavage)의 업스트림 서열들에 상동성(homology)의 첫 번째 영역, 상기 세포의 게놈 내 삽입될 서열 및 상기 절단(cleavage)의 다운스트림 서열들에 상동성(homology)의 두 번째 영역을 연속적으로 포함하는 외인성(exogenous) 핵산을 선택적으로 도입하는 단계,
- [0203] 이 때, 상기 도입된 외인성(exogenous) 핵산은 유전자를 불활성화시키고, 그리고 관심있는 적어도 하나의 재조합 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 외인성(exogenous) 폴리뉴클레오타이드 서열을 통합시킨다. 또다른 예에서, 상기 외인성(exogenous) 폴리뉴클레오타이드 서열은 CD52, GR, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 유전자 내 통합된다.
- [0205] 특정 예에서, 세포를 조작하는 상기 방법은 추가의 게놈 변형 단계들을 더 포함한다. 추가의 게놈 변형 단계에 의하여 관심있는 하나의 단백질을 조작하기 위하여 세포들 내로 도입이 의도되었다. 상기 관심있는 단백질은, 제한되지 않는 예들로서, pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체(variant), 키메라(Chimeric) 항원(Antigen) 수용체(Receptor) (CAR), 다사슬(multi-chain) CAR, 이중특이성 항체 또는 PDCD1를 타겟으로 하는 희귀-절단 엔도뉴클레아제 또는 본 공개 내 기재된 CTLA-4 일 수 있다.
- [0207] 본 발명은 또한 TALE-뉴클레아제들에 대한 것이다. 일반적으로, 본 발명은 하기를 포함하는 TALE-뉴클레아제에 대한 것이다:
- [0208] (a) CD52, GR, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 유전자들 내 타겟 서열에 결합하기 위하여 조작된 전사(Transcription) 액티베이터(Activator)-유사(Like) 이펙터(Effector) (TALE) DNA 결합 도메인;
- [0209] (b) 절단(cleavage) 도메인 또는 절단(cleavage) 반(half)-도메인.
- [0210] 본 발명에 따른 선호되는 TALE-뉴클레아제들은 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 타겟 서열을 인식하고 절단하는 그것들이다:
- [0211] - 서열번호: 1 내지 6 (GR),
- [0212] - 서열번호: 37, 57 내지 60 (TCR알파(alpha)),
- [0213] - 서열번호: 38 또는 39 (TCR베타(beta)), 및

- [0214] - 서열번호: 40, 61 내지 65 (CD52)
- [0216] 상기 TALE-뉴클레아제들은 각각의 타겟 서열들 서열번호: 1 내지 6 및 서열번호: 37 내지 40 을 절단하기 위하여, 서열번호: 7 내지 서열번호: 18 까지 그리고 서열번호: 41 내지 서열번호: 48 로부터 선택되는 폴리펩타이드 서열을 바람직하게는 포함한다.
- [0218] 몇몇 변동성(variability)은 이들 폴리펩타이드들이 과생되는 게놈 데이터로부터 일어나기 때문에, 그리고 또한 활성의 중요한 손실 없이 이들 폴리펩타이드들 내 존재하는 아미노산들의 일부를 치환(substitute)하는 능력을 고려할 때(기능적 변이체들), 본 발명은 이 특허 출원에서 제공되는 서열들과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80 %, 더욱 바람직하게는 적어도 90 % 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 95 % 동일성(identity)를 공유하는 상기 폴리펩타이드들의 폴리펩타이드들 변이체들(variants)을 포함한다.
- [0220] 그러므로 본 발명은 서열번호: 7 내지 서열번호: 18 및 서열번호: 41 내지 서열번호: 48로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90 %, 95 % 97 % 또는 99 % 서열 동일성(identity)을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 폴리펩타이드들에 대한 것이다.
- [0222] 본 발명의 범위 내에, 본 발명에 따른 전술한 회귀-절단 엔도뉴클레아제들을 코딩하는 벡터들, 폴리뉴클레오타이드들이 포함된다.
- [0224] 본 발명의 범위 내에, CD52, GR, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자가 불활성화되는, 세포들, 특히 T 세포들을 조작하기 위하여 상기 방법에 의하여 수득될 수 있는 분리된 세포들 또는 세포주들이 또한 포함된다. 바람직하게는, CD52 및 GR, CD52 및 TCR 알파, CDR52 및 TCR 베타, GR 및 TCR 알파, GR 및 TCR 베타, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 두 유전자들이 불활성화되었다.
- [0226] 본 발명에 따라, 이들 유전자들은 바람직하게는 적어도 하나의 회귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 불활성화된다. 본 발명자들에 의하여 TALE-뉴클레아제들의 사용이 T-세포들에서 이중 불활성화를 달성하는데 특히 유리하다는 것이 보여졌다. 본 발명은 바람직하게는 TCR을 코딩하는 유전자에 대하여(against) 향하는 첫 번째 TALE-뉴클레아제 및 CD52 또는 GR과 같은, 면역억제제를 위한, 수용체를 코딩하는 유전자에 대하여 향하는 두 번째인, 적어도 첫 번째 그리고 두 번째 TALE-뉴클레아제들을 코딩하는 상기 폴리뉴클레오타이드들, 적어도 두 폴리뉴클레오타이드들을 포함하는 분리된 T-세포를 포함한다.
- [0228] 또다른 예에서, 상기 분리된 세포는 하나의 추가의 게놈 변형을 더 포함한다. 또다른 예에서, 상기 추가의 게놈 변형은 적어도 하나의 외인성(exogenous) 폴리뉴클레오타이드 서열의 통합이다. 또다른 예에서, 상기 외인성(exogenous) 서열은 CD52, GR, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 유전자 내로 통합된다.
- [0230] **프리T알파(preTalpha)**
- [0231] 또다른 측면에서, 본 발명은 상기 T-세포 pT알파(pTalpha) (preTCR α으로도 명명됨) 내로 도입하는 단계를 포함하는 TCR 알파 결핍된(deficient) T-세포 또는 그것의 기능적 변이체(variant)을 확장시키는(expanding) 그리고 선택적으로 CD3 복합체의 자극을 통한, 상기 세포들을 확장시키는, 방법에 대한 것이다. 바람직한 예에서, 본 방법은 하기를 포함한다:
- [0232] a) CD3 표면 발현을 지지하기 위하여 적어도 pT알파(pTalpha)의 단편을 코딩하는 핵산으로 상기 세포들을 형질 전환(transform)시키는 단계

- [0233] b) 상기 세포들 내로 상기 pT알파(pTalpha)를 발현시키는 단계
- [0234] c) 선택적으로 CD3 복합체의 자극을 통하여, 상기 세포들을 확장시키는(expanding) 단계.
- [0236] 본 발명은 또한 T-세포에 대한 확장 방법의 단계들을 포함하는 면역요법을 위한 T-세포들을 준비하는(preparing) 방법에 대한 것이다.
- [0238] 특정 예에서, pT알파(pTalpha) 폴리뉴클레오타이드 서열은 무작위로 또는 달리 상동 재조합을 통하여 도입될 수 있고, 특히, 삽입은 TCR알파 유전자의 불활성화와 관련될 수 있다.
- [0240] 본 발명에 따라, pT알파(pTalpha)의 다른 기능적 변이체들이 사용된다. 펩타이드의 "기능적 변이체"는 전체 펩타이드 또는 그 단편과 상당히 유사한 분자를 나타낸다. 본 발명의 pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체(variant)의 "단편"은, 분자의 임의의 서브셋(subset, 즉, 더 짧은 펩타이드를 나타낸다. 선회되는 pT알파(pTalpha) 또는 기능적 변이체들(variants)은 전장(full length) pT알파(pTalpha) 또는 C-말단 잘린(truncated) pT알파(pTalpha) 버전일 수 있다. C-말단 잘린(truncated) pT알파(pTalpha)는 C-말단 말단(end)된 하나 또는 더 많은 잔기들이 부족하다. 제한되지 않는 예들로서, C-말단 잘린(truncated) pT알파(pTalpha) 버전은 단백질의 C-말단으로부터 18, 48, 62, 78, 92, 110 또는 114 잔기들이 부족하다 (서열번호: 107 내지 서열번호: 114). 게다가, 펩타이드의 아미노산 서열 변이체들(variants)은 펩타이드를 코딩하는 DNA 내 돌연변이들에 의하여 제조(prepare)될 수 있다. 이러한 기능적 변이체들은, 예를 들어, 아미노산 서열 내 잔기들로부터의 결실들, 또는 잔기들의 삽입들 또는 치환들을 포함한다. 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합은 또한, 최종 구조체가 원하는 활성, 특히 기능적 CD3 복합체의 회복(restoration),을 가지면, 최종 구조체에서 도달하기 위하여 만들어질 수 있다. 바람직한 예에서, 적어도 하나의 돌연변이가 이합체화에 영향을 미치기 위하여 전술한 대로 다른 pT알파(pTalpha) 변이체들에 도입된다. 제한되지 않는 예로서, 돌연변이가 된 잔기들은 적어도 인간 pT알파(pTalpha) 단백질의 W46R, D22A, K24A, R102A 또는 R117A 또는 pT알파(pTalpha) 패밀리 또는 상동 멤버 상에 CLUSTALW를 이용한 정렬된(aligned) 위치들일 수 있다. 바람직하게는 pT알파(pTalpha) 또는 전술한대로 그것의 변이체는 돌연변이된 잔기 W46R (서열번호:123) 또는 돌연변이된 잔기들 D22A, K24A, R102A 및 R117A (서열번호: 124)을 포함한다. 특정 예에서, 상기 pT알파(pTalpha) 또는 변이체들(variants)은 또한 제한되지 않는 예들로서, CD28, OX40, ICOS, CD27, CD137 (4-1BB) 및 CD8 과 같은 단일-형질도입하는(transducing) 도메인에 융합된다 (서열번호: 115 내지 서열번호: 120). 전술한 바와 같이 pT알파(pTalpha) 또는 변이체들의 세포외 도메인은 TCR알파 단백질의 단편, 특히 TCR알파의 막관통 및 세포내(intracellular) 도메인에 융합될 수 있다 (서열번호: 122). pT알파(pTalpha) 변이체들은 또한 TCR알파의 세포내 도메인에 융합될 수 있다(서열번호:121).
- [0242] 또다른 예에서, 상기 pT알파(pTalpha) 버전들(versions)들은 세포의 리간드-결합 도메인에 융합되고 그리고 더욱 바람직하게는 pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체는 플렉시블 링커에 의하여 연결(join)된 타겟 항원 특이적 단일클론 항체의 가벼운(light) (VL) 그리고 무거운(heavy) (VH) 가변(variable) 단편을 포함하는 단일(single) 사슬(chian) 항체(antibody) 단편(fragment) (scFV)에 융합된다. 제한되지 않는 예로서, pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체의 아미노산 서열은 서열번호: 107 내지 서열번호: 124 로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0244] 몇몇 가변성은 이들 폴리펩타이드들이 유래하는 게놈 데이터로부터 생기기 때문에, 그리고 또한 활성의 중요한 손실 없이 이들 폴리펩타이드들 내 존재하는 아미노산들의 일부를 치환하는 능력을 고려할 때(기능적 변이체들), 본 발명은 이 특히 출원에서 제공되는 서열들과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80 %, 더욱 바람직하게는 적어도 90 % 그리고 훨씬 더 바람직하게는 적어도 95 % 동일성(identity)을 공유하는 상기 폴리펩타이드들의 폴리펩타이드들 변이체들을 포함한다.

- [0246] 그러므로 본 발명은 서열번호:107 내지 서열번호: 124 로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90 %, 95 % 97 % 또는 99 % 서열 동일성(identity)을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 폴리펩타이드들에 대한 것이다.
- [0248] TCR 알파 결핍된(deficient) T 세포에 의하여 기능적 TCR 알파 사슬의 발현이 부족한 분리된 T 세포가 의도된다. 이것은, 제한되지 않는 예들로서, T 세포를 조작함으로써, 그것이 그것의 세포 표면 상에 임의의 기능적 TCR 알파를 발현하지 않게 또는 T 세포를 조작함으로써 그것이 그것의 표면 상 극히 조금 기능적인 TCR 알파 사슬을 생산하게 또는 TCR 알파 사슬의 돌연변이된 또는 잘린(truncated) 형태를 발현시키기 위하여 T 세포를 조작함으로써, 다른 수단들에 의하여 달성될 수 있다.
- [0250] TCR 알파 결핍된(deficient) 세포들은 CD3 복합체(complex)를 통하여 더 이상 확장될 수 없다. 이런 식으로, 이 문제를 극복하기 위하여, 그리고 TCR 알파 결핍된(deficient) 세포들의 증식을 허용하기 위하여, pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체가 상기 세포들 내로 도입되고, 이와 같이 기능적 CD3 복합체를 회복하게 한다. 선호되는 예에서, 본 발명은 T-세포 수용체 (TCR)의 하나의 요소(component)를 코딩하는 하나의 유전자의 DNA 절단(cleavage)에 의하여 선택적으로 불활성화시킬 수 있는 회귀-절단 엔도뉴클레아제들을 상기 T 세포들 내로 도입하는 단계를 포함한다. 특정 예에서, 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 TALE-뉴클레아제들이다. 제한되지 않는 예들로서, TALE-뉴클레아제는 서열번호: 37 및 서열번호: 57 내지 60 로 구성되는 군으로부터 선택되는 TCR알파의 유전자 타겟 서열들의 하나에 대하여 향해진다. 바람직하게는, TALE-뉴클레아제들은 서열번호: 41 및 서열번호: 42 로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0252] 특정 예에서, TCR 알파 결핍된(deficient) T-세포들의 확장을 위한 상기 방법은 추가의 계층 변형 단계를 포함한다. 추가의 계층 변형 단계에 의하여 관심있는 하나의 단백질의 조작을 위하여 세포들 내로 도입이 의도될 수 있다. 상기 관심 있는 단백질은, 제한되지 않는 예들로서, 키메라(Chimeric) 항원(Antigen) 수용체(Receptor) (CAR), 특히 아미노산 서열 서열번호: 73 을 포함하는 CAR, 다사슬(multi-chain) CAR, 특히 아미노산 서열 서열번호: 125를 포함하는 다사슬(multi-chain) CAR , 이중특이성 항체, CTLA-4 또는 PDCD1를 타겟으로 하는, 특히 핵산 서열 서열번호: 74 내지 서열번호: 78을 타겟으로 하는, 회귀-절단 엔도뉴클레아제들, 또는 본 공개에서 기재된 대로 면역억제제를 위한 타겟을 타겟으로 하는 회귀-절단 엔도뉴클레아제일 수 있다.
- [0254] 본 발명에는 또한 pT알파(pTalpha), 특히 전술한 기능적 변이체들을 코딩하는 폴리펩타이드들이 포함된다. 선호되는 예에서, 본 발명은 CD28, OX40, ICOS, CD137 및 CD8 과 같은 신호 전달(transducing) 도메인에 융합된 pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체에 대한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 서열번호: 107 내지 서열번호: 124로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 pT알파(pTalpha) 기능적 변이체(variant)에 대한 것이다. 본 발명에는 또한 pT알파(pTalpha) 또는 전술한 그것의 기능적 변이체들을 코딩하는 벡터들, 폴리뉴클레오타이드들이 포함된다.
- [0256] 본 발명의 범위에는 또한 상기 방법에 의하여 수득될 수 있는 분리된 세포들 또는 세포주들이 포함된다. 특히, 상기 분리된 세포들 또는 세포주들은 CD3 표면 발현을 지지하기 위하여 pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체를 상기 세포들 내로 도입함으로써 수득될 수 있다. 선호되는 예에서, 상기 분리된 세포 또는 세포주는 TCR 알파 유전자를 불활성화시킴으로써 유전적으로 더 변형된다. 이 유전자는 바람직하게는 적어도 하나의 회귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 불활성화되고 있다. 선호되는 예에서, 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 TALE-뉴클레아제이다.
- [0258] 다(multi)-사슬 키메라(Chimeric) 항원(Antigen) 수용체(Receptor) (CAR)
- [0259] 또다른 예에서, 본 발명은, 특히 본 발명의 조작된(engineered) T-세포들의 확장 및 생산에 맞춰진(adapted), 다사슬(multi-chain) 키메라 항원 수용체 (CAR)에 대한 것이다.

- [0260] 하기 요소들 중 적어도 둘을 포함하는 다사슬(multi-chain) CAR :
- [0261] a) $Fc\epsilon RI$ 알파 사슬 및 세포외 리간드-결합 도메인의 막관통(transmembrane) 도메인을 포함하는 하나의 폴리펩타이드,
- [0262] b) $Fc\epsilon RI$ 베타 사슬의 막관통 도메인 및 N- 및 C- 말단 세포질 꼬리(tail)의 쌍을 포함하는 하나의 폴리펩타이드 및/또는
- [0263] c) $Fc\epsilon RI$ 감마(gamma) 사슬의 막관통 도메인 및 세포질내(intracytoplasmic) 꼬리(tail)의 각각의 부분을 포함하는 두 개의 폴리펩타이드들로, 이로써 다른 폴리펩타이드들이 이합체, 삼합체 또는 사합체(tetrameric) CAR를 형성하기 위하여 자발적으로 서로 다합체화한다.
- [0265] 사합체(tetrameric) CAR의 한 예는 도 3에 보여져 있다. 다사슬(multichain) CAR들의 다른 버전들은 도 4에 나타나 있다. 다사슬(multi-chain) CAR의 한 예는 아미노산 서열 서열번호: 125 을 포함한다. 여기에서 사용된 용어 "의 부분"은 더 짧은 펩타이드인 분자의 임의의 서브셋(subset)을 나타낸다. 대체하여, 폴리펩타이드의 아미노산 서열 기능적 변이체들(variants)은 폴리펩타이드를 코드하는 DNA 내 돌연변이들에 의하여 제조(prepare)될 수 있다. 이러한 기능적 변이체들은 예컨대, 아미노산 서열 내 잔기들로부터의 결실들, 또는 잔기들의 삽입들 또는 치환들을 포함한다. 최종 구조체가, 특히 특이적 항-타겟 세포 면역 활성을 보이는, 원하는 활성을 갖는다면, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합 또한 최종 구조체에 도달하기 위하여 만들어질 수 있다.
- [0267] 바람직한 예에서, 상기 세포외 리간드-결합 도메인은 scFv이다. scFv 외 다른 결합 도메인 또한 제한되지 않는 예들로서 항체 결합 도메인들, 항체 초가변(hypervariable) 루프들(loops) 또는 CDR들, 인테그린(integrin)-결합 펩타이드, 헤레굴린(heregulin), IL-13 뮤테인(mutein) 또는 혈관 내피 성장 인자 폴리펩타이드와 같은 수용체 리간드들, 또는 낙타과(camelid) 단일-도메인 항체 단편들과 같은, 림프구들의 미리 정해진 타겟팅에 사용될 수 있다.
- [0269] 선호되는 예에서 a) 의 상기 폴리펩타이드는 상기 세포외 리간드-결합 도메인 및 상기 막관통 도메인 사이의 스토크(stalk) 영역을 더 포함한다. 여기에서 사용된 용어 "스토크(stalk) 영역"은 세포외 리간드-결합 도메인에 막관통 도메인을 연결(link)하는 기능을 하는 임의의 올리고- 또는 폴리펩타이드를 보통 의미한다. 특히, 스토크 영역은 세포외 리간드-결합 도메인에 대한 더 많은 유연성(flexibility) 및 접근가능성을 제공하는데 사용된다. 스토크 영역은 300 아미노산들까지, 바람직하게는 10 내지 100 아미노산들 그리고 가장 바람직하게는 25 내지 50 아미노산들을 포함할 수 있다. 스토크 영역은 항체 불변(constant) 영역(region)의 부분 또는 전체로부터 또는 CD8, CD4 또는 CD28의 세포외 영역의 부분 또는 전체로부터와 같은, 자연적으로 발생하는 분자들의 부분 또는 전체로부터 유래될 수 있다. 대체하여 스토크 영역은 자연적으로 발생하는 스토크 영역에 부합하는(correspond) 합성 서열일 수 있고, 또는 완전히 합성 스토크 서열일 수 있다. 바람직한 예에서, a), b) 및/또는 c) 의 상기 폴리펩타이드는 적어도 하나의 신호-전달(transducing) 도메인을 더 포함한다. 가장 선호되는 예에서, 상기 신호-전달(transducing) 도메인은 CD28, OX40, ICOS, CD137 및 CD8 로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0271] 바람직한 예에서, $Fc\epsilon RI$ 알파, 베타 및/또는 감마 사슬 단편의 상기 C-말단 세포질 꼬리는 TNFR-관련(associated) 인자(Factor) 2 (TRAF2) 결합 모티프들(motifs)을 더 포함한다. 가장 선호되는 예에서, $Fc\epsilon RI$ 알파, 베타 및/또는 감마 사슬의 C-말단 세포질 꼬리는 공자극(costimulatory) TNFR 멤버 패밀리의 세포질내 꼬리에 의하여 대체된다. 공자극(costimulatory) TNFR 패밀리 멤버의 세포질(cytoplasmic) 꼬리는 주된 보존(conserved) 모티프(motif) (P/S/A)X(Q/E)E 또는 마이너한(minor) 모티프(motif) (PXQXXD)로 구성되며, 이때 X는 임의의 아미노산인, TRAF2 결합 모티프들(motifs)을 포함한다. TRAF 단백질들은 수용체 삼합체화(trimerization)에 대한 대응하여 많은 TNFR들의 세포내 꼬리들에 구성된다.
- [0273] 또다른 바람직한 예에서 $Fc\epsilon RI$ 알파, 베타 및/또는 감마 사슬의 상기 세포질내 도메인은 TCR 제타(zeta) 사슬

의 세포질내 도메인(CD3 제타(zeta)로도 명명됨)에 의하여 대체된다. 또다른 바람직한 예에서 FcεRI 알파, 베타 및/또는 감마 사슬의 상기 세포질내 도메인을 적어도 하나의 추가적인 면역수용체(immunoreceptor) 티로신(tyrosine)-기반의(based) 활성화(activation) 모티프(motif) (ITAM)를 포함한다. ITAM들은 syk/zap70 클래스(class) 티로신 키나제들을 위한 결합 부위들로서 작용하는 여러가지 수용체들의 세포질내 꼬리에서 발견되는 잘 정의된 신호 모티프들이다. 본 발명에서 사용되는 ITAM의 예들은 TCR제타(zeta), FCR감마(gamma), FCR베타(beta), CD3감마(gamma), CD3델타(delta), CD3엡실론(epsilon), CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로부터 유래되는 그것들을 포함한다.

[0275] 제한되지 않는 예로서, 다사슬(multi-chain) CAR의 다른 버전들은 도 4에 나타나 있다.

[0277] 바람직한 예에서 다사슬(multi-chain) CAR는 아미노산 서열 서열번호: 125 을 포함한다. 본 발명은 서열번호: 125 로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90 %, 95 % 97 % 또는 99 % 서열 동일성(identity)를 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 폴리펩타이드들에 대한 것이다.

[0279] 본 발명의 범위에는 또한 본 발명에 따른 전술한 다사슬(multi-chain) CAR를 코딩하는 벡터들, 폴리뉴클레오타이드들이 포함된다.

[0281] 포함되는 특정 예에는, 본 발명은 상기 세포들을 확장시키고(expanding) 그리고 상기 다사슬(multi-chain) CAR를 포함하는(composing) 다른 폴리펩타이드들을 상기 T-세포들 내로 도입하는 단계를 포함하는 면역요법을 위한 T-세포들을 제조하는(preparing) 방법에 대한 것이다.

[0283] 또다른 예에서, 상기 방법은 면역억제제에 대한 타겟 및/또는 TCR의 하나의 요소를 발현시키는 적어도 하나의 유전자를 불활성화시킴으로써 상기 세포들을 유전적으로 변형하는 단계를 더 포함한다. 바람직한 예에서, 상기 유전자는 TCR알파(alpha), TCR베타(beta), CD52 및 GR로 구성되는 군으로부터 선택된다. 바람직한 예에서 상기 방법은 상기 유전자들을 DNA 절단(cleavage)에 의하여 선택적으로 불활성화시킬 수 있는 회귀-절단 엔도뉴클레아제로 상기 T 세포들 내로 도입하는 단계를 더 포함한다. 더 바람직한 예에서 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 TALE-뉴클레아제이다. 본 발명에 따른 바람직한 TALE-뉴클레아제들은 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 타겟 서열을 인식하고 절단하는 그것들이다: 서열번호: 1 내지 6 (GR), 서열번호: 37, 57 내지 60 (TCR알파(alpha)), 서열번호: 38 또는 39 (TCR베타(beta)), 및 서열번호: 40, 서열번호: 61 내지 서열번호: 65 (CD52).

[0285] 특정 예에서 상기 방법은 추가의 게놈 변형 단계를 더 포함한다. 추가의 게놈 변형 단계에 의하여, 관심있는 하나의 단백질을 조작하기 위하여 세포들 내로의 도입이 의도될 수 있다. 관심있는 상기 단백질은, 제한되지 않는 예들로서, 이중특이성 항체, CTLA-4 또는 PDCD1 을 타겟팅하는 회귀-절단 엔도뉴클레아제, pT알파(pTalpha) 또는 본 공개에 기재된 그것의 기능적 변이체일 수 있다.

[0287] 본 발명은 또한 세포들을 조작하기 위하여 상기 방법에 의하여 수득되기 쉬운 분리된 세포들 또는 세포주들에 대한 것이다. 특히 상기 분리된 세포는 상기 다사슬(multi-chain) CAR를 포함하는(composing) 폴리펩타이드들을 코딩하는 외인성(exogenous) 폴리뉴클레오타이드 서열들을 포함한다.

[0289] 이중특이성(bispecific) 항체들

[0290] 추가의 예에 따라, 전술한 바와 같이 다른 방법들에 의하여 수득되는 조작된 T 세포들은 이중특이성 항체들로 더 노출(expose)될 수 있다. 상기 T-세포들은 환자에게 투여된 후 인 비보로 또는 환자에게 투여 전 엑스 비보로 이중특이성 항체들에 노출(expose)될 수 있다. 상기 이중특이성 항체들은 타겟 항원에 가깝게 조작된 세포들

을 가져오는 것을 허용하는 구별되는(distinct) 항원 특성들을 갖는 두 개의 가변(variable) 영역들을 포함한다. 제한되지 않는 예로서, 상기 이중특이성 항체는 CD3 와 같은 림프구 항원 및 종양 마커(marker)에 대하여(against) 항해지고 그리고 종양에 대항하여 임의의 순환하는(circulating) T 세포들을 활성화시키고 전용하는(redirect) 잠재성을 갖는다.

[0292] **전달(delivery) 방법들**

[0293] 전술한 다른 방법들은 세포 내로 외인성(exogenous) 핵산 또는 DNA-말단 가공 효소로 선택적으로 pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체들, 회귀 절단 엔도뉴클레아제, TALE-뉴클레아제, CAR 또는 다사슬(multi-chain) CAR 를 도입하는 단계를 포함한다.

[0295] 제한되지 않는 예로서, 상기 pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체, 회귀 절단 엔도뉴클레아제들, TALE-뉴클레아제들, CAR 또는 다사슬(multi-chain) CAR는 선택적으로, DNA-말단 가공 효소 또는 외인성(exogenous) 핵산으로, 다른 플라스미드 벡터들로서 또는 하나에 의하여 코딩되는 이식유전자들(transgenes)로서 도입될 수 있다. 다른 이식유전자들(transgenes)은 2A 펩타이드를 코딩하는 서열과 같은 리보솜(ribosomal) 스킵(skip) 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 하나의 벡터 내에 포함될 수 있다. 피코로나바이러스들(picornaviruses)의 아프토바이러스(Aphthovirus) 서브그룹(subgroup)에서 확인된, 2A 펩타이드들은 코돈들에 의하여 코딩되는 두 아미노산들 사이의 펩타이드 결합(bond)의 형성 없이 한 코돈으로부터 옆의 것으로 라이보솜 "스킵(skip)"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(codon)"에 의하여 하나의 아미노산 잔기 내로 리보솜(ribosome)에 의하여 번역되는 mRNA 상 (또는 DNA 분자의 센스 가닥 상) 세 개 뉴클레오타이드들이 의미된다. 그러므로 두 개의 폴리펩타이드들은 폴리펩타이드들이 프레임인(in frame) 2A 올리고펩타이드 서열에 의하여 분리될 때 mRNA 내 단일의, 인접한(contiguous) 오픈 리딩 프레임으로부터 합성될 수 있다. 이러한 리보솜 스킵 메커니즘들은 당업계에 잘 알려져 있고, 단일 메신저(messenger) RNA에 의하여 코딩되는 몇몇의 단백질들의 발현을 위한 몇몇의 벡터들에 의하여 사용되는 것으로 알려져 있다. 제한되지 않는 예로서, 본 발명에서 2A 펩타이드들은 세포 내로 회귀-절단 엔도뉴클레아제 및 DNA 말단-가공 효소 또는 다사슬(multi-chain) CAR의 다른 폴리펩타이드들을 발현시키는데 사용된다.

[0297] 상기 플라스미드 벡터는 상기 벡터를 받는 세포들의 확인(identification) 및/또는 선택을 위하여 제공하는 선택 마커(marker)를 포함할 수 있다.

[0299] 폴리펩타이드들은 세포 내로 상기 폴리펩타이드들 코딩하는 폴리뉴클레오타이드들의 도입의 결과로서 세포 내에서 인 시츄(in situ)로 합성될 수 있다. 대체하여, 상기 폴리펩타이드들은 세포 밖에서 생산되고 그리고 나서 거기로 도입될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 구조체를 동물 세포들 내로 도입하는 방법들은 당업계에 알려져 있으며, 제한되지 않는 예들로서 폴리뉴클레오타이드 구조체는 세포의 게놈(genome) 내로 통합되는 안정적인 형질전환(transformation) 방법들, 폴리뉴클레오타이드 구조체가 세포의 게놈 내로 통합되지 않는 일시적인(transient) 형질전환(transformation) 방법들 및 바이러스 매개된 방법들을 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드들은 예를 들어, 재조합 바이러스 벡터들 (예컨대 레트로바이러스들(retroviruses), 아데노바이러스들(adenoviruses)), 리포솜(liposome) 등에 의하여 세포 내로 도입될 수 있다. 예를 들어 일시적인(transient) 형질전환(transformation) 방법들은 예를 들어 미세주입(microinjection), 전기천공법(electroporation) 또는 유전자총(particle bombardment)을 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드들은 세포들에서 발현되는 관점에서, 벡터들에, 더욱 특히 플라스미드들 또는 바이러스에 포함될 수 있다.

[0301] - 전기천공법(electroporation)

[0302] 본 발명의 더욱 바람직한 예, 본 발명에 따른 폴리펩타이드들을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드들은, 예를 들어 전기천공법(electroporation)에 의하여, 세포들 내로 직접 도입되는 mRNA일 수 있다. 본 발명은 T-세포에서

mRNA 전기천공법(electroporation)을 위한 최적의 조건을 결정하였다.

- [0304] 본 발명자는, 펄스된(pulsed) 전기장들(electric fields)의 사용에 의하여, 세포들 내로의 물질 전달을 위하여 살아있는 세포들을 일시적으로 투과가능하게 하는(permeabilize) 것을 허용하는 사이토펠스(cytoPulse) 기술을 사용하였다. 펄스아질(PulseAgile (Collectis property) 전기천공법(electroporation) 파형들(waveforms)에 기초하여, 그 기술은 펄스 나비(duration), 강도 및 펄스들 사이의 간격(interval)의 정확한 통제를 허락한다(미국특허 6,010,613 및 국제 PCT 출원 WO2004083379). 이들 파라미터들은 모두 최소의 사망(mortality)으로 높은 형질감염(transfection) 효율을 위한 최고의 조건에 도달하기 위하여 변형될 수 있다. 그 다음의 더 낮은 전기장 펄스들이 세포 내로 폴리뉴클레오타이드를 이동시키는 것을 허용하는데 반하여, 기본적으로 첫 번째 높은 전기장 펄스들은 포어(pore) 형성(formation)을 가능하게 한다. 본 발명의 한 측면에서, 본 발명자는 T 세포들 내 mRNA의 >95% 형질감염(transfection) 효율의 달성으로 이끄는 단계들, 및 T 세포들에서 다른 종류의 단백질들을 일시적으로 발현시키기 위한 전기천공법(electroporation) 프로토콜의 사용을 기재한다. 특히 본 발명은 RNA를 상기 T 세포에 접촉시키는 단계 및 T 세포를 하기로 구성되는 아질(agile) 펄스(pulse)에 적용하는 단계를 포함하는 T 세포를 형질전환(transform)시키는 방법에 대한 것이다;
- [0305] (a) 센티미터 당 2250 부터 3000 V 까지의 전압 범위, 0.1 ms의 펄스 폭(width) 및 단계(step) (a) 및 (b)의 전기적 펄스들 사이의 0.2 내지 10 ms의 펄스 간격(interval)을 갖는 하나의 전기적 펄스;
- [0306] (b) 100 ms의 펄스 폭(width)으로 2250 부터 3000 V 까지의 전압 간격 및 단계 (b) 의 전기적 펄스 및 단계 (c)의 첫 번째 전기적 펄스 사이에 100 ms의 펄스 간격(interval)을 갖는 하나의 전기적 펄스; 및
- [0307] (c) 0.2 ms 의 펄스 폭(width)으로 325 V의 전압 및 4 개의 전기적 펄스들 사이에 2 ms의 펄스 간격(interval)을 갖는 4 개의 전기적 펄스들.
- [0309] 특히, T 세포의 형질전환 방법은 상기 T 세포를 RNA와 접촉시키는 단계 및 T 세포를 하기로 구성되는 아질(agile) (pulse) 시퀀스(sequence)에 적용하는 단계를 포함한다;
- [0310] (a) 센티미터 당 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2600, 2700, 2800, 2900 또는 3000V의 전압, 0.1 ms의 펄스 폭(width) 및 단계 (a) 및 (b)의 전기적 펄스들 사이의 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 ms의 펄스 간격(interval)을 갖는 하나의 전기적 펄스;
- [0311] (b) 100 ms의 펄스 폭(width)을 갖고 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2600, 2700, 2800, 2900 또는 3000V 의, 2250로부터의 전압 범위 및 단계 (b)의 전기적 펄스 및 단계 (c)의 첫 번째 전기적 펄스 사이의 100 ms의 펄스 간격(interval)을 갖는 하나의 전기적 펄스; 및
- [0312] (c) 4 개의 전기적 펄스들 각각의 사이의 2 ms의 펄스 간격(interval) 및 0.2 ms 의 펄스 폭(width)을 갖는 325 V의 전압을 갖는 4 개의 전기적 펄스들.
- [0314] 전술한 수치 범위내 포함되는 임의의 수치들이 본 출원에서 공개된다. 전기천공(lectroporation) 배지는 당업계에 알려진 임의의 적당한 배지일 수 있다. 바람직하게는 전기천공 배지는 0.01 내지 1.0 밀리시멘스(milliSiemens)에 걸치는(spanning) 범위의 전도성을 갖는다.
- [0316] 특정 예들에서, 제한되지 않는 예들로서, 상기 RNA는 회귀-절단 엔도뉴클레아제(endonuclease), Half-TALE-뉴클레아제와 같은 회귀-절단 엔도뉴클레아제의 한 모노머, 키메라 항원 수용체, 다사슬(multi-chain) 키메라 항원 수용체의 적어도 하나의 요소, pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체, 외인성(exogenous) 핵산, 하나의 추가적 측매 도메인을 코드한다.
- [0318] T 세포들의 활성화 및 확장
- [0319] T 세포들의 유전적 변형 전 또는 후에, T 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. 특허출원공개 No. 20060121005 에 기재된 대로 방법들을 이용하여 일반적으로 활성화되고 확장(expand)될 수 있다. T 세포들은 인 비트로(in vitro) 또는 인 비보(in vivo)로 확장될 수 있다.

[0321] 일반적으로 본 발명의 T 세포들은, T 세포들의 표면 상 공-자극 분자를 자극하는 리간드 및 CD3 TCR 복합체 관련 신호를 자극하는 제제와 부착되는 표면과의 접촉에 의하여 확장된다.

[0323] 특히, T 세포 개체군들(populations)은, 항-CD3 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편, 또는 표면 상에 고정화된 항-CD2 항체와의 접촉에 의하여, 또는 칼슘 이온운반체(ionophore)와 함께 단백질 키나제(kinase) C 액티베이터(activator)(예컨대, 브리오스타틴(bryostatine))과의 접촉에 의하여, 인 비트로(in vitro)로 자극될 수 있다. T 세포들의 표면 상 악세서리 분자의 공자극을 위하여, 악세서리 분자에 결합하는 리간드가 사용된다. 예를 들어, T 세포들의 개체군(population)은 T 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 위하여, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체. 예를 들어, 각각 신호를 제공하는 제제들은 용액 내로 또는 표면과 커플링될 수 있다. 당업계의 일 상적인 기술자로서, 입자들의 세포들에 대한 비율은 타겟 세포에 비례하는 입자 사이즈에 의존할 수 있다는 것을 쉽게 인정할 수 있다. 본 발명의 추가의 예들로서, T 세포들과 같은 세포들은 제제-코팅된 비드(bead)들과 조합(combine)되며, 비드들 및 세포들은 그 뒤에 분리되고, 그리고 그 다음에 세포들이 배양된다. 대체의 예에서, 배양 전, 제제-코팅된 비드들 및 세포들은 분리되지 않으나, 함께 배양된다. 세포 표면 단백질들은 항-CD3 및 항-CD28이 부착되는(3x28 비드들) 상자성(paramagnetic) 비드들이 T 세포들과 접촉하는 것을 가능하게 함으로써 라이게이션될 수 있다(ligate). 한 예에서, 세포들 (예를 들어, 4 내지 10 T 세포들) 및 비드들 (예를 들어, 1:1의 비율로 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 상자성(paramagnetic) 비드들)은 버퍼, 바람직하게는 (칼슘 및 마그네슘과 같은 이가양이온이 없는) PBS에서 조합된다. 다시, 당업자들은 임의의 세포 농도가 사용될 수 있다는 것을 쉽게 인정할 것이다. 혼합물은 몇 시간(약 3 시간) 내지 약 14 일 또는 그 사이의 임의의 매 시간의 정수 값 동안 배양될 수 있다. 또다른 예에서, 혼합물은 21 일 동안 배양될 수 있다. T 세포에 적합한 조건들은 혈청 (예컨대, 소 태아 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 첨가제들을 포함하는, 증식 및 생존 능력(viability)에 필요한 인자들을 포함할 수 있는, (예컨대, Minimal Essential Media 또는 RPMI Media 1640 또는, X-vivo 5, (Lonza))인 적절한 배지를 포함한다. 세포들의 성장을 위한 다른 첨가제들은, 계면활성제, 플라즈마네이트(plasmanate) 및 2-머캅토에탄올(mercaptoethanol) 및 N-아세틸(acetyl)-시스테인(cysteine)과 같은 환원제들을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 배지(media)는 비타민들, 소듐(sodium) 피루베이트(pyruvate) 및 첨가된 아미노산들을 갖는, 혈청-프리이거나 또는, T 세포들의 성장 및 확장에 충분한 사이토카인(들)의 상당량, 및/또는 호르몬들의 규정된 세트 또는 적절한 양의 혈청(또는 혈장)이 보충된, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 1, 및 X-Vivo 20, Optimizer를 포함할 수 있다. 항생물질들, 예컨대, 페니실린 및 스트렙토마이신은 실험 배양에서만 포함되고, 대상(subject) 내로 주입되는(infused) 세포들의 배양에는 포함되지 않는다. 타겟 세포들은 예를 들어, 적절한 온도 (예컨대, 37 °C) 및 공기(예컨대, 공기 플러스 5% CO₂)인, 성장을 지지하기에 필요한 조건들 하 유지된다. 다양한 자극 시간들에 노출된 T 세포들은 다른 특성들을 보일 수 있다.

[0325] 또다른 특정 예에서, 상기 세포들은 조직 또는 세포들과 공-배양에 의하여 확장될 수 있다. 상기 세포들은 또한 인 비보, 예를 들어 대상 내로 상기 세포를 투여한 후 대상의 혈액에서 확장될 수 있다.

[0327] 변형된 T-세포들

[0328] 본 발명의 범위에, 전술한 방법들 중 임의의 하나에 따라 수득되는 분리된 T 세포가 포함된다. 본 발명에 따른 T-세포는 줄기 세포 유래일 수 있다. 줄기 세포들은 성체 줄기 세포들, 배아 줄기 세포들, 더욱 특히 비-인간 줄기 세포들, 제대혈 줄기 세포들, 간(progenitor) 세포들, 골수 줄기 세포들, 유도(induced) 만능(pluripotent) 줄기 세포들, 전분화(totipotent) 줄기 세포들 또는 조혈모(hematopoietic stem) 세포들일 수 있다. 대표적인 인간 세포들은 CD34+ 세포들이다. 상기 분리된 세포는 또한 수지상(dendritic) 세포, NK-세포,

B-세포 또는 염증성(inflammatory) T-림프구들, 세포독성(cytotoxic) T-림프구들, 조절(regulatory) T-림프구들 또는 헬퍼(helper) T-림프구로 구성된 군으로부터 선택되는 T-세포들일 수 있다. 또다른 예에서, 상기 세포는 CD4+ T-림프구들 및 CD8+ T-림프구들로 구성되는 군으로부터 유래될 수 있다. 본 발명의 세포들의 유전적 변형 및 확장 전에, 세포들의 소스는 여러가지 제한되지 않는 방법들을 통하여 대상으로부터 획득될 수 있다. T 세포들은 말포혈액 잔해 세포들, 골수, 림프절(node) 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염, 복수들(ascites), 흉수(pleural effusion), 비장(spleen) 조직 및 종양들의 위치로부터의 조직을 포함하는, 제한되지 않는 소스들로부터 획득될 수 있다. 본 발명의 특정 예들에서, 당업계에 알려지고 이용 가능한 임의의 수의 T 세포주들이 사용될 수 있다. 또다른 예에서, 상기 세포는 건강한 도너로부터, 암으로 진단받은 환자로부터, 또는 감염으로 진단받은 환자로부터 유래될 수 있다. 또다른 예에서, 상기 세포는 다른 표현형(phenotypics) 특성들을 보이는 세포들의 혼합된 개체군(population)의 부분이다. 본 발명의 범위에, 전술한 방법에 따라 형질전환(transform)된 T-세포로부터 획득된 세포주가 포함된다. 면역억제 처리에 저항성이고 전의 방법에 의하여 획득되는 것을 허용하는 변형된 세포들은 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0330] 또다른 예에서, 본 발명에 따른 상기 분리된 세포는 CD52, GR, PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 불활성화된 유전자를 포함하고, 그리고/또는 CAR, 다사슬(multi-chain) CAR 및/또는 pT알파(pTalpha) 이식유전자(transgene)를 발현시킨다. 또다른 예에서, 본 발명에 따른 상기 분리된 세포는 CD52 및 GR, CD52 및 TCR 알파, CDR52 및 TCR 베타, GR 및 TCR 알파, GR 및 TCR 베타, TCR 알파 및 TCR 베타, PD1 및 TCR 알파, PD1 및 TCR 베타, CTLA-4 및 TCR 알파, CTLA-4 및 TCR 베타, LAG3 및 TCR 알파, LAG3 및 TCR 베타, Tim3 및 TCR 알파, Tim3 및 TCR 베타, BTLA 및 TCR 알파, BTLA 및 TCR 베타, BY55 및 TCR 알파, BY55 및 TCR 베타, TIGIT 및 TCR 알파, TIGIT 및 TCR 베타, B7H5 및 TCR 알파, B7H5 및 TCR 베타, LAIR1 및 TCR 알파, LAIR1 및 TCR 베타, SIGLEC10 및 TCR 알파, SIGLEC10 및 TCR 베타, 2B4 및 TCR 알파, 2B4 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 두 개의 불활성화된 유전자를 포함하고, 그리고/또는 CAR, 다사슬(multi-chain) CAR 및/또는 pT알파(pTalpha) 이식유전자(transgene)를 발현시킨다.

[0332] 또다른 예에서, TCR은 TCR 알파 유전자 및/또는 TCR 베타 유전자(들)을 불활성화시킴으로써 본 발명에 따른 세포들에서 기능적이지 않게 만들어진다(rendered). 상기 전략들은 더욱 특히 GvHD를 피하기 위하여 사용된다. 본 발명의 특정 관점에서, 개인으로부터 유래된 변형된 세포를 획득하는 방법으로, 이때 상기 세포들은 주요(Major) 조직적합성(Histocompatibility) 복합체(Complex) 신호전달 경로의 독립적으로 증식될 수 있다. 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:

[0333] (a) 상기 개인으로부터 세포들을 회수(recovering)하는 단계;

[0334] (b) TCR 알파 또는 TCR 베타 유전자들을 불활성화시킴으로써 엑스-비보에서 상기 세포들을 유전적으로 변형시키는 단계;

[0335] (c) 유전적으로 변형된 T-세포들을 적절한 조건들 하 인 비트로(in vitro)에서 배양하여 상기 세포들을 증폭시키는 단계.

[0337] 이 방법에 의하여 획득되는 것이 가능한, 주요(Major) 조직적합성(Histocompatibility) 복합체(Complex) 신호전달 경로의 독립적으로 증식가능한 변형된 세포들은 본 발명의 범위에 포함된다. 상기 변형된 세포들은 숙주편대이식(Host versus Graft)(HvG) 거부(rejection) 및 이식편대숙주(Graft versus Host) 질환(Disease) (GvHD)에 대하여; 그러므로 그것을 필요로 하는 환자들을 치료하기 위하여 본 발명의 특정 관점에서 사용될 수 있고; 그러므로 본 발명의 범위에는, 불활성화된 TCR 알파 및/또는 TCR 베타 유전자들을 포함하는 변형된 세포들의 효과적인 양을 상기 환자에 투여함으로써 상기 환자를 치료하는 단계를 포함하는, 숙주편대이식(Host versus Graft)(HvG) 거부(rejection) 및 이식편대숙주(Graft versus Host) 질환(Disease) (GvHD)에 대하여 그것을 필요로 하는 환자들의 치료 방법이다.

[0339] 치료적 적용들

- [0340] 또다른 예에서, 다른 방법들에 의하여 수득되는 분리된 세포 또는 전술한 바와 같이 상기 분리된 세포로부터 유래되는 세포주는 의약(medicament)으로서 사용될 수 있다. 또다른 예에서, 상기 의약은 그것을 필요로 하는 환자에게서 감염들 또는 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 또다른 예에서, 본 발명에 따른 상기 분리된 세포 또는 상기 분리된 세포로부터 유래된 세포주는 그것을 필요로 하는 환자에게서 바이러스 감염 또는 암의 치료용 의약의 제조에 사용될 수 있다.
- [0342] 또다른 측면에서, 본 발명은 그것을 필요로 하는 환자들의 치료 방법들, 하기 단계들 중 적어도 하나를 포함하는 상기 방법에 의존한다:
- [0343] (a) 전술한 방법들 중 임의의 하나에 의하여 수득가능한 T-세포를 제공하는 단계;
- [0344] (b) 상기 환자에 상기 형질전환된 T-세포들을 투여하는 단계,
- [0346] 한 예에서, 본 발명의 상기 T 세포들은 인 비보 T 세포 확장에서 로버스트(robust)를 겪을 수 있고, 연장된 시간 동안 지속될 수 있다.
- [0348] 상기 치료는 개선적, 치료적 또는 예방적일 수 있다. 그것은 자가(autologous) 면역요법의 부분 또는 동종이형(allogenic) 면역요법 치료의 부분일 수 있다. 자가(autologous)에 의하여, 환자들의 치료에 사용되는 세포들의 개체군(population), 세포주 또는 세포들이 환자로부터 또는 인간(Human) 백혈구(Leucocyte) 항원(Antigen) (HLA) 호환성(compatible) 도너로부터 기원할 수 있다는 것이 의미된다. 동종이형(allogeneic)에 의하여, 환자들의 치료에 사용되는 세포들의 개체군(population) 또는 세포들이 상기 환자로부터 기원하지 않고 도너로부터 기원한다는 것이 의미된다.
- [0350] 본 발명은 특히, 그것이 비-동종반응성(alloreactive) 세포들 내로, 전형적으로 도너들로부터 수득되는, T-세포들의 형질전환(transformation)을 가능하게 하는 한, 동종이형(allogenic) 면역요법에 적합하다. 이것은 표준 프로토콜들 하 될 수 있고 그리고 필요한 만큼 여러 번 재생산될 수 있다. 그 결과인 변형된 T 세포들은 모아지고(pool) 그리고 "기성품인(off the shelf)" 치료적 제품으로서 이용가능하게 만들어져, 하나 또는 몇몇의 환자에게 투여될 수 있다.
- [0352] 공개된 방법들과 사용될 수 있는 세포들은 전 섹션에서 기재되어 있다. 상기 치료는 암, 바이러스 감염, 자가면역 장애들 또는 이식편대숙주(Graft versus Host) 질환(Disease) (GvHD)로 진단받은 환자들을 치료하는데 사용될 수 있다. 치료될 수 있는 암들은 혈관발달(vascularized)되지 않은 종양들, 또는 아직 주로 혈관발달(vascularized)되지 않은, 그리고 혈관발달된(vascularized) 종양들을 포함한다. 암들은 (예를 들어, 백혈병들(leukemias) 및 림프종들(lymphomas)인 혈액 종양들과 같은) 비고형 종양들을 포함할 수 있고 또는 고형(solid) 종양들을 포함할 수 있다. 본 발명의 CAR들로 치료되는 암들의 타입들은 암종(carcinoma), 아세포종(blastoma), 및 육종(sarcoma), 및 특정 백혈병 또는 림프종(lymphoid) 악성종양들(malignancies), 양성(benign) 및 악성(malignant) 종양(tumor)들, 및 악성종양들(malignancies) 예컨대 육종들(sarcomas), 암종들(carcinomas), 및 흑색종들(melanomas)을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 성인 종양들/암들 및 소아 종양들/암들 또한 포함된다.
- [0354] 그것은 항체들 요법, 화학 요법, 사이토카인들 요법, 수지상세포(dendritic cell) 요법, 유전자 치료, 호르몬 요법, 레이저광 치료 및 방사선 요법의 군으로부터 선택되는 암에 대항한 하나 또는 그보다 많은 요법들과 조합된 치료일 수 있다.
- [0356] 본 발명의 선호되는 예에 따라, 상기 치료는 면역억제 치료를 겪고 있는 환자들 내로 투여될 수 있다. 정말로, 본 발명은 바람직하게는 이러한 면역억제제를 위한 수용체를 코딩하는 유전자의 불활성화 때문에 적어도 하나의

면역억제제에 저항성으로 만들어진, 세포들의 개체군(population) 또는 세포들에 의존한다. 이 관점에서, 면역억제 치료는 환자 내에서 본 발명에 따른 T-세포들의 선택 및 확장을 도와야 한다.

[0358] 본 발명에 따른 세포들의 개체군(population) 또는 세포들의 투여는 에어로졸(aerosol) 흡입(inhalation), 주사(injection), 섭취(ingestion), 투입(transfusion), 주입(implantation) 또는 이식(transplantation)을 포함하는, 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 여기에 기재된 조성물들은 환자에 피하로(subcutaneously), 피내로(intradermally), 종양내로(intratumorally), 절내로(intranodally), 골수내로(intramedullary), 근육내로(intramuscularly), 정맥(intravenous)으로 또는 림프액내(intralympathic) 주사(injection), 또는 복막내로(intraperitoneally) 투여될 수 있다. 한 예에서, 본 발명의 세포 조성물들은 바람직하게는 정맥 주사에 의하여 투여된다.

[0360] 세포들의 개체군(population) 또는 세포들의 투여는 체중 kg 당 10^4 - 10^9 세포들의, 바람직하게는 10^5 내지 10^6 세포들/kg 체중으로 그들 범위들 내의 세포 숫자들 중 모든 정수 값들을 포함하는 것의 투여로 구성될 수 있다. 세포들 또는 세포들의 개체군은 하나 또는 그보다 많은 용량(doses)들로 투여될 수 있다. 또다른 예에서, 세포들의 상기 유효한 양은 단일 용량으로 투여된다. 또다른 예에서, 세포들의 상기 유효한 양은 일정 기간 동안 하나보다 많은 용량(dose)으로 투여된다. 투여 타이밍은 담당의사의 판단 내이며, 환자의 임상 조건에 의존한다. 세포들 또는 세포들의 개체군(population)은 혈액 은행 또는 도너와 같은, 임의의 소스로부터 수득될 수 있다. 개인적 필요들이 다른 반면, 특정 질환 또는 조건들을 위한 정해진 세포 타입의 효과적인 양들의 최적 범위들의 결정은 당업계의 기술 내이다. 효과적인 양은 치료적 또는 예방적 이익을 제공하는 양을 의미한다. 투여되는 용량(dosage)은 받는 사람의 연령, 건강 및 체중, 동시에 받는 치료의 종류, 만약 있다면 치료의 빈도 및 원하는 효과의 특성에 의존할 것이다.

[0362] 또다른 예에서, 이들 세포들을 포함하는 조성물 또는 세포들의 상기 효과적인 양은 비경구적으로 투여된다. 상기 투여는 정맥내(intravenous) 투여될 수 있다. 상기 투여는 종양 내로 주사에 의하여 직접 될 수 있다.

[0364] 본 발명의 특정 예들에서, 세포들은, 항바이러스 요법, 시도포비르(cidofovir) 및 인터루킨-2과 같은 제제들, 시트라빈(Cytarabine) (ARA-C로도 알려짐) 또는 MS 환자들을 위한 나탈리지맵(natalizimab) 치료 또는 건선(psoriasis) 환자들을 위한 에팔리즈티맵(efalizumab) 치료 또는 PML 환자들을 위한 다른 치료들을 포함하나 이에 제한되지 않는, 임의의 수의 관련 치료 양식들과 함께 (예컨대, 그 전, 동시에 또는 그 후에) 환자에게 투여된다. 추가의 예들에서, 본 발명의 T 세포들은, 화학요법, 방사선, 사이클로스포린(cyclosporin), 아자티오프린(azathioprine), 메토트렉세이트(methotrexate), 마이코페놀레이트(mycophenolate), 및 FK506 과 같은 면역억제제들, 항체들, 또는 CAM PATH와 같은 다른 면역에의한(immunoablative) 제제들, 항-CD3 항체들 또는 다른 항체 요법들, 사이토신(cytosine), 플루다리빈(fludarabine), 사이클로스포린(cyclosporin), FK506, 라파미신(rapamycin), 마이코플리에노익산(mycophenolic acid), 스테로이드들, FR901228, 사이토카인들, 및 방사선요법(irradiation)과 조합하여 사용될 수 있다. 이들 약들은 칼슘 의존적 포스파타제(phosphatase) 칼시뉴린(calcineurin) (사이클로스포린(cyclosporine) 및 FK506)을 억제하거나 또는 성장 인자 유도된 신호전달에 중요한 p70S6 키나제를 억제한다(rapamycin) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Citr. Opin. mm n. 5:763-773, 93). 추가의 예에서, 본 발명의 세포 조성물들은 골수 이식, OKT3 또는 CAMPATH와 같은 항체들 또는 플루다라빈(fludarabine), 외부(external)-빔(beam) 방사선(radiation) 요법(therapy) (XRT), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide)와 같은 화학요법 제제들을 이용한 T 세포에 의한(ablative) 요법과 함께(예컨대, 그 전, 동시에 또는 그 후에) 환자에 투여된다. 또다른 예에서, 본 발명의 세포 조성물들은 CD20, 예컨대 리투산(Rituxan)과 반응하는 제제들과 같은 B-세포 에의한(ablative) 요법 후 투여된다. 예를 들어, 한 예에서, 대상은 고용량의 화학요법으로 표준 치료를 받고 그 후에 말초 혈액 줄기 세포 이식을 받을 수 있다. 특정 예들에서, 이식 후, 대상들은 본 발명의 확장된 면역 세포들의 주입(infusion)을 받는다. 추가의 예에서, 확장된 세포들은 수술(surgery) 전 또는 후 투여된다. 여기에 기재된 방법들 중 임의의 하나에 의하여 수득되는 상기 변형된 세포들은 숙주편대이식(Host versus Graft) (HvG) 거부(rejection) 및 이식편대숙주(Graft versus Host) 질환(Disease) (GvHD)에 대항하여 그것을 필요로 하는 환자

들을 치료하기 위하여 본 발명의 특정 측면에서 사용될 수 있다; 그러므로 본 발명의 범위에서, 불활성화된 TCR 알파 및/또는 TCR 베타 유전자들을 포함하는 변형된 세포들의 효과적 양을 상기 환자에 투여함으로써 상기 환자를 치료하는 단계는 포함하는 숙주편대이식(Host versus Graft) (HvG) 거부(rejection) 및 이식편대숙주(Graft versus Host) 질환(Disease) (GvHD)에 대항하는 그것을 치료로 하는 환자들의 치료 방법이다.

[0366] 면역요법을 위한 인간 동종이형(allogeneic) 세포들의 조작 방법의 예

[0367] 본 발명의 더 나은 이해를 위하여, 면역요법을 위한 인간 동종이형(allogenic) 세포들의 조작 방법의 한 예가 도 5에 나타나 있다. 하기 단계들의 하나 또는 몇몇의 조합을 포함하는 방법:

[0369] 1. 한 명의 개인 환자로부터의 또는 혈액 은행으로부터의 혈액 샘플로부터 또는 세포 배양물(culture)로부터 T-세포들을 제공하고, 그리고 항-CD3/C28 액티베이터(activator) 비드들을 이용하여 상기 T 세포를 활성화시키는 단계. 비드들은 T 세포들의 활성화 및 확장에 요구되는 일차 및 공-자극 신호들을 제공한다.

[0371] 2. a) CD3 표면 발현을 지지하기 위하여 pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체(variant) 이식유전자(transgene)로 상기 세포들을 형질도입(transducing)하고 CD3 복합체의 자극을 통한 세포 확장을 가능하게 하는 단계. TCR 붕괴(disruption)는 TCR 복합체(complex)의 제거로 예상되고 동종반응(alloreactivity) (GvHD)을 제거하나, CD3 신호전달 요소의 상실 때문에 동종이형(allogenic) 세포들 확장을 바꿀 수 있다. 형질도입된(transduced) 세포들은 pT알파(pTalpha) 사슬 또는 그것의 기능적 변이체(variant)를 발현시킬 것으로 예상된다. 이 pT알파(pTalpha) 사슬은 TCR베타 사슬 및 CD3 신호전달 요소들과 짝을 이뤄 preTCR 복합체(complex)를 형성하고, 그리고 이런 식으로 기능적 CD3 복합체를 회복시키고 그리고 불활성화된 TCR알파 세포들의 자극 또는 활성화를 지지한다. pT알파(pTalpha) 렌티바이러스(lentiviral) 벡터로 T-세포들의 형질도입(transduction)은 TCR알파 불활성화 전 또는 후에 실현될 수 있다.

[0373] b) 다사슬(multi-chain) CAR들로 상기 세포들을 형질도입(transducing) 하는 것은 림프종들(lymphomas) 및 고형 종양들을 포함하는 다양한 악성종양들(malignancies)로부터 타겟 세포들의 표면에서 발현되는 항원들에 대하여 T 세포들을 전용시키는(redirect) 것을 허용한다. 공-자극 도메인의 기능을 개선하기 위하여, 발명자들은 전술한 바와 같이 FcεRI로부터 유래된 다사슬(multi-chain) CAR를 디자인하였다. 형질도입은 TCR알파 및 CD52 유전자들과 같은 다른 유전자들의 불활성화 전 또는 후에 실현될 수 있다.

[0375] 3. 비(non) 동종반응성(alloreactive) 및 면역억제제 저항성 T 세포들을 조작하는 단계:

[0377] a) 세포 표면으로부터 TCR을 제거하기 위하여 상기 세포들에서 TCR 알파를 불활성화시키고 동종이형(allogenic)의 TCR 에 의하여 외래의 것으로 숙주 조직을 인식하는 것을 방지하여 이로써 GvHD 를 피하는 것이 가능하다.

[0379] b) 이식된 T 세포들에 영향을 미치지 않고 이식편(graft) 거부를 방지하기 위하여 면역억제 처리에 저항성으로 상기 세포들을 만들기(render) 위하여, 면역억제제에 대한 타겟을 코딩하는 하나의 유전자를 불활성화시키는 것도 또한 가능하다. 이 예에서, 면역억제제의 타겟은 CD52이고 그리고 면역억제제는 인간화된 단일클론 항-CD52 항체이다.

[0381] T-세포들 내에서 DSB 이벤트들의 더 높은 비율들을 허용함으로써 TALE-뉴클레아제의 이용은 T-세포들의 상기 이중 불활성화를 달성하는데 특히 유리하다는 것이 발명자들에 의하여 보여졌다. 바람직하게는, TCR알파 및 CD52 유전자들은 상기 유전자들을 타겟팅하는 TALE-뉴클레아제를 코딩하는 mRNA로 T 세포들을 전기천공함으로써 불활성화된다. 높은 형질전환(transformation) 비율을 야기하는 mRNA를 이용하는 것이 T-세포들에 덜 해롭고, 그리고 T-세포들을 조작하는 공정에서 매우 중요하다는 것이 본 발명자들에 의하여 발견되었다. 그 다음에 불활성화

된 T 세포들이 자성(magnetic) 비드들을 이용하여 분류된다. 예를 들어 CD52를 발현시키는 T 세포들이 고체 표면 상에 고정에 의하여 제거되고, 그리고 불활성화된 세포들이 칼럼을 통하여 통과되는 스트레스에 노출되지 않는다. 이 온화한 방법은 적절하게 조작된 T-세포들의 농도를 증가시킨다.

[0383] 4. CD3 복합체의 자극을 통한 환자에서의 투여 후 인 비보에서 또는 환자에서의 투여 전에 조작된 T-세포들의 인 비트로(in vitro)에서의 확장(expansion). 투여 단계 전, 환자들은 CAMPATH1-H, 인간화된 단일클론 항체 항-CD52 과 같은, 면역억제 처리가 될 수 있다.

[0385] 5. 타겟 항원으로 근접한 안으로 조작된 세포들을 가져오기 위하여 환자에서의 투여 후 인 비보에서 또는 환자에서 투여 전에 엑스 비보에서 이중특이성 항체들에 선택적으로 노출된 상기 세포들.

[0387] 다른 정의들

[0388] - 폴리펩타이드 서열 내 아미노산 잔기들은 한 문자 코드에 따라 여기에서 지정되는데, 예를 들어, Q는 Gln 또는 글루타민(Glutamine) 잔기를 의미하고, R은 Arg 또는 아르기닌(Arginine) 잔기를 의미하고 그리고 D 는 Asp 또는 아스파르트산(Aspartic acid)을 의미한다.

[0390] - 아미노산 치환(substitution)은 하나의 아미노산 잔기의 또다른 것과의 대체(replacement)를 의미하는데, 예를 들어 펩타이드 서열에서 아르기닌(Arginine) 잔기의 글루타민(Glutamine) 잔기로의 대체는 아미노산 치환이다.

[0392] - 뉴클레오타이드들은 하기와 같이 지정된다: 한 문자 코드는 뉴클레오타이드의 염기를 지정하는 것으로 사용된다: a는 아데닌(adenine)이고, t는 티민(thymine)이고, c는 사이토신(cytosine)이고, 그리고 g는 구아닌(guanine)이다. 지정된 뉴클레오타이드들을 위하여, r은 g 또는 a (퓨린(purine) 뉴클레오타이드들)을 나타내고, k는 g 또는 t를 나타내고, s는 g 또는 c를 나타내고, w는 a 또는 t를 나타내고, m 은 a 또는 c를 나타내고, y는 t 또는 c (피리미딘(pyrimidine) 뉴클레오타이드들)를 나타내고, d 는 g, a 또는 t를 나타내고, v 는 g, a 또는 c를 나타내고, b는 g, t 또는 c를 나타내고, h 는 a, t 또는 c를 나타내고, 그리고 n 은 g, a, t 또는 c를 나타낸다.

[0394] - "여기에서 사용된 대로, "핵산(nucleic acid)" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 디옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid) (DNA) 또는 리보핵산(ribonucleic acid) (RNA), 올리고뉴클레오타이드들(oligonucleotides), 폴리메라제(polymerase) 연쇄(chain) 반응(reaction) (PCR)에 의하여 생성되는 단편들, 및 라이게이션(ligation), 절단(scission), 엔도뉴클레아제 작용, 및 엑소뉴클레아제(exonuclease) 작용 중 임의의 것에 의하여 생성되는 단편들과 같은, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드들을 가리킨다. 핵산 분자들은 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드들 (DNA 및 RNA와 같은), 또는 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드들 (예컨대, 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드들의 거울상이성질체(enantiomeric) 형태들)의 유사체들(analogs) 또는 이 둘의 조합인 모노머들을 포함할 수 있다. 변형된 뉴클레오타이드들은 피리미딘 또는 퓨린 염기 모이어티들에서 및/또는 당 모이어티들에서 변화들(alterations)을 가질 수 있다. 당 변화들은 예를 들어, 하나 또는 그보다 많은 하이드록실(hydroxyl)기들의 할로젠들, 알킬기들, 아민들, 및 아지도(azido) 기들로의 대체(replacement)를 포함하고, 또는 당(sugar)들은 에터들(ethers) 또는 에스터들(esters)로서 기능화될 수 있다. 게다가 전체 당 모이어티는 아자(aza)-당들 및 카르복실(carbocyclic) 당(sugar) 유사체들(analogs)과 같은, 입체구조적으로(sterically) 그리고 전자적으로(electronically) 유사한 구조들로 대체될 수 있다. 염기 모이어티 내 변화의 예들은 알킬화된(alkylated) 퓨린들 및 피리미딘들, 아실화된(acylated) 퓨린들 또는 피리미딘들, 또는 다른 잘 알려진 헤테로사이클릭(heterocyclic) 치환기들(substitutes)을 포함한다. 핵산 모노머들은 포스포다이에스터(phosphodiester) 결합들(bonds) 또는 이러한 연결(linkages)들의 유사체들에 의하여 연결(link)될 수 있다. 핵산들은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0396] - 상기 이중가닥 손상(break)의 업스트림 서열들에 상동성(homology)의 첫 번째 영역, 상기 세포의 게놈 내 삽입되는 서열, 및 이중가닥 손상(break)의 다운스트림 서열들에 상동성(homology)의 두 번째 영역을 연속적으로 포함하는 폴리뉴클레오타이드"에 의하여, 인 시츄에서 DNA 타겟의 5' 및 3' 영역에 상동인(homologous) 첫 번째 및 두 번째 부분을 포함하는 매트릭스 또는 DNA 구조체가 의도된다. DNA 구조체는 또한 인 시츄(in situ)에서 대응하는 DNA 서열과 일부 상동성(homology)을 갖는 첫 번째 및 두 번째 부분 사이에 위치하는 세 번째 부분을 포함하고, 또는 대체하여, 인 시츄에서 DNA 타겟의 5' 및 3' 영역들과 상동성(homology)을 갖지 않는다. DNA 타겟의 절단(cleavage) 후, 상동 재조합 이벤트가 관심있는 위치(locus) 내 포함되는 타겟된 유전자를 포함하는 게놈과 이 매트릭스 사이에서 자극되고, 이때 DNA 타겟을 포함하는 게놈 서열이 매트릭스의 세 번째 부분 및 상기 매트릭스의 첫 번째 및 두 번째 부분들의 다양한 부분에 의하여 대체된다.

[0398] - "DNA 타겟", "DNA 타겟 서열", "타겟 DNA 서열", "핵산 타rpt 서열", "타겟 서열" 또는 "가공(processing) 위치(site)"에 의하여, 본 발명에 따른 회귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 타겟되고 가공될 수 있는 폴리뉴클레오타이드 서열이 의도된다. 이들 용어들은 특이적 DNA 위치(location), 바람직하게는 세포에서 게놈 위치를 가리키나, 그러나 또한, 제한되지 않는 예로서, 미토콘드리아와 같은 세포소기관들에서, 또는 트랜스포존들(transposons), 바이러스, 에피솜들(episomes), 플라스미드들과 같은 유전적 물질의 본체에 독립적으로 존재할 수 있는 유전 물질의 부분을 가리킨다. TALE-뉴클레아제 타겟들의 제한되지 않는 예들로서, 타겟이 된 게놈 서열들은 보통 15-bp 스페이서(spacer)에 의하여 분리된 두 개의 17-bp 길이 서열들(반(half) 타겟들로 불림)로 구성된다. 각각의 반(half)-타겟은 EF1-알파 프로모터 또는 T7 프로모터의 통제 하, 플라스미드들 내 코드되는, 제한되지 않는 예들로서, 표 2, 6, 7 및 11 에 리스트된 TALE-뉴클레아제들의 반복들에 의하여 인식된다. 핵산 타겟 서열은 표 2, 6, 7 및 11에서 표시된 바와 같이, 상기 타겟의 한 가닥의 5'에서 3'으로의 서열에 의하여 정의된다.

[0400] - 키메라 항원 수용체 (CAR)에 의하여 특이적 항-타겟 세포 면역 활성을 보이는 키메라 단백질을 만들기 위하여, 타겟 세포 상 존재하는 요소에 대항한 결합 도메인과, 예를 들어 원하는 항원(예컨대, 종양 항원)에 대한 항체-기반의 특이성, T 세포 수용체-활성(activating) 세포내 도메인을 조합하는 분자가 의도된다. 일반적으로 CAR는 T 세포 항원 수용체 복합체(complex) 제타 사슬 (scFvFc: ζ)의 세포내 신호전달 도메인에 융합되는 세포외 단일 사슬 항체 (scFvFc)로 구성되고 그리고 T 세포들에서 발현될 때, 단일클론 항체의 특이성에 기초한 항원 인식으로 전용하는(redirect) 능력을 갖는다. 본 발명에서 사용되는 CAR의 한 예는 CD19 항원에 대하여 항하는 CAR이고 그리고 제한되지 않는 예로서 아미노산 서열 : 서열번호: 73 를 포함할 수 있다.

[0402] - "전달(delivery) 벡터" 또는 "전달 벡터들"에 의하여 제제들/화학품(chemicals)들 및 분자들(단백질들 또는 핵산들)을 세포이하(subcellular) 구획들(compartments)(즉 "도입하는(introducing)") 또는 세포들 내로 전달하기 위하여 또는 세포 구조체(즉, "접촉하는") 내로 넣기 위하여 본 발명에서 사용될 수 있는 임의의 전달 벡터가 의도된다. 그것은 리포솜의(liposomal) 전달 벡터들, 바이러스 전달 벡터들, 약물 전달 벡터들, 화학적(chemical) 담체들(carriers), 폴리머(polymeric) 담체들(carriers), 리포플렉스들(lipoplexes), 폴리플렉스들(polyplexes), 덴드라이머들(dendrimers), 마이크로버블들(microbubbles) (초음파조영제들(ultrasound contrast agent)), 나노입자들, 에멀전들 또는 다른 적합한 이동(transfer) 벡터들을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 전달 벡터들은 분자들, 케미컬들(chemicals), 마크로분자들(유전자들, 단백질들), 또는 Diatos에 의하여 개발된 펩타이드들, 플라스미드들과 같은 다른 벡터들의 전달을 가능하게 한다. 이들 케이스들에서, 전달 벡터들은 분자 담체들(carriers)이다. "전달 벡터" 또는 "전달 벡터들"에 의하여, 형질감염(transfection)을 수행하기 위한 전달 방법들이 의도된다.

[0404] - 용어 "벡터" 또는 "벡터들"은 그것이 연결(link)된 또다른 핵산을 수송하는(transport) 것이 가능한 핵산 분자를 가리킨다. 본 발명에서 "벡터"는 바이러스 벡터, 플라스미드, RNA 벡터 또는 선형 또는 원형(circular) DNA 또는 RNA 분자로, 염색체(chromosomal), 비 염색체, 반-합성 또는 합성 핵산들로 구성될 수 있는 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직한 벡터들은 자동(autonomous) 복제(replication) (에피솜(episomal)

벡터) 및/또는 그것들이 연결(link)되는 핵산들의 발현(발현 벡터들)이 가능한 그것들이다. 많은 적합한 벡터들이 당업계에 알려져 있고 상업적으로 이용가능하다.

[0406] 바이러스 벡터들은 레트로바이러스, 아데노바이러스 파코바이러스(예컨대, 아데노관련(adenoassociated) 바이러스들), 코로나바이러스, 오르소믹소바이러스(orthomyxovirus)와 같은 음성 가닥 RNA 바이러스들 (예컨대 인플루엔자 바이러스), 램도바이러스(rhabdovirus) 예컨대, 광견병 및 소포성 구내염 바이러스), 파라믹소바이러스(paramyxovirus) (예컨대, 홍역 및 센다이(Sendai), 알파바이러스(alphavirus) 및 피코르나바이러스(picornavirus)와 같은 양성 가닥 RNA 바이러스들, 및 헤르페스바이러스(예컨대, 단순포진(Herpes Simplex) 바이러스 타입들 1 및 2, 엡스타인(Epstein)-바(Barr) 바이러스, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus)), 아데노바이러스를 포함하는 이중-가닥의 DNA 바이러스들, 및 폭스바이러스(poxvirus)(예컨대, 우두(vaccinia), 계두(fowlpox) 및 카나리아두창(canarypox))을 포함한다. 다른 바이러스들은, 예를 들어, 노르윅(Norwalk) 바이러스, 토가바이러스(togavirus), 플라비바이러스(flavivirus), 레오바이러스들(reoviruses), 파포바바이러스(papovavirus), 헤파드나바이러스(hepadnavirus), 및 간염(hepatitis) 바이러스를 포함한다. 레트로바이러스들의 예들은 하기를 포함한다: 조류(avian) 백혈증(leukosis)-육종(sarcoma), 포유동물(mammalian) C-타입, B-타입 바이러스들, D 타입 바이러스들, HTLV-BLV 그룹, 렌티바이러스(lentivirus), 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).

[0408] - "렌티바이러스 벡터"에 의하여, 그것들의 상대적으로 큰 포장(packaging) 용량, 감소된 면역원성(immunogenicity) 및 큰 범위의 다른 세포 타입들에 높은 효율로 안정적으로 형질도입(transduce)하는 그것들의 능력 때문에 유전자 전달을 위하여 매우 유망한 HIV-기반의(Based) 렌티바이러스(lentiviral) 벡터들이 의도된다. 렌티바이러스 벡터들은 보통 생산자(producer) 세포들 내로 셋(포장, 껍질(envelope) 및 이동(transfer)) 또는 그보다 많은 플라스미드들의 일시적인(transient) 형질감염(transfection) 후 발생된다. HIV처럼, 렌티바이러스(lentiviral) 벡터들은 세포 표면 상 수용체들로 바이러스 표면 당단백질들과의 상호작용을 통하여 타겟 세포로 들어간다. 들어가면, 바이러스 RNA는 바이러스 역 전사효소(transcriptase) 복합체(complex)에 의하여 매개되는, 역전사를 겪는다. 역전사의 산물은 이중 가닥 선형 바이러스 DNA로, 이것은 감염된 세포들의 DNA에서 바이러스 통합(integration)을 위한 주형이다. "통합하는(integrative) 렌티바이러스(lentiviral) 벡터들 (또는 LV)"에 의하여, 제한되지 않는 예로서, 타겟 세포의 게놈에 통합될 수 있는 이러한 벡터들이 의도된다. "비(non) 통합하는(integrative) 렌티바이러스(lentiviral) 벡터들 (또는 NILV)"에 의하여 대조적으로, 바이러스 인테그라제(integrase)의 작용을 통하여 타겟 세포의 게놈으로 통합되지 않는 효과적인 유전자 전달 벡터들이 의미된다.

[0410] - 전달 벡터들 및 벡터들은 소노포레이션(sonoporation) 또는 전기천공법(electroporation) 또는 이들 기술들의 파생물들과 같은 임의의 세포 투과화(permeabilization) 기술들과 관련되거나 또는 조합될 수 있다.

[0412] - 세포 또는 세포들에 의하여 인 비트로(in vitro) 배양들을 위한 이들 생물들로부터 유래된 임의의 진핵 살아 있는 세포들, 일차(primary) 세포들 및 세포주들이 의도된다.

[0414] - "일차 세포" 또는 "일차 세포들"에 의하여, 연속적인 발암성(tumorigenic) 또는 인공적으로 불멸화된(immortalized) 세포주들과 비교할 때, 매우 적은 개체군(population) 배가들(doublings)을 겪어 왔고, 그러므로, 그것들이 유래된 것으로부터의 조직들의 특성 및 주된 기능적 요소들의 매우 대표적인, 살아 있는 조직 (즉 생체검사(biopsy) 물질)로부터 직접 취해지고 인 비트로에서 성장을 위하여, 확립(established)된 세포들이 의도된다.

[0416] 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.

[0418] 이들 세포주들 모두는, 관심있는 유전자 또는 a 단백질을 생산하고, 발현시키고, 수량화하고(quantify), 검출하고, 연구하기 위하여 세포주 모델들(models)을 제공하기 위하여 본 발명의 방법에 의하여, 변형될 수 있다: 이들 모델들은 또한 제한되지 않는 예들로서 케미칼, 바이오연료들, 치료법들(therapeutics) 및 농경학(agronomy)과 같은 다양한 영역들 및 생산 및 연구에서 관심있는 생물학적으로 활성인 분자들을 스크리닝하는데 사용될 수 있다.

[0420] - "돌연변이"에 의하여 폴리뉴클레오타이드 (cDNA, 유전자) 또는 폴리펩타이드 서열 내 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯, 일곱, 여덟, 아홉, 열, 열하나, 열둘, 열셋, 열넷, 열다섯, 스물, 스물다섯, 서른, 마흔, 쉰(fifty) 또는 그보다 많은 뉴클레오타이드들/아미노산들까지의 치환, 결실, 삽입이 의도된다. 돌연변이는 유전자의 코딩(coding) 서열 또는 그것의 조절(regulatory) 서열에 영향을 미칠 수 있다. 그것은 또한 코딩되는 mRNA의 구조/안정성 또는 게놈 서열의 구조에 영향을 미칠 수 있다.

[0422] - "변이체(들)"에 의하여, 그것은 부모(parent) 분자의 아미노산 서열 내 적어도 하나의 잔기의 돌연변이 또는 대체(replacement)에 의하여 수득되는 폴리펩타이드 변이체(variant), TALE-뉴클레아제 변이체, DNA 결합 변이체, 변이체, 반복 변이체가 의도된다.

[0424] - "기능적 변이체"에 의하여, 단백질 또는 단백질 도메인의 촉매반응적으로 활성인 돌연변이체가 의도된다; 이러한 돌연변이체는 그것의 부모 단백질 또는 단백질 도메인 또는 추가의 특성들, 또는 더 높은 또는 더 낮은 활성과 비교할 때 동일한 활성을 가질 수 있다.

[0426] - "유전자"에 의하여 특이적 단백질 또는 단백질의 부분(segment)을 코드하는, 염색체(chromosome)를 따라 선형 방식으로 배열되는 DNA의 부분으로 구성되는, 유전(heredity)의 기본 단위가 의미된다. 유전자는 보통 프로모터, 5' 비번역(untranslated) 영역, 하나 또는 그보다 많은 코딩(coding) 서열들 (엑손들(exons)), 선택적으로 인트론들(introns), 3' 비번역(untranslated) 영역을 포함한다. 유전자는 터미네이터(terminator), 인핸서들(enhancers) 및/또는 사일런서들(silencers)을 더 포함할 수 있다.

[0428] - 여기에서 사용된 대로, 용어 "위치(locus)"는 유전체 상 DNA 서열 (예컨대 유전자의) 특이적 물리적 위치이다. 용어 "위치(locus)"는 유전체 상 회귀-절단 엔도뉴클레아제 타겟 서열의 특이적 물리적 위치를 가리킬 수 있다. 이러한 위치(locus)는 본 발명에 따른 회귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 인식 및/또는 절단되는 타겟 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 관심있는 위치(locus)는 세포의 유전적 물질(즉, 유전체 내) 주요 부분(main body) 내 존재하는 핵산 서열 뿐 아니라, 또한 제한되지 않는 예들로서 미토콘드리아와 같은 세포소기관들 내 또는 플라스미드들, 에피솜들(episomes), 바이러스, 트랜스포존들(transposons) 과 같은, 유전적 물질의 상기 주요 부분에 독립적으로 존재할 수 있는 유전적 물질의 부분을 적합하게 할(qualify) 수 있다는 것이 이해된다.

[0430] - 용어 "엔도뉴클레아제(endonuclease)"는 DNA 또는 RNA 분자, 바람직하게는 DNA 분자 내 핵산들 사이에서 결합들의 가수분해(절단)를 촉매화할 수 있는 임의의 야생형 또는 변이체 효소를 가리킨다. 엔도뉴클레아제들은 그것의 서열에도 불구하고 DNA 또는 RNA 분자를 절단하지 않고, 그러나 특이적 폴리뉴클레오타이드 서열들에서 DNA 또는 RNA 분자를 인식하고 절단하고, "타겟 서열들" 또는 "타겟 위치들(sites)"로서 더 나타내어진다. 엔도뉴클레아제들(endonucleases)은, 전형적으로 12 염기쌍들(base pairs) (bp) 길이보다 더 큰, 더욱 바람직하게는 14-55 bp의, 폴리뉴클레오타이드 인식 위치(site)를 가질 때, 회귀-절단 엔도뉴클레아제들로서 분류될 수 있다. 회귀-절단 엔도뉴클레아제들은 정의된 위치(locus)에서 DNA 이중-가닥 손상들(breaks) (DSBs)을 의도함으로써

HR를 상당히 증가시킨다 (Rouet, Smih et al. 1994; Choulika, Perrin et al. 1995; Pingoud and Silva 2007). 회귀-절단 엔도뉴클레아제들은 귀소(homing) 엔도뉴클레아제 (Paques and Duchateau 2007), FokI와 같은 제한효소의 촉매적 도메인의 조작된 징크-핑거 도메인들의 융합으로부터 야기되는 키메라(chimeric) 징크(Zinc)-핑거(Finger) 뉴클레아제 (ZFN) (Porteus and Carroll 2005) 또는 화학적(chemical) 엔도뉴클레아제 (Eisenschmidt, Lanio et al. 2005; Arimondo, Thomas et al. 2006)일 수 있다. 화학적 엔도뉴클레아제들에서, 화학적 또는 펩타이드 절단자(cleaver)는 특이적 타겟 서열을 인식하는 또다른 DNA에 또는 핵산들의 폴리머에 콘주게이트(conjugate)된다. 화학적 엔도뉴클레아제들은 또한 특이적 DNA 서열들에 결합하는 것으로 알려진 (Kalish and Glazer 2005), 트리플렉스(triplex)-형성(forming) 올리고뉴클레오타이드들(oligonucleotides) (TFOs), DNA 절단(cleaving) 분자 및 오르소페난트롤린(orthophenanthroline)의 콘주게이트들과 같은 합성 뉴클레아제들을 포함한다. 이러한 화학적 엔도뉴클레아제들은 본 발명에 따른 용어 "엔도뉴클레아제" 내 포함된다.

[0432] 회귀-절단 엔도뉴클레아제들은 또한 예를 들어 잔토모나스(Xanthomonas) 속(genus)의 식물 병원체들(pathogens)에 의하여 감염 공정에 사용되는 단백질들의 패밀리, 전사(Transcription) 액티베이터(Activator) 유사(Like) 이펙터(Effector) (TALE)로부터 유래된 DNA 결합 도메인 및 FokI 촉매적 도메인을 이용한 키메라 뉴클레아제들의 신규 클래스, TALE-뉴클레아제들일 수 있다(Boch, Scholze et al. 2009; Moscou and Bogdanov 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al.). FokI-기반의 TALE-뉴클레아제 (TALE-nuclease)의 기능적 레이어아웃은 TALE 도메인에 의하여 대체되는 징크-핑거 DNA 결합 도메인으로, ZFN의 그것이 필수적이다. 이와 같이, TALE-뉴클레아제에 의한 DNA 절단(cleavage)은 비특이적 중앙(central) 영역의 측면에 있는(flanking) 두 개의 DNA 인식 영역들을 요구한다. 본 발명에서 포함되는 회귀-절단 엔도뉴클레아제들은 또한 TALE-뉴클레아제들로부터 유래될 수 있다.

[0434] 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 귀소(homing) 엔도뉴클레아제일 수 있고, 메가뉴클레아제(meganuclease) 명칭으로 또한 알려져 있을 수 있다. 이러한 귀소(homing) 엔도뉴클레아제들은 당업계에 잘 알려져 있다(Stoddard 2005). 귀소(homing) 엔도뉴클레아제들은 DNA 타겟 서열을 인식하고 단일- 또는 이중-가닥 손상(break)을 만든다. 귀소(homing) 엔도뉴클레아제들은 매우 특이적이고, 12 부터 45 까지의 염기쌍들 (bp) 길이의 범위의, 보통 14 부터 40 까지의 bp 길이의 범위의 DNA 타겟 위치들(sites)을 인식한다. 본 발명에 따른 귀소(homing) 엔도뉴클레아제는 예를 들어 LAGLIDAG 엔도뉴클레아제에, HNH 엔도뉴클레아제에, 또는 GIY-YIG 엔도뉴클레아제에 부합한다 (correspond). 본 발명에 따른 선호되는 귀소(homing) 엔도뉴클레아제는 I-CreI 변이체일 수 있다.

[0436] - "TALE-뉴클레아제(nuclease)" (TALEN) 에 의하여, 전사(Transcription) 액티베이터(Activator) 유사(Like) 이펙터(Effector) (TALE)로부터 전형적으로 유래된 핵산-결합 도메인 및 핵산 타겟 서열을 절단하기 위한 하나의 뉴클레아제 촉매적 도메인으로 구성되는 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 예에서, TALE 도메인은 예를 들어 I-CreI 및 I-OnuI 와 같은 메가뉴클레아제(meganuclease) 또는 그것의 기능적 변이체에 융합될 수 있다. 더욱 바람직한 예에서, 상기 뉴클레아제는 모노머(monomeric) TALE-뉴클레아제이다. 모노머 TALE-뉴클레아제는, WO2012138927에 기재된 I-TevI의 촉매적 도메인과, 조작된 TAL 반복들(repeats)의 융합들과 같은, 특이적 인식 및 절단(cleavage)을 위한 이합체화를 요구하지 않는 TALE-뉴클레아제이다. 전사(Transcription) 액티베이터(Activator) 유사(like) 이펙터(Effector) (TALE)은 수많은 반복된 서열들을 포함하는, 각각의 반복은 핵산 타겟된 서열의 각 뉴클레오타이드 염기에 특이적인 위치 12 및 13 (RVD)에서 두(di)-잔기를 포함하는, 박테리아 종들 잔토모나스(Xanthomonas)로부터의 단백질들이다. 비슷한(similar) 모듈식(modular) 염기(base)-당(per)-염기(base) 핵산(nucleic acid) 결합(binding) 특성들(properties) (MBBBD)을 갖는 결합 도메인들은 또한 다른 박테리아 종들에서 본 출원인에 의하여 최근 발견된 신규 모듈식 단백질들로부터 유래될 수 있다. 신규 모듈식(modular) 단백질들은 TAL 반복들(repeats) 보다 더 서열 변동성(variability)을 보이는 이점을 갖는다. 바람직하게는, 다른 뉴클레오타이드들의 인식과 관련된 RVD 들은 C를 인식하기 위한 HD, T를 인식하기 위한 NG, A를 인식하기 위한 NI, G 또는 A를 인식하기 위한 NN, A, C, G 또는 T를 인식하기 위한 NS, T를 인식하기 위한 HG, T를 인식하기 위한 IG, G를 인식하기 위한 NK, C를 인식하기 위한 HA, C를 인식하기 위한 ND, C를 인식하기 위한 HI, G를 인식하기 위한 HN, G를 인식하기 위한 NA,

G 또는 A를 인식하기 위한 SN 및 T를 인식하기 위한 YG, A를 인식하기 위한 TL, A 또는 G를 인식하기 위한 VT 및 A를 인식하기 위한 SW이다. 또다른 예에서, 중요한 아미노산들 12 및 13 은 뉴클레오타이드들 A, T, C 및 G 에 향한 그것들의 특이성을 조절하기 위하여, 그리고 특히 이 특이성을 증강시키기 위하여(enhance), 다른 아미노산 잔기들을 향하여 돌연변이될 수 있다. TALE-뉴클레아제는 이미 기재되어 왔으며, 유전자 타겟팅 및 유전자 변형들을 자극하는데 사용되어 왔다 (Boch, Scholze et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al.). 조작된 TAL-뉴클레아제들은 상표 TALENTM 하 상업적으로 이용가능하다(Collectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 Paris, France).

[0438] - 용어 "절단(cleavage)"은 폴리뉴클레오타이드의 공유적(covalent) 백본(backbone)의 파손(breakage)을 가리킨다. 절단은 포스포다이에스터(phosphodiester) 결합의 효소적 또는 화학적 가수분해를 포함하나, 이에 제한되지 않는 여러가지 방법들에 의하여 시작될 수 있다. 단일-가닥의 절단(cleavage) 및 이중-가닥의 절단(cleavage) 모두 가능하며, 그리고 이중-가닥의 절단은 두 개의 구별되는(distinct) 단일-가닥의 절단(cleavage) 이벤트들의 결과로서 발생할 수 있다. 이중 가닥의 DNA, RNA, 또는 DNA/RNA 혼성(hybrid) 절단은 뭉툭한(blunt) 말단(ends)들 또는 흔들거리는(staggered) 말단들의 생산을 야기할 수 있다.

[0440] - "융합 단백질"에 의하여 분리된 단백질들 또는 그것들의 부분을 원래 코딩하는 둘 또는 그보다 많은 유전자들의 연결(joining)로 구성되는 당업계에 잘 알려진 공정의 결과, 원래 단백질들의 각각으로부터 유래하는 기능적 특성들을 갖는 단일 폴리펩타이드를 야기하는 상기 "융합(fusion) 유전자"의 번역이 의도된다.

[0442] - "동일성(identity)"은 두 개의 핵산 분자들 또는 폴리펩타이드들 사이의 서열 동일성(identity)을 가리킨다. 동일성은 비교의 목적으로 정렬될 수 있는 각각의 서열 내 위치(position)를 비교함으로써 결정될 수 있다. 비교되는 서열 내 위치(position)가 동일한 염기에 의하여 점유될 때, 그 때 분자들은 그 위치에서 동일(identical)하다. 핵산 또는 아미노산 서열들 사이의 유사성(similarity) 또는 동일성(identity) 정도는 핵산 서열들에 의하여 공유되는 위치들에서의 동일하거나(identical) 또는 매칭(matching)되는 뉴클레오타이드들의 수의 작용이다. GCG 서열 분석 패키지의 부분으로서 이용가능한 BLAST 또는 FASTA를 포함하는(University of Wisconsin, Madison, Wis.) 다양한 정렬 알고리즘들 및/또는 프로그램들이 두 서열들 사이의 동일성(identity)을 계산하기 위하여 사용될 수 있고, 예컨대, 디폴트(default) 세팅과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 여기에 기재된 특이적 폴리펩타이드들에 적어도 70%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일성(identity)를 갖고, 바람직하게는 상당히 동일한 기능들을 보이는 폴리펩타이드들과 이러한 폴리펩타이드들을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 고려된다.

[0444] - "유사성(similarity)"은 둘 또는 그보다 많은 폴리펩타이드들의 아미노산 서열들 사이의 관계를 기재한다. BLASTP는 또한 BLOSUM45, BLOSUM62 또는 BLOSUM80과 같은 유사성(similarity) 매트릭스를 이용한 참조(reference) 아미노산 서열에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 87.5%, 90%, 92.5%, 95%, 97.5%, 98%, 99% 서열 유사성(similarity)을 갖는 아미노산 서열을 확인(identify)하는데 사용될 수 있다. 다르게 표시하지 않는다면, 유사성(similarity) 점수는 BLOSUM62의 사용에 기초할 것이다. BLASTP가 사용될 때, 퍼센트 유사성(similarity)은 BLASTP 양성들(positives) 점수(score)에 기초하고, 그리고 퍼센트 서열 동일성(identity)은 BLASTP 동일성들(identities) 점수에 기초한다. BLASTP "동일성들(identities)"는 동일한, 높은 점수의 서열 쌍들 내 전체 잔기들의 부분(fraction) 및 수를 보여준다; 그리고 BLASTP "양성들(positives)"은 정렬 점수들이 양성 값들을 갖고 서로 유사한 잔기들의 부분(fraction) 및 수를 보여준다. 여기에 공개된 아미노산 서열들에 임의의 중간 정도의 유사성(similarity)의 동일성(identity) 또는 이들 정도의 동일성(identity) 또는 유사성(similarity)을 갖는 아미노산 서열들이 고려되고 이 공개에 포함된다. 유사한 폴리펩타이드들의 폴리뉴클레오타이드 서열들이 유전(genetic) 코드(code)를 이용하여 추정되고, 종래 수단으로서 수득될 수 있다. 예를 들어, pT알파(pTalpha)의 기능적 변이체(variant)는 서열번호 : 107의 아미노산 서열에 70%, 75%, 80%, 85%, 87.5%, 90%, 92.5%, 95%, 97.5%, 98%, 99% 서열 유사성(similarity)를 가질 수 있다. 이러한 기능적 변이체들을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 유전 코드를 이용하여 그것의 아미노산 서열을 역번역함으로써 생산될 것이다.

- [0446] - "신호전달 도메인" 또는 "공-자극 리간드"는 T-세포 상 유사한(cognate) 공-자극 분자에 특이적으로 결합하여, 예를 들어, 펩타이드가 로딩(load)된 MHC 분자로 TCR/CD3 복합체의 결합에 의하여, 제공되는 일차(primary) 신호에 추가로, 증식, 활성화, 분화 등을 포함하나 이에 제한되지 않는, T 세포 반응을 매개하는, 신호를 제공하는, 항원 제시 세포 상 분자를 가리킨다. 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, 작용제(agonist) 또는 Toll 리간드 수용체에 결합하는 항체 및 B7-H3와 특이적으로 결합하는 리간드를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 공-자극 리간드는 또한, 그 중에서도, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능(function)-관련(associated) 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, CD83에 특이적으로 결합하는 리간드와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, T 세포 상 존재하는 공-자극 분자와 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다.
- [0448] "공-자극 분자"는 공-자극 리간드에 특이적으로 결합하여, 증식과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, 세포에 의한 공-자극 반응을 매개하는, T 세포 상 유사한(cognate) 결합 파트너를 가리킨다. 공-자극 분자들은 HC 클래스(class) I 분자, BTLA 및 Toll 리간드 수용체를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0450] 여기에 기재된 대로 "공-자극 신호"는 TCR/CD3 라이게이션(ligation)과 같은 일차 신호와 조합하여, 주요(key) 분자들의 상향조절 또는 하향조절 및/또는 T 세포 증식을 이끄는 신호를 가리킨다.
- [0452] - "이중특이성(bispecific) 항체"는 단일 항체 분자 내 두 개의 다른 항원들을 위한 결합 위치(sites)를 갖는 항체를 가리킨다. 기본(canonical) 항체 구조에 추가하여, 다른 분자들은 두 개의 결합 특이성을 갖도록 건설될 수 있다는 것이 당업자에게 인정될 것이다. 나아가, 이중특이성 항체들에 의하여 항원 결합이 동시에 또는 순차적(sequential)일 수 있다는 것이 인정될 것이다. 이중특이성 항체들은 모두 그 자체가 잘 알려진, 화학 기술들(예컨대, Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5807), by "polydome" techniques (See U.S. Pat. No. 4,474,893 참조)에 의하여, "폴리도마(polydome)" 기술에 의하여(U.S. Pat. No. 4,474,893 참조) 또는 재조합 DNA 기술들에 의하여, 생산될 수 있다. 제한되지 않는 예로서, 각각의 결합 도메인은 항체 중(heavy) 사슬로부터 적어도 하나의 가변(variable) 영역 ("VH 또는 H 영역")을 포함하는데, 이때, 첫 번째 결합 도메인의 VH 영역은 CD3와 같은 림프구 마커(marker)에 특이적으로 결합하고, 두 번째 결합 도메인의 VH 영역은 중앙 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0454] - 여기에 사용된 용어 "세포외(extracellular) 리간드-결합 도메인"은 리간드에 결합할 수 있는 올리고- 또는 폴리펩타이드로 정의된다. 바람직하게는, 그 도메인은 세포 표면 분자와 상호작용할 수 있을 것이다. 예를 들어, 세포외 리간드-결합 도메인은 특정 질병 상태와 관련된 타겟 세포들 상 세포 표면 마커(marker)로서 작용하는 리간드를 인식하기 위하여 선택될 수 있다. 이런 식으로 리간드들로서 작용할 수 있는 세포 표면 마커들의 예들은 바이러스, 박테리아 및 기생충(parasitic) 감염들, 자가면역 질환 및 암세포들과 관련된 그것들을 포함한다.
- [0456] 여기에 사용된 용어 "대상(subject)" 또는 "환자"는 비-인간 영장류들 및 인간들을 포함하는 동물 계(kingdom)의 모든 멤버들을 포함한다.
- [0458] 본 발명의 상기 기술한 기재는 그것을 이용하고 만드는 공정 및 방식을 제공하여, 당업자는 원래의 명세서의 부분을 형성하는 첨부된 특허청구범위의 주제를 위하여 특히 제공되는 이 실시가능성(enablement), 동일한 것을 만들고 이용할 수 있다.
- [0460] 수치 한정 또는 범위가 여기에서 언급될 때 그 종점(endpoint)들도 포함된다. 또한 수치 한정 또는 범위 내 모

든 값들 및 부분범위(subrange)들은 명확하게 작성된 것처럼 특이적으로 포함된다.

[0462] 상기 기재는 당업자가 본 발명을 만들고 이용하기 위하여 제시되며, 특정 출원의 내용 및 그것의 요구사항들 내에서 제공된다. 선호되는 예들에 대한 다양한 변형들은 당업자에게 쉽게 분명하며, 여기에 정의된 일반 원칙들은 본 발명의 범위 및 주제로부터 벗어나지 않고 출원들 및 다른 예들에 적용될 수 있을 것이다. 이런 식으로, 이 발명은 보여진 예들에 제한되는 것으로 의도되지 않고, 여기에 공개된 특징들 및 원칙들과 일치하는 가장 넓은 범위에 따를 것이다.

[0464] 이 발명은 일반적으로 기재하는 것, 추가의 이해는 특정 특이적 실시예들을 참조하여 수득될 것인데, 이는 설명의 목적만으로 여기에 제공되는 것이며, 다르게 특정하지 않는 한 제한되는 것으로 의도되지 않는다.

[0466] 실시예들

[0467] 실시예 1: 인간 GR 유전자를 절단하는 TALE-뉴클레아제들

[0468] 인간 GR 유전자의 엑손들을 타겟팅하는 여섯 개의 헤테로다이머인(heterodimeric) TALE-뉴클레아제들이 디자인되고 생산되었다. 하기 표 2는 각각의 TALE-뉴클레아제에 의하여 절단되는 타겟 서열들을 가리킨다. GR TALE-뉴클레아제는 두 개의 독립적인 독립체들(entities) (반(half) TALE-뉴클레아제들이라고 불림)을 포함하는데, 각각은 15-bp 스페이스(spacer)에 의하여 분리된 2 개의 17-bp 길이 서열들 (반(half) 타겟들이라고 불림)로 구성되는 GR 타겟 서열들에 결합되고 절단하도록 조작된 반복 서열을 포함한다.

표 2

| 타겟 명칭 | 타겟 서열 | 반복 서열 | 반(Half) TALE-뉴클레아제 서열 |
|---------|---|---------------------------------------|-------------------------------|
| GRex2 | TATCACTGATGGACTC caaagaatcattaac TCCTGGTAGAGAAGAAA (서열번호: 1) | Repeat GRex2-LPT9-L1 (서열번호: 7) | GRex2-L TALEN (서열번호: 19) |
| | | Repeat -GRex2-LPT9-R1 (서열번호: 8) | GRex2-R TALEN (서열번호: 20) |
| GRex3T2 | TGCCTGGTGTGCTCTGA tgaagcttcaggatg TCATTATGGAGTCTTAA (서열번호: 2) | Repeat -GRex3T2-L1 (서열번호: 9) | GRex3T2-L TALEN (서열번호: 21) |
| | | Repeat -GRex3T2-R1 (서열번호: 10) | GRex3T2-R TALEN (서열번호: 22) |
| GRex3T4 | TGCTCTGATGAAGCTTC aggatgtcattatgg AGTCTTAACCTGTGGAA (서열번호: 3) | Repeat -GRex3T4-L1 (서열번호: 11) | GRex3T4-L TALEN (서열번호: 23) |
| | | Repeat -GRex3T4-R1 (서열번호: 12) | GRex3T4-R TALEN (서열번호: 24) |
| GRex5T1 | TGGTGCTCACTGTTGGAG gttattgaacctgaa GTGTTATATGCAGGATA (서열번호: 4) | Repeat -GRex5T1-LPT8-L1 (서열번호: 13) | GRex5T1-L TALEN (서열번호: 25) |
| | | Repeat -GRex5T1-LPT8-R1 (서열번호: 14) | GRex5T1-R TALEN (서열번호: 26) |
| GRex5T2 | TATGATAGCTCTGTTCC agactcaacttgag GATCATGACTACGCTCA (서열번호: 5) | Repeat -GRex5T2-L1 (서열번호: 15) | GRex5T2-L TALEN (서열번호: 27) |
| | | Repeat GRex5T2-R1 (서열번호: 16) | GRex5T2-R TALEN (서열번호: 28) |
| GRex5T3 | TTATATGCAGGATATGA tagctctgttccaga CTCAACTGGAGGATCA (서열번호: 6) | Repeat -GRex5T3-L1 (서열번호: 17) | GRex5T3-L TALEN (서열번호: 29) |
| | | Repeat -GRex5T3-R1 (서열번호: 18) | GRex5T3-R TALEN (서열번호: 30) |

[0470]

[0471] 표 2:인간 GR 유전자 내 TALE-뉴클레아제들 타겟 위치들(sites)의 서열들 및 GR TALE-뉴클레아제들의 기재.

[0473] 반복 및 N-말단, C-말단 도메인들의 아미노산 서열들은 AvrBs3 TALE (참조: GenBank: X16130.1)에 기초한다. C-말단 및 N-말단 도메인들은 두 개의 BsmBI 제한 자리들에 의하여 분리된다. 원하는 서열들 (서열번호: 1 내지 6)을 타겟팅하는 반복(repeat) 어레이들(arrays) (서열번호: 7 내지 18)은 연이은(consecutive) 제한(restriction)/라이게이션(ligation)/세척(washing) 단계들을 포함하는 고체 지지 방법을 이용하여 합성되었다 (International PCT application W02013/017950). 간단히 말해서, 첫 번째 블록(block)(이(di)-반복(repeat)을 코드함)은 비오틴(biotin)/스트렙타비딘(streptavidin) 상호작용을 통하여 고체 지지대 상에 고정되었고, 두 번째 블록(삼(tri)-반복(repeat))은 그 때 첫 번째 것에 라이게이션되었고, SfaNI 소화(digestion) 후 세 번째 블록(삼(tri)-반복(repeat))이 커플링되었다. 그 공정은 원하는 반복 어레이를 얻는데(upon) 삼(tri)- 또는 이(di)-반복(repeat) 블록들(blocks)을 사용하여 반복되었다. 산물은 E. coli에서의 증폭을 위하여 전통적인 pAPG10 클로닝 플라스미드 내에서 그 때 클로닝되었고 시퀀싱되었다. 그러므로 수득된 반복 어레이 서열들이 삽입된 반복 서열을 위하여 플라스미드 및 BbvI 및 SfaNI 를 받기 위하여 타입 IIS 제한 효소들 BsmBI를 이용하여 효모(yeast) 발현 TALE 벡터에서 서브클로닝되었다. FokI 제한 효소의 촉매적 도메인에 융합된 TALE 유래 DNA 결합 도메인을 포함하는, 반(half) TALE-뉴클레아제를 코드하는 DNA는 E. coli에서 증폭되었고, 표준 미니프렙(miniprep) 기술들에 의하여 회수되었고 그리고 삽입물(insert)의 온전성을 평가하기 위하여 시퀀싱되었다.

[0475] 효모 내 TALE-뉴클레아제들의 활성:

[0476] 여섯 개의 GR-TALE-뉴클레아제들의 뉴클레아제 활성이, 서열번호: 1 내지 6을 야기하는 15 bp 들의 스페이서(spacer)에 의하여 분리된 DNA 가닥 상 서로 마주보는 두 개의 TALE 타겟 서열들을 포함하는 타겟들 상에서, 전술된 우리의 효모 SSA 어세이에서 37 °C 및 30 °C에서 테스트되었다(International PCT Applications WO 2004/067736 and in (Epinat, Arnould et al. 2003; Chames, Epinat et al. 2005; Arnould, Chames et al. 2006; Smith, Grizot et al. 2006). TALE-뉴클레아제 DNA 타겟 서열들을 포함하는 모든 효모 타겟 리포터(reporter) 플라스미드들이 전술한 바와 같이 건설되었다(International PCT Applications WO 2004/067736 and in (Epinat, Arnould et al. 2003; Chames, Epinat et al. 2005; Arnould, Chames et al. 2006; Smith, Grizot et al. 2006). 타겟들 상 개개의 클론들의, 효모에서의 TALE-뉴클레아제 절단(cleavage) 활성 레벨들이 표 3에 나타나 있다.

표 3

| 타겟 | 형질감염된 반(Half) TALE-뉴클레아제 | 효모 gal37°C | 효모 gal30°C |
|---------|-----------------------------|------------|------------|
| GRex2 | GRex2-L TALEN | 1 | 1 |
| | GRex2-R TALEN | | |
| GRex3T2 | GRex3T2-L TALEN | 0,92 | 0,87 |
| | GRex3T2-R TALEN | | |
| GRex3T4 | GRex3T4-L TALEN | 0,94 | 0,87 |
| | GRex3T4-R TALEN | | |
| GRex5T1 | GRex5T1-L TALEN | 0,48 | 0,36 |
| | GRex5T1-R TALEN | | |
| GRex5T2 | GRex5T2-L TALEN | 0,97 | 0,91 |
| | GRex5T2-R TALEN | | |
| GRex5T3 | GRex5T3-L TALEN | 1 | 0,98 |
| | GRex5T3-R TALEN | | |

[0478]

[0479] 값들은 0 및 1 사이에 포함된다. 최대 값은 1이다.

- [0480] 표 3: 효모에서 GR TALE-뉴클레아제들의 절단 활성.
- [0482] HEK293 세포들에서 GR TALE-뉴클레아제들의 활성:
- [0483] 각각의 TALE-뉴클레아제 구조체(construct)는 pEF1알파(alpha) 길이 프로모터의 통제 하 포유류 발현 벡터에서 제한 효소 소화를 이용하여 서브클로닝되었다.
- [0485] 백만 HEK293 세포들이 형질감염(transfection) 하루 전 시딩(seed)되었다. 제조업자의 지시들에 따라 25 μ L의 리포펙타민(lipofectamine)(Invitrogen)을 이용하여 EF1알파(alpha) 프로모터의 통제 하 GR 유전자 내 관심있는 두 개의 반(half) 타겟들 게놈 서열들을 인식하는, GRex2, GRex3T2, GRex3T4, GRex5T1, GRex5T2 또는 GRex5T3 TALE-뉴클레아제의 왼쪽 및 오른쪽 반(half)을 코딩하는 두 개의 플라스미드들 각각의 2.5 μ g으로 공-형질감염(co-transfected)되었다. 대조군으로서, 세포들은 EF1알파(alpha) 프로모터의 통제 하 T-세포 수용체 알파 불변(constant) 사슬 영역 (TRAC_T01) 타겟 위치 ((TRAC_T01-L 및 -R TALE-뉴클레아제 (서열번호: 41 및 서열번호: 42, TRAC_T01 타겟 위치 (서열번호: 37))를 타겟팅하는 TALE-뉴클레아제들의 왼쪽 및 오른쪽 반(half)을 코딩하는 두 개의 플라스미드들 중 각각의 2.5 μ g으로 공-형질감염(co-transfected)되었다. GR 코딩 서열 내 TALE-뉴클레아제들에 의하여 생기는 이중 가닥 손상(break)은 비상동(non homologous) 말단(end) 연결(joining) (NHEJ)을 유도하는데, 이는 에러(error)-프론(prone) 메커니즘이다. TALE-뉴클레아제들의 활성은 타겟된 게놈 위치들의 결실 또는 삽입들의 빈도에 의하여 측정된다.
- [0487] 형질감염(transfection) 2 또는 7 일 후, 세포들이 수확되었고, 하기 프라이머들을 이용하여 추출된 게놈 DNA에 위치(locus) 특이적 PCR들이 수행되었다: 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3' (포워드(forward) 어댑터(adaptator) 서열)- 10N (TAG)- 위치(locus) 특이적 포워드(forward) 서열 GR 엑손 2를 위하여: 5'-GGTTCATTAAACAAGCTGCC-3' (서열번호: 31), GR 엑손 3를 위하여: 5'-GCATTCTGACTATGAAGTGA-3' (서열번호: 32) 및 GR 엑손 5를 위하여: 5'-TCAGCAGGCCACTACAGGAGTCTCACAAG-3' (서열번호: 33) 및 역(reverse) 프라이머 5'-CCTATCCCCTGTGTGCTTGGCAGTCTCAG-3' (역(reverse) 어댑터(adaptor) 서열)- 위치(locus) 특이적 리버스(reverse) 서열 GR 엑손 2를 위하여: 5'-AGCCAGTGAGGGTGAAGACG-3' (서열번호: 34), GR 엑손 3를 위하여: 5'-GGGCTTTGCATATAATGGAA-3' (서열번호: 35) 및 GR 엑손 5를 위하여: 5'-CTGACTCTCCCTTCATAGTCCCAGAAC-3' (서열번호: 36).
- [0489] PCR 산물들은 454 시퀀싱 시스템 (454 Life Sciences)에 의하여 시퀀싱되었다. 거의 10,000 서열들이 PCR 산물당 수득되었고 그때 위치(site)-특이적 삽입 또는 결실 이벤트들의 존재가 분석되었다. 표 4는 샘플 내 서열들의 총 수 중 TALE-뉴클레아제 타겟 위치에서 삽입들 또는 결실들을 보이는 서열들의 퍼센트를 나타낸다. 표 4에 대표 실험의 결과들인 GRex2, GRex3T2 및 GRex3T4 가 리스트되어 있다.
- [0491] 테스트된 모든 케이스들에서, 돌연변이생성(mutagenesis)의 %는 형질감염(transfection) 2 일 후 샘플의 그것에 비교할 때 7 일에서 유사하였다. 돌연변이유발성(mutagenic) 이벤트들의 특성 또한 분석되었는데, 삽입들에 비교한 모든 케이스들에서 결실들이 가장 많다는 것을 보였다.

표 4

| 타겟 | GR TALE-뉴클레아제 형질감염 2 일에서 % 삽입-결실들(Indels) | GR TALE-뉴클레아제 형질감염 7 일에서 % 삽입-결실들(Indels) | TRAC_T01 TALE- 뉴클레아제 대조군 형질감염 2 일에서 % 삽입-결실들(Indels) |
|---------|---|---|---|
| GRex2 | 20.3 | 24.9 | 0.5 |
| GRex3T2 | 9.3 | 9.8 | 0 |
| GRex3T4 | 19 | 18.3 | 0.0 |
| GRex5T1 | 11.2 | NA | 0.7 |
| GRex5T2 | 3.4 | NA | 0 |
| GRex5T3 | 8.3 | NA | 0 |

[0493]

[0494]

표 4: HEK293 세포들에서 내생(endogenous) TALE-뉴클레아제 타겟 위치들에서 타겟된 돌연변이생성 (mutagenesis)의 퍼센트.

[0496]

일차(primary) T 림프구들 내 GR TALE-뉴클레아제들의 활성:

[0497]

각각의 TALE-뉴클레아제 구조체는 T7 프로모터의 통제 하 발현 벡터에서 제한 효소 소화를 이용하여 서브클로닝 되었다.

[0499]

GR 게놈 서열들을 절단하는(cleaving) TALE-뉴클레아제들을 코딩하는 mRNA가 T7 프로모터로부터 다운스트림 코딩 서열들을 운반하는 각각의 플라스미드로부터 합성되었다. 말초 혈액으로부터 분리된 T 림프구들이 항-CD3/CD28 액티베이터(activator) 비드들 (Life technologies)을 이용하여 5 일 동안 활성화되었고, 5 백만 세포들이 CytoLVT-P instrument (BTX-Harvard apparatus)을 이용하여 반(half) TALE-뉴클레아제들 둘 다를 코딩하는 2 mRNA들 각각의 10 µg으로 전기천공법(electroporation)에 의하여 형질감염(transfect)되었다. CD52 유전자를 타겟팅하는 반(half) TALE-뉴클레아제들 둘 다를 코딩하는 2 mRNA들(CD52_T02-L 및 -R TALEN (서열번호: 55 및 56)의 각각의 10 µg로 형질감염(transfect)된 T 세포들, 타겟 서열 CD52_T02 서열번호: 40)은 대조군으로서 이용된다.

[0501]

형질감염(transfection) 3 및 7 일 후, 게놈 DNA 가 형질감염된 세포들로부터 분리되었고, 전술한 프라이머들을 이용하여 위치(locus) 특이적 PCR들이 수행되었다. PCR 산물들은 454 시퀀싱 시스템 (454 Life Sciences)에 의하여 시퀀싱되었다. 거의 10,000 서열들이 PCR 산물 당 수득되었고, 그때 위치(site)-특이적 삽입 또는 결실 이벤트들의 존재가 분석되었다; 결과들은 표 5에 있다.

표 5

| 타겟 | GR TALE-뉴클레아제 형질감염 3 일에서 % 삽입-결실들(Indels) | GR TALE- 뉴클레아제 형질감염 7 일에서 % 삽입-결실들(Indels) | CD52 TALE-뉴클레아제 대조군 형질감염 3 일에서 % 삽입- 결실들(Indels) |
|---------|---|--|---|
| GRex2 | 26.2 | 30.7 | 0.7 |
| GRex3T2 | 1.09 | 0.86 | 0.02 |
| GRex3T4 | 6.3 | 6.93 | 0 |
| GRex5T1 | 0.04 | 0.035 | 0.05 |
| GRex5T2 | 1.3 | 1.0 | 0.22 |
| GRex5T3 | 17.4 | NA | 0.41 |

[0503]

[0504]

표 5: 일차(primary) T 림프구들의 내생(endogenous) TALE-뉴클레아제 타겟 위치(sites)들에서 타겟된 돌연변

이생성(mutagenesis)의 퍼센트.

[0506] 실시예 2: 인간 CD52 유전자, 인간 T-세포 수용체 알파 불변(constant) 사슬 (TRAC) 및 인간 T-세포 수용체 베타 불변(constant) 사슬들 1 및 2 (TRBC)을 절단하는 TALE-뉴클레아제들.

[0508] 실시예 1에서 기재한 바와 같이, 각각 CD52, TRAC 및 TRBC 유전자들을 타겟팅하는 헤테로다имер인 (heterodimeric) TALE-뉴클레아제들이 디자인되었고 생산되었다. 타겟된 게놈 서열들은 11 또는 15-bp 스페이스 (spacer)에 의하여 분리된 두 개의 17-bp 길이 서열들 (반(half) 타겟들이라 불림)으로 구성된다. 각각의 반 (half)-타겟은 표 6에 리스트된 반(half) TALE-뉴클레아제들의 반복들에 의하여 인식된다. 인간 게놈은 두 개의 기능적 T-세포 수용체 베타 사슬들 (TRBC1 및 TRBC2)을 포함한다. 알파/베타 T 림프구들의 발달 동안, 이들 두 불변(constant) 사슬들 중 하나는 TCR-베타의 가변(variable) 영역으로 이어지고(splice) 기능적 전장 베타 사슬을 형성하기 위하여, 각각의 세포에서 선택된다. 2 TRBC 타겟들은 TRBC1 및 TRBC2 사이의 보존된(conserved) 서열들에서 선택되었고, 그래서 대응하는(corresponding) TALE-뉴클레아제는 동시에 TRBC1 및 TRBC2 둘 다를 절단할 것이다.

표 6

| 타겟 | 타겟 서열 | 반복 서열 | 반(Half) TALE-뉴클레아제 |
|----------|---|---------------------------------|--------------------------------|
| TRAC_T01 | TTGTCCACAGATATCC Agaacctgacctg CCGTGTACCAGCTGAGA (서열번호: 37) | Repeat TRAC_T01-L (서열번호: 41) | TRAC_T01-L TALEN (서열번호: 49) |
| | | Repeat TRAC_T01-R (서열번호: 42) | TRAC_T01-R TALEN (서열번호: 50) |
| TRBC_T01 | TGTGTTTGAGCCATCAG aagcagagatctccc ACACCCAAAAGGCCACA (서열번호: 38) | Repeat TRBC_T01-L (서열번호: 43) | TRBC_T01-L TALEN (서열번호: 51) |
| | | Repeat TRBC_T01-R (서열번호: 44) | TRBC_T01-R TALEN (서열번호: 52) |
| TRBC_T02 | TTCCACCCGAGGTCGC tgtgtttgagccatca GAAGCAGAGATCTCCCA (서열번호: 39) | Repeat TRBC_T02-L (서열번호: 45) | TRBC_T02-L TALEN (서열번호: 53) |
| | | Repeat TRBC_T02-R (서열번호: 46) | TRBC_T02-R TALEN (서열번호: 54) |
| CD52_T02 | TTCCTCCTACTACCAT cagcctcctggttat GGTACAGGTAAGAGCAA (서열번호: 40) | Repeat CD52_T02-L (서열번호: 47) | CD52_T02-L TALEN (서열번호: 55) |
| | | Repeat CD52_T02-R (서열번호: 48) | CD52_T02-R TALEN (서열번호: 56) |

[0510]

[0511] 표 6: 인간 대응하는 유전자들에서 TALE-뉴클레아제들 타겟 위치(sites)들의 서열들 및 CD52, TRAC 및 TRBC TALE-뉴클레아제들의 기재.

[0513] TRAC 및 CD52 유전자들 내 다른 타겟 서열들이 디자인되었는데, 이는 표 7에서 보여진다.

표 7

| 타겟 | 타겟 서열 |
|----------|---|
| TRAC_T02 | TTTAGAAAGTTCCTGTG atgtcaagctggtcg AGAAAAGCTTTGAAACA (서열번호: 57) |
| TRAC_T03 | TCCAGTGACAAGTCTGT ctgcctattcaccga TTTTGATTCTCAAACAA (서열번호: 58) |
| TRAC_T04 | TATATCACAGACAAAAC tgtgctagacatgag GTCTATGGACTTCAAGA (서열번호: 59) |
| TRAC_T05 | TGAGGTCTATGGACTTC aagagcaacagtgtc GTGGCCTGGAGCAACAA (서열번호: 60) |
| CD52_T01 | TTCCTCTCCTCCTAC caccatcagcctcct TTACCTGTACCATAAC (서열번호: 61) |
| CD52_T04 | TTCCTCTACTACCA cagcctcctgg TCTTACCTGTACCATA (서열번호: 62) |
| CD52_T05 | TCCTACTCACCATCAG ctcctgggttat TTGCTCTTACCTGTAC (서열번호: 63) |
| CD52_T06 | TTATCCCACTTCTCCT ctacagatacaaaact TTTTGTCCTGAGAGTC (서열번호: 64) |
| CD52_T07 | TGGACTCTCAGGACAA acgacaccagccaaa TGCTGAGGGGCTGCTG (서열번호: 65) |

[0515]

[0516]

표 7: TRAC 및 CD52 TALE-뉴클레아제들을 위한 추가의 타겟 서열들.

[0518]

HEK293 세포들에서 CD52-TALE-뉴클레아제, TRAC-TALE-뉴클레아제 및 TRBC-TALE-뉴클레아제의 활성

[0519]

각각의 TALE-뉴클레아제 구조체가 pEF1알파(alpha) 길이(long) 프로모터의 통제 하 포유류 발현 벡터에서 제한 효소 소화를 이용하여 서브클로닝되었다. 형질감염(transfection) 하루 전 백만 HEK293 세포들이 시딩(seed)되었다. 세포들은 제조업자의 지시에 따라, 25 μ l의 리포펙타민(lipofectamine) (Invitrogen)을 이용하여 5 μ g의 컨트롤(control) pUC 벡터 (pCLS0003) 또는 EF1-알파 프로모터의 통제 하 T-세포 수용체 베타 불변(constant) 사슬 영역 (TRBC), T-세포 수용체 알파 불변(constant) 사슬 영역 (TRAC), 또는 CD52 유전자에서 관심있는 게놈 서열 내 두 개의 반(half) 타겟들을 인식하는 TALE-뉴클레아제들을 코딩하는 두 개의 플라스미드들의 각각의 2.5 μ g으로 공-형질감염(co-transfect)되었다. CD52 또는 TRAC coding 서열들 내 TALE-뉴클레아제들에 의하여 만들어지는 이중 가닥의 절단(cleavage)은 비상동(non homologous) 말단(end) 연결(joining) (NHEJ)에 의하여 살아있는 세포들에서 수선되는데, 이는 에러(error)-(prone) 메커니즘이다. 살아있는 세포들에서 TALE-뉴클레아제들의 활성은 타겟된 게놈 위치(locus)에서 삽입들 또는 결실들의 빈도에 의하여 측정된다. 형질감염(transfection) 48 시간 후, 게놈 DNA 이 형질감염된 세포들로부터 분리되었고, 하기 프라이머들을 이용하여 위치(locus) 특이적 PCR들이 수행되었다: 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG (포워드(forward) 어댑터(adaptor) 서열)- 10N (TAG)- 위치(locus) 특이적 포워드(forward) 서열로, CD52을 위하여: 5'-CAGATCTGCAGAAAGGAAGC-3' (서열번호: 66), TRAC을 위하여: 5'-ATCACTGGCATCTGGACTCCA-3' (서열번호: 67), TRBC1를 위하여: 5'-AGAGCCCCTACCAGAACCAGAC-3' (서열번호: 68), 또는 TRBC2를 위하여: 5'-

GGACCTAGTAACATAATTGTGC-3' (서열번호: 69), 그리고 역(reverse) 프라이머 5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG (역(reverse) 어댑터(adaptor) 서열)- 내생(endogenous) 위치(locus) 특이적 리버스(reverse) 서열로, CD52을 위하여: 5'-CCTGTTGGAGTCCATCTGCTG-3' (서열번호: 70), TRAC을 위하여: 5'-CCTCATGTCTAGCACAGTTT-3' (서열번호: 71), TRBC1 및 TRBC2을 위하여: 5'-ACCAGTCAGTCCACGTGGT-3' (서열번호: 72). PCR 산물들은 454 시퀀싱 시스템 (454 Life Sciences)에 의하여 시퀀싱되었다. 거의 10,000 서열들이 PCR 산물 당 수득되었고 그 때 위치(site)-특이적 삽입 또는 결실 이벤트들의 존재가 분석되었다; 결과들은 표 8에 있다.

표 8

| 타겟 | TALE-뉴클레아제 형질감염으로 % 삽입-결실들(Indels) | pUC 대조군 형질감염으로 % 삽입-결실들(Indels) |
|------------------------------|--|---------------------------------------|
| CD52_T02 | 28.0 | 0.9 |
| TRAC_T01 | 41.9 | 0.3 |
| TRBC_T01 in constant chain 1 | 3.81 | 0 |
| TRBC_T01 in constant chain 2 | 2.59 | 0 |
| TRBC_T02 in constant chain 1 | 14.7 | 0 |
| TRBC_T02 in constant chain 1 | 5.99 | 0 |

[0521]

[0522]

표 8: CD52_T02, TRAC_T01, TRBC_T01 및 TRBC_T02 타겟들을 타겟팅하는 TALE-뉴클레아제를 위한 삽입-결실들(indels)의 퍼센트들.

[0524]

일차(primary) T 림프구들 내 CD52-TALE-뉴클레아제, TRBC-TALE-뉴클레아제 및 TRAC-TALE-뉴클레아제의 활성화

[0525]

TALE-뉴클레아제 구조체(construct) 각각이 T7 프로모터의 통제 하 포유류 발현 벡터에서 제한 효소 소화를 이용하여 서브클로닝되었다.

[0527]

CD52 TRAC 및 TRBC 게놈 서열을 절단하는 TALE-뉴클레아제를 코딩하는 mRNA가 T7 프로모터로부터 다운스트림 코딩 서열들을 운반하는 플라스미드로부터 합성되었다. 말초 혈액으로부터 분리된 T 림프구들은 항-CD3/CD28 액티베이터(activator) 비드들 (Life technologies)을 이용하여 5 일동안 활성화되었고 5 백만 세포들이 그 때 CytolVT-P 도구(instrument)를 이용하여 반(half) TALE-뉴클레아제 둘 다를 코딩하는 2 mRNA들 (또는 대조군들로서 코딩하지 않는 RNA)의 각각의 10 µg으로 전기천공법(electroporation)에 의하여 형질감염되었다. NHEJ에 의하여 유도되는 삽입들 및 결실들의 결과, CD52 및/또는 TRAC에 대한 코딩 서열은 비-기능적 유전자들을 야기하는 세포들의 부분(fraction)에서 참여하지 않을 것이다(out of frame). 전기천공(electroporation) 5 일 후, 세포들은 그것들의 세포 표면에서 CD52 또는 TCR의 존재를 위하여 유동세포분석법(flow cytometry)에 의하여 플루오로크롬(fluorochrome)-콘쥬게이트된(conjugated) 항-CD52 또는 항-TCR 항체로 표지되었다. 말초 혈액으로부터 확장된(expanded) 모든 T 림프구들이 정상적으로 CD52 및 TCR을 발현시켰기 때문에, CD52-음성 또는 TCR-음성 세포들의 비율은 TALE-뉴클레아제 활성화의 직접적인 척도이다. 표 9에 대표 실험의 결과들이 리스트되어 있다. 표 10은 TRBC TALE-뉴클레아제들의 효율을 테스트한 대표 실험의 결과들을 보여준다.

표 9

| 형질감염된 ARN | % CD52-음성 세포들 | % TCR-음성 세포들 | % CD52/TCR 이중 음성 세포들 |
|------------------------------------|------------------|--------------------|----------------------------|
| non coding RNA | 1,21 | 1,531 | 0,111 |
| TALEN CD52_T02 | 49,2 | 1,6 | 0,78 |
| TALEN TRAC_T01 | 2,16 | 44,8 | 0,97 |
| TALEN CD52_T02 + TALEN TRAC_T01 | 29,3 | 39,6 | 15,5 |

[0529]

[0530]

표 9: 대응하는 TALE-뉴클레아제-발현 폴리뉴클레오타이드들의 형질감염(transfection) 후 CD52- 음성, TCR-음성 및 CD52/TCR-이중 음성 T 림프구들의 퍼센트들.

표 10

| 형질감염된 ARN | % TCR-음성 세포들 |
|----------------|--------------|
| no RNA | 1,22 |
| TALEN TRBC_T01 | 6,52 |
| TALEN TRBC_T02 | 23,5 |

[0532]

[0533]

표 10: TRBC TALE-뉴클레아제-발현 폴리뉴클레오타이드들의 형질감염(transfection) 후 TCR-음성 T 림프구들의 퍼센트들.

[0535]

타겟된 CD52 유전자로 T 세포들의 기능적 분석

[0536]

CD52 유전자 불활성화의 목표는 T 림프구들을 항-CD52 항체 매개된 면역억제에 저항성으로 만드는 것이다. 전 단락에서 기재한 바와 같이, T 림프구들은 CD52를 절단하는 TALE-뉴클레아제를 코딩하는 mRNA로 형질감염(transfect)되었다. 형질감염(transfection) 7 일 후, 세포들은 30% 토끼 보체(complement) (Cedarlane)로, 또는 없이, 50 µg/ml 항-CD52 단일클론 항체 (또는 대조군으로서 래트(rat) IgG)로 처리되었다. 37 °C에서 2 시간 배양된 후, 세포들은 형광(fluorescent) 생존능력(viability) 염료(dye) (eBioscience)와 함께 플루오로크롬-콘주게이트된 항-CD52 항체로 표지되었고, 살아있는 세포들 중 CD52-양성 및 CD52-음성 세포들의 빈도를 측정하기 위하여 유동세포분석법(flow cytometry)에 의하여 분석되었다. 도 6은 대표적 실험의 결과를 보여주는데, 이는 CD52-음성 세포들이 보체(complement)-매개 항-CD52 항체 독성에 완전히 저항성이라는 것을 나타낸다.

[0538]

타겟된 TRAC 유전자로 T 세포들의 기능적 분석

[0539]

TRAC 유전자 불활성화의 목표는 T 림프구들을 T-세포 수용체 자극에 대하여 무반응으로 만드는 것이다. 전 단락에서 기재한 바와 같이, T 림프구들은 TRAC 또는 CD52를 절단하는 TALE-뉴클레아제를 코딩하는 mRNA로 형질감염(transfect)되었다. 형질감염(transfection) 16 일 후, 세포들은 T 세포 수용체를 통하여 작용하는 T-세포 미토겐(mitogen) 인, 피토헤마글루티닌(phytohemagglutinin) (PHA, Sigma-Aldrich) 5 µg/ml까지로 처리되었다. 기능적 T-세포 수용체를 갖는 세포들은 PHA 처리 후 사이즈가 증가되어야 한다. 배양 삼 일 후, 세포들은 플루오로크롬-콘주게이트된 항-CD52 또는 항-TCR 항체로 표지되었고, TCR-양성 및 TCR-음성 세포들 사이의, 또는 CD52-양성 및 CD52-음성 세포들 사이의 세포 사이즈 분포를 비교하기 위하여, 유동세포분석법(flow cytometry)에 의하여 분석되었다. 도 7은 TCR-양성 세포들이 PHA 처리 후 사이즈가 상당히 증가한 반면, TCR-음성 세포들은 처리되지 않은 세포들과 동일한 사이즈를 갖는다는 것을 보여주는데, 이는 TRAC 불활성화가 TCR-신호전달에

무반응성으로 그것들을 만든다는 것을 가리킨다. 대조적으로, CD52-양성 및 CD52-음성은 동일한 정도로 사이즈가 증가한다.

[0541] 타겟된 CD52 및 TRAC 유전자들로 T 세포들의 기능적 분석

[0542] 계놈 조작이 키메라 항원 수용체 (CAR)에 제공될 때, 항-종양 활성을 보이는 T 세포들의 능력에 영향을 미치지 않는다는 것을 입증하기 위하여, 우리는 항-CD19 CAR를 코딩하는 RNA 10 µg 으로(서열번호: 73) TRAC-TALE-뉴클레아제 및 CD52-TALE-뉴클레아제로 처리된 T 세포들을 형질감염시켰다. 24 시간 후, T 세포들은 CD19 발현 (expressing) Daudi 세포들과 4 시간 동안 배양되었다. T 림프구들에 의한 세포독성(cytotoxic) 과립(granule) 방출(탈과립(degranulation)이라 불림)의 마커(marker), CD107a의 세포 표면 상향조절이 유동세포분석법(flow cytometry) 분석에 의하여 측정되었다(Betts, Brenchley et al. 2003). 결과들은 도 8에 포함되었고, CD52-음성/TCR α β-음성 세포들 및 CD52-양성/TCR α β-양성이 CD19+ Daudi 세포들 또는 PMA /이노마이신(ionomycin) (양성 대조군)에 대한 반응에서 탈과립시키는 동일한 능력을 갖는다는 것을 보여준다. CD107 상향조절은 CD19+의 존재에 의존적이다. 이들 데이터들은 계놈 조작이 통제된 항-종양 반응을 시작하는(mount) T 세포들의 능력에 부정적 영향을 갖지 않는다는 것을 제안한다.

[0544] 일차(primary) T 림프구들에서 CD52-TALE-뉴클레아제 및 TRAC-TALE-뉴클레아제의 계놈 안전성

[0545] 우리의 구조체들이 뉴클레아제 서브유닛들을 포함하므로, 중요한 질문은 복수의 TALE-뉴클레아제 형질감염(transfection)이 반(half)-TALE-뉴클레아제들의 짝짓기오류(mispairing)에 의하여 또는 타겟 서열들의 '근접(close) 매치(match)'에서 오프(off)-타겟 절단(cleavage) 및 유전독성(genotoxicity)을 이룰 수 있는지 g는 것이다. 세포 계놈들의 온전성(integrity)에 대한 TRAC-TALE-뉴클레아제 및 CD52-TALE-뉴클레아제의 영향을 추정하기 위하여, 우리는 오프(off)-위치(site) 절단(cleavage)을 위한 잠재성을 보이는 인간 계놈에서 서열들을 리스트화하였다. 이 리스트를 만들기 위하여, 우리는 원래의 반(half) 타겟들에 비교하여 4 까지의 치환들로 계놈 내 모든 서열들을 확인하였고 그 때 서로로부터 9 내지 30 bp의 스페이스(spacer)로 머리를 맞댄(head to head) 방향(orientation)으로 잠재적인 반(half) 타겟들의 쌍들을 확인하였다. 이 분석은 하나의 TRAC 반(half)-TALE-뉴클레아제 및 하나의 CD52 반(half) TALE-뉴클레아제에 의하여 형성된 헤테로다имер들 또는 하나의 반(half)-TALE-뉴클레아제 분자의 호모다имер들에 의하여 잠재적으로 타겟되는 위치(site)들을 포함한다. 우리는 치환들의 위치(position)(이때, 미스매치들은 반(half) 타겟의 3' 말단에서 염기들에 더 잘 견딘다) 및 각각의 치환들의 값을 고려하여 특이성 데이터에 기초하여 오프(off)-위치(site) 타겟들의 잠재성에 점수를 매겼다. 우리는 절단(cleavage)이 될 것 같은 추정을 반영한 점수로 173 개의 고유(unique) 서열들을 수득하였다. 우리는 15 개의 높은 점수들을 선택하였고, 동시에 CD52 및 TRAC TALE-뉴클레아제로 형질감염되고 CD52-음성, TCR α β-음성으로 자성(magnetic) 분리에 의하여 정제되는 T 세포들에서 이들의 위치들(loci)에서 발견되는 돌연변이들의 빈도를 딥(deep) 시퀀싱에 의하여 분석하였다. 결과들은 도 9에 있다. 가장 높은 빈도의 삽입/결실은 7×10^{-4} 이다. 이들 결과들은 의도된 타겟들보다 적어도 600 배 돌연변이 될 것 같은, 추정되는 오프사이트(offsite) 타겟을 만든다. 그러므로 이 연구에서 사용된 TALE-뉴클레아제 시약들은 극히 특이적인 것으로 보인다.

[0547] **실시예 3: 인간 PDCD1 유전자 및 인간 CTLA4 유전자를 절단하는 TALE-뉴클레아제들**

[0549] 실시예 1에서 기재한 바와 같이, 각각 PDCD1 및 CTLA4 유전자들을 타겟팅하는 헤테로다имер(heterodimeric) TALE-뉴클레아제들이 디자인되고 생산되었다. 타겟된 계놈 서열들은 11 또는 15-bp 스페이스(spacer)에 의하여 분리된 두 개의 17-bp long 서열들 (반(half) 타겟들로 불림)으로 구성된다. 각각의 반(half)-타겟은 표 11에 리스트된 반(half) TALE-뉴클레아제들의 반복들에 의하여 인식된다.

표 11

| 타겟 | 타겟 서열 | 반복 서열 | 반(Half) TALE-뉴클레아제 |
|-----------|--|----------------------------------|---------------------------------|
| CTLA4_T01 | TGGCCCTGCACTCTCCT gttttttcttctctt CATCCCTGTCTTCTGCA (서열번호: 74) | Repeat CTLA4_T01-L (서열번호: 79) | CTLA4_T01-L TALEN (서열번호: 89) |
| | | Repeat CTLA4_T01-R (서열번호: 80) | CTLA4_T01-R TALEN (서열번호: 90) |
| CTLA4_T03 | TTTTCCATGCTAGCAAT gcacgtggccccagcc TGCTGTGGTACTGGCCA (서열번호: 75) | Repeat CTLA4_T03-L (서열번호: 81) | CTLA4_T03-L TALEN (서열번호: 91) |
| | | Repeat CTLA4_T03-R (서열번호: 82) | CTLA4_T03-R TALEN (서열번호: 92) |
| CTLA4_T04 | TCCATGCTAGCAATGCA cgtggccagcctgc TGTGGTACTGGCCAGCA (서열번호: 76) | Repeat CTLA4_T04-L (서열번호: 84) | CTLA4_T04-L TALEN (서열번호: 93) |
| | | Repeat CTLA4_T04-R (서열번호: 85) | CTLA4_T04-R TALEN (서열번호: 94) |
| PDCD1_T01 | TTCTCCCAGCCCTGCT cgtggtgaccgaagg GGACAACGCCACCTCA (서열번호: 77) | Repeat PDCD1_T01-L (서열번호: 86) | PDCD1_T01-L TALEN (서열번호: 95) |
| | | Repeat PDCD1_T01-R (서열번호: 87) | PDCD1_T01-R TALEN (서열번호: 96) |
| PDCD1_T03 | TACCTCTGTGGGGCCAT ctccctggcccccac GGCGCAGATCAAGAGA (서열번호: 78) | Repeat PDCD1_T03-L (서열번호: 88) | PDCD1_T03-L TALEN (서열번호: 97) |
| | | Repeat PDCD1_T03-R (서열번호: 89) | PDCD1_T03-R TALEN (서열번호: 98) |

[0551]

[0552]

표 11: 인간 대응하는 유전자들에서 TALE-뉴클레아제들 타겟 위치(sites)들의 서열들 및 CTLA4 및 PDCD1 TALE-뉴클레아제들의 기재.

[0554]

HEK293 세포들에서 CTLA4-TALE-뉴클레아제 및 PDCD1-TALE-뉴클레아제의 활성

[0555]

각각의 TALE-뉴클레아제 구조체(construct)가 pEF1알파(alpha) 길이(long) 프로모터의 통제 하 포유류 발현 벡터에서 제한 효소 소화를 이용하여 서브클로닝되었다. 백만 HEK293 세포들이 형질감염(transfection) 하루 전 시딩(seed)되었다. 세포들은 제조업자의 지시에 따라 25 μ l 의 리포펙타민(lipofectamine) (Invitrogen)을 이용하여 5 μ g 의 콘트롤(control) pUC 벡터 (pCLS0003) 또는 EF1-알파와 프로모터의 통제 하 PDCD1 및 CTLA-4 유전자에서 관심있는 게놈 서열 내 두 개의 반(half) 타겟들을 인식하는 TALE-뉴클레아제들을 코딩하는 두 개의 플라스미드들 각각의 2.5 μ g으로 공-형질감염(co-transfect)되었다.

[0557]

PDCD1 또는 CTLA-4 코딩 서열들 내 TALE-뉴클레아제들에 의하여 이루어지는 이중 가닥의 절단(cleavage)은 비상동(non homologous) 말단(end) 연결(joining) (NHEJ)에 의하여 살아있는 세포들에서 수선되는데, 이는 에러(error)-프론(prone) 메커니즘이다. 살아있는 세포들 내 TALE-뉴클레아제들의 활성은 타겟된 게놈 위치(locus)에서 삽입들 또는 결실들의 빈도에 의하여 측정된다. 형질감염(transfection) 48 시간 후, 게놈 DNA 가 형질감염된 세포들로부터 분리되었고, 하기 프라이머들을 이용하여 위치(locus) 특이적 PCR들이 수행되었다: 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG (포워드(forward) 어댑터(adaptor) 서열)- 10N (TAG)- 위치(locus) 특이적 포워드(forward) 서열로, CTLA4_T01을 위하여: 5'-CTCTACTTCTGAAGACCTG-3' (서열번호: 99), CTLA4_T03/T04를 위하여: 5'-ACAGTTGAGAGATGGAGGG-3' (서열번호: 100), PDCD1_T01를 위하여: 5'-CCACAGAGGTAGGTGCCGC-3' (서열번호: 101) 또는 PDCD1_T03를 위하여: 5'-GACAGAGATGCCGGTCACCA-3' (서열번호: 102) 및 역(reverse) 프라이머 5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG (역(reverse) 어댑터(adaptor) 서열)- 내생(endogenous) 위치(locus) 특이적 리버스(reverse) 서열 for CTLA4_T01: 5'-TGGAATACAGAGCCAGCCAA-3' (서열번호: 103), CTLA4_T03/T04를 위하여: 5'-GGTGCCCGTGCAGATGGAAT-3' (서열번호: 104), PDCD1_T01를 위하여: 5'-GGCTCTGCAGTGGAGGCCAG-3' (서열번호: 105) 또는 PDCD1_T03를 위하여: 5'-GGACAACGCCACCTTCACCT-3' (서열번호: 106).

- [0559] PCR 산물들은 T7-엔도뉴클레아제 분석에 의하여 분석되었다: 간단히, PCR 산물의 변성(denaturation) 및 재어닐링(reannealing) 후, T7 엔도뉴클레아제는 야생형 및 돌연변이된 가닥들을 포함하는 미스매치된 DNA를 특이적으로 소화시킬 것이다. 그 소화 산물은 그 때, 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동에 의하여 리졸브(resolve)된다. 소화된 산물의 존재는 TALE-뉴클레아제 활성화에 의하여 유도되는 돌연변이된 서열들을 나타낸다. 결과들은 도 10에 나타나 있으며, 이때 화살표는 소화된 PCR 산물들을 가리킨다. 그것들은 PDCD1_T1, PDCD1_T3, CTLA4_T1, CTLA4_T3 및 CTLA4_T4 TALE-뉴클레아제들 모두가 그것들의 타겟 위치들에서 돌연변이를 일으키는(mutagenic) 뉴클레아제 활성을 보인다는 것을 입증한다.
- [0561] 일차(primary) T 세포들 내 CTLA4 불활성화:
- [0562] 인간 일차(primary) T 세포들이 CD3/28 비드들로 활성화되었다. 5 일 후, 5×10^6 세포들이 대조군으로서 RNA 없이 또는 CTLA4 유전자에 대하여 디자인된 세 TALENTM (T1, T2 및 T3) 중 하나를 코딩하는 RNA 20 μ g 으로 전기천공되었다. 전기천공법(electroporation) 삼 일 후, CTLA4 발현이 형광성 항체 및 유동세포분석법(flow cytometry) 분석을 이용하여 세포내 염색에 의하여 측정되었다(도 27 및 28).
- [0564] 세 개의 TALENTM 모두 HEK293 세포주들에서 그것들의 효율과 관련된 방식으로 CTLA4 발현의 하향조절을 유도하였다(T1 이 T3 및 T4 보다 더 효과적이었다).
- [0566] 454 technology (Roche)를 이용하여 형질감염된 세포들로부터 분리된 게놈 DNA의 딥(deep) 시퀀싱 분석은 TALEN이 없는 대조군 샘플에서 0.1% 에 비교할 때, 96 %의 CTLA4 대립형질들(alleles)이 TALEN T1-처리된 세포들에서 돌연변이되었다는 것을 드러냈다.
- [0568] 일차(primary) T 세포들에서 PD1 불활성화:
- [0569] 인간 일차(primary) T 세포들이 CD3/28 비드들로 활성화되었다. 오일 후 5×10^6 세포들이 대조군으로서 RNA 없이, 또는 인간 PD1 유전자에 특이적인 두 개의 TALEN들 중 하나를 코딩하는 RNA 20 μ g으로 전기천공되었다. 십일 후, 세포들은 재활성화되었고, 재활성화 후 3 일 후, PD1 발현이 형광성 항체 및 유동세포분석법(flow cytometry) 분석에 의하여 표면 염색에 의하여 측정되었다(도 29).
- [0571] TALEN들은 둘 다 PD1 발현의 중대한 하향조절을 유도하였다. 454 기술 (Roche) 를 이용하여 각각 TALEN T1 및 TALEN T03 으로 형질감염된(transfect) 세포들로부터 분리된 게놈 DNA의 딥 시퀀싱 분석은 34 % 및 39%의 PD1 대립형질들(alleles)이 각각 돌연변이되었다는 것을 드러냈다(도 30에 결과가 보여짐).
- [0573] 증강된 항-종양 활성 PD1-TALEN 처리된 세포들:
- [0574] 인간 일차(primary) T 세포들이 CD3/28 비드들로 활성화되었다. 오일 후 5×10^6 세포들이 대조군인 RNA 없이 또는 인간 PD1 유전자에 특이적인 TALEN를 코딩하는 RNA 20 μ g 으로 전기천공되었다. 일주일 후, 세포들은 음성 대조군으로서 RNA 없는, 또는 인간 CD19에 특이적인 키메라 항원 수용체를 코딩하는 mRNA로 전기천공되었다. 다음 날, 그것들의 항종양 활성이 CD19 발현 벡터로 형질도입된(transduced) PD1리간드(ligand) 1 (PDL1)을 발현시키는 HCT116 세포들 (vs. 대조군으로서 부모(parental) HCT116 세포들) 또는 CD19+ Daudi 세포들 (vs. 대조군으로서 K562)을 이용하여 세포의(cellular) 세포독성 분석에서 측정되었다. 세포독성 활성은 대조군 세포들 및 타겟 세포들의 생존능력을 비교함으로써 결정되었다. 결과들은 도 31의 다이어그램들에 나타나 있다. PD1 TALEN 형질감염(transfection)은 PDL1-발현 HCT116 세포들에 대한 세포독성(cytotoxic) 활성을 회복시켰고 Daudi 세포들에 대한 세포독성(cytotoxic) 활성을 개선하였다.

[0576] 실시예 4: pT알파(pTalpha)는 불활성화된 TCR 알파 T 림프구들에서 CD3 표면 발현을 가능하게 한다:

[0577] 다른 프리T알파(preTalpha) 버전들에서의 기재:

[0578] 인간 pT알파(pTalpha) 유전자는 세포의 Ig-유사(like) 도메인, 소수성(hydrophobic) 막관통 도메인 및 큰 C-말단 세포질내 꼬리를 포함하는 막관통 당단백질을 코딩한다. 인간 pT알파(pTalpha) 당단백질로부터 유래된 다른 버전들이 디자인되었으며, 표 12에 기재되었고, 도 11에 나타나 있다.

표 12

| PTalpha 버전들 | 기재 | SEQ ID |
|------------------|---|--------|
| pTalpha-FL | 인간 pTalpha 당단백질의 전장 | 107 |
| pTalpha-Δ18 | C-말단으로부터 18 잔기들이 부족한 잘린 인간 pTalpha 당단백질. | 108 |
| pTalpha-Δ48 | C-말단으로부터 48 잔기들이 부족한 잘린 인간 pTalpha 당단백질. | 109 |
| pTalpha-Δ62 | C-말단으로부터 62 잔기들이 부족한 잘린 인간 pTalpha 당단백질. | 110 |
| pTalpha-Δ78 | C-말단으로부터 78 잔기들이 부족한 잘린 인간 pTalpha 당단백질. | 111 |
| pTalpha-Δ92 | C-말단으로부터 92 잔기들이 부족한 잘린 인간 pTalpha 당단백질. | 112 |
| pTalpha-Δ110 | C-말단으로부터 110 잔기들이 부족한 잘린 인간 pTalpha 당단백질. | 113 |
| pTalpha-Δ114 | C-말단으로부터 114 잔기들이 부족한 잘린 인간 pTalpha 당단백질. | 114 |
| pTalpha-FL-CD28 | CD28 활성화 도메인으로 C-말단에서 융합된 인간 pTalpha 당단백질의 전장. | 115 |
| pTalpha-FL-CD8 | CD8 활성화 도메인으로 C-말단에서 융합된 인간 pTalpha 당단백질의 전장. | 116 |
| pTalpha-FL-4-1BB | 4-1BB 활성화 도메인으로 C-말단에서 융합된 인간 pTalpha 당단백질의 전장. | 117 |
| pTalpha-Δ48-CD28 | CD28 활성화 도메인으로 C-말단에서 융합된 pTalpha-Δ48 당단백질. | 118 |
| pTalpha-Δ48-CD8 | CD8 활성화 도메인으로 C-말단에서 융합된 pTalpha-Δ48 당단백질. | 119 |
| pTalpha-Δ48-41BB | with 4-1BB 활성화 도메인으로 C-말단에서 융합된 pTalpha-Δ48 당단백질. | 120 |

[0580]

| | | |
|---------------------------|--|-----|
| pTalpha- Δ114/TCRα.IC | TCRalpha 의 세포내 도메인과 C-말단에서 융합된 pTalpha-Δ114 당단백질. | 121 |
| pTalpha- EC/TCRα.TM.IC | TCRalpha 의 막관통 및 세포내 도메인과 C-말단에서 융합된 pTalpha 세포의 도메인. | 122 |
| pTalpha-Δ48- 1xMUT | 돌연변이된 W46R 을 갖는 pTalpha-Δ48 당단백질. | 123 |
| preTalpha-Δ48- 4xMUT | 돌연변이된 잔기 D22A, K24A, R102A, R117A 를 갖는 pTalpha-Δ48 당단백질. | 124 |

[0581]

[0583] 표 12: pT알파(pTalpha) 구조체들의 서브셋(subset)의 기재

[0585] 테스트된 다른 프리T알파(preTalpha) 구조체들은 하기를 포함한다:

[0586] 1) pTalpha 결실 돌연변이체들(mutants): 다른 결실들이 (114 아미노산들을 포함하는) 인간 pT알파(pTalpha) 단백질(서열번호: 107)의 세포내 세포질 꼬리에서 만들어진다. 테스트된 구조체들은 18, 48, 62, 78, 92, 110 및 114 아미노산들이 단백질의 C-말단으로부터 결실된, 돌연변이체들(mutants) 및 단백질 (FL)의 전장 버전을 포함한다(서열번호: 108 내지 서열번호: 114).

[0588] 2) 세포내 활성화(activation) 도메인들을 포함하는 pTalpha 돌연변이체들(mutants): 그것들의 C-말단에서 CD8, CD28 또는 41BB 세포내 활성화(activation) 도메인들에 융합되는 FL 및 Δ48 변이체들(variants) (서열번호: 115 내지 서열번호: 120).

[0590] 3) pTalpha/TCR α 키메라 돌연변이체들(mutants): 구조체들 중 하나에서, TCR α 세포내 도메인 (IC)은 pT알파(pTalpha)의 꼬리 없는 버전(Δ114)에 융합된다(서열번호: 121). 두 번째 구조체(construct) 또한 TCR α로부터의 IC 도메인들 및 막관통 (TM)에 pT알파(pTalpha) 세포의 도메인이 융합되는 데서 만들어졌다(서열번호: 122).

[0592] 4) pTalpha 이합체화 돌연변이체들(mutants): 몇몇 돌연변이들이 preTCR 복합체(complex)의 올리고머화/이합체화 능력을 바꿀 수 있는 것으로 문헌에서 기재되어 왔다. 이들 돌연변이체들(mutants)은 (preTCR 올리고머화에 유도될 것으로 추정되는) 구성요소(constitutive)인 신호전달을 유도하지 않고, 세포 표면에서 preTCR 발현을 가능하게 하도록 제안된다. 돌연변이들은 pTalphaΔ48 변이체에 도입되어 왔고, 하기이다:

[0593] 1xMUT: W46R (서열번호: 123)

[0594] - 4x MUT: D22A, K24A, R102A, R117A (서열번호: 124)

[0596] TRAC 불활성화된 주르카트(Jurkat) 세포들 내 다른 프리T알파(preTalpha) 구조체들의 활성화:

[0597] TCR알파 불활성화된 세포들에서 CD3 표면 발현을 회복시키는 그것들의 능력을 위하여 다른 pT알파(pTalpha) 변이체들(variants)을 스크리닝하기 위하여, TRAC를 타겟팅하는 TALEN을 이용하여 TCR알파 유전자가 붕괴된 세포주가 만들어졌다. 주르카트(Jurkat) 세포들 (T-세포 백혈병 세포주)은 KO 세포들 ($TCR_{\alpha/\beta}^{NEG}$; $CD3^{NEG}$) 및 CytoPulse 전기천공법(electroporation)을 이용하여 TRAC를 절단하는 TALEN를 코딩하는 플라스미드들로 형질감염(transfect)되었고, 그때 CD3 자성(magnetic) 비드들을 이용한 음성(negative) 선택에 의하여 정제되었다. KO 개체군(population) (JKT_KOx3 세포들)은 증폭되었고 다른 pT알파(pTalpha) 변이체들의 스크리닝에 사용되었다. 스크리닝은 EF1 α 프로모터,의 통제 하 다른 pT알파(pTalpha) 변이체들(variants)를 코딩하는 플라스미드

15 μ g으로 백만의 JKT_KOx3 세포들의 형질감염(transfection)에 의하여 수행되었으며, 뒤를 이어 형질감염(transfection) 48 시간(h) 후 CD3 세포 표면 발현의 유동세포분석법(flow cytometry)에 의하여 분석이 이루어졌다. 도 12는 유동세포분석법에 의하여 결정되는, CD3+ 세포들의 %에 기초한, JKT_KOx3 세포들의 FL, Δ 18 및 Δ 48 pT알파(pTalpha) 구조체들의 활성 및 형질감염(transfection) 효율들(BFP+ 세포들의 %)의 대표적 예이다. 다른 구조체들로부터의 결과들은 표 13에 그룹으로 되어 있다.

표 13

| Mutant | ID | % CD3 _{Low} | SD |
|--------|--|----------------------|-------------|
| 0 | NEG | 4,69 | 1,53 |
| 1 | preTCR α -FL | 31,18 | 4,15 |
| 2 | preTCR α - Δ 18 | 20,13 | 4,56 |
| 3 | preTCRα-Δ48 | 44,86 | 3,90 |
| 4 | preTCR α - Δ 62 | 32,42 | 2,95 |
| 5 | preTCR α - Δ 78 | 24,75 | 3,87 |
| 6 | preTCR α - Δ 92 | 20,63 | 3,70 |
| 7 | preTCR α - Δ 110 | 18,18 | 3,49 |
| 8 | preTCR α - Δ 114 | 4,29 | 2,74 |
| 9 | preTCR α -FL-CD8 | 18,16 | 5,30 |
| 10 | preTCR α -FL-CD28 | 5,67 | 2,77 |
| 11 | preTCR α -FL-41BB | 27,27 | 3,66 |
| 12 | preTCR α - Δ 48-CD8 | 11,56 | 6,01 |
| 13 | preTCR α - Δ 48-CD28 | 12,22 | 4,72 |
| 14 | preTCR α - Δ 48-41BB | 35,93 | 4,55 |
| 15 | preTCR α - Δ 114/TCR α .IC | 3,94 | 1,95 |
| 16 | preTCR α -EC/TCR α .TM.IC | 17,80 | 4,47 |
| 17 | preTCR α - Δ 48-1xMUT | 26,88 | 4,37 |
| 18 | preTCR α - Δ 48-4xMUT | 7,59 | 1,06 |

표 13: Jurkat TCR 알파 불활성화된 세포들에서 다른 pT알파(pTalpha) 구조체들의 활성.

다른 프리T알파(preTalpha) 구조체들로 형질감염된 주르카트(jurkat) TCR 알파 불활성화된 세포들에서의 CD3 발현의 유동세포분석법(flow cytometry) 분석에 의하여 활성이 측정되었다.

TCR 알파 불활성화된 임차(primary) T 림프구들에서 pTalpha-FL 및 pTalpha- Δ 48의 활성:

TCR 알파 불활성화된 T 림프구에서 CD3 표면 발현을 유도하는 pTalpha-FL 및 pTalpha- Δ 48 버전들의 활성을 테스트하기 위하여, pTalpha-FL 및 pTalpha- Δ 48 코딩 서열들이, SFFV 프로모터 뒤이어 자가 절단 T2A 펩타이드 하 푸른(Blue) 형광(Fluorescent) 단백질 (BFP)를 코딩하는, 자가(self)-불활성화(inactivating)인 pLV-SFFV-BFP-2A-PCTRA 렌티바이러스(lentiviral) 벡터 내로 클로닝되었다(도 13).

말초 혈액으로부터 분리된 T 림프구들이 항-CD3/CD28 액티베이터(activator) 비드들 (Life technologies)을 이용하여 72 시간 동안 활성화되었고, 4.5 백만 세포들이 CytolVT-S 기구(instrument) (BTX-Harvard Harbour)를 이용하여 TCR 알파 불변(constant) 사슬 영역 (TRAC) 을 타겟팅하는 TALE-뉴클레아제를 코딩하는 mRNA 10 μ g으로 전기천공법(electroporation)에 의하여 형질감염(transfect)되었다. 전기천공법(electroporation) 2 일 후, T 세포들이 LV-SFFV-BFP-2A- pTalpha- Δ 48 또는 LV-SFFV-BFP-2A-대조군(control) 렌티바이러스(lentiviral) 벡터들로 형질도입(transduce)되었다. CD3 음성 및 CD3low T 세포들은 그 때 항-CD3 자성(magnetic) 비드들 (Miltenyi Biotech)를 이용하여 정제되었다. 이 실험 프로토콜은 도 14A에 나와 있다.

도 14B는 CD3 비드들로 정제 전 및 후에 대조군 BFP 렌티바이러스(lentiviral) 벡터 (KO/BFP) 또는 BFP-2A-pTalpha Δ 48 (KO/ Δ 48)으로 형질도입(transduce)된 TCR알파 inactivated T 세포들 (KO) 상 BFP 발현, CD3 세포 표면 발현, 및 TCR알파/베타의 유동세포분석법(flow cytometry) 분석을 나타낸다. BFP-T2A-pTalpha- Δ 48 벡터

(BFP+ 세포들)로 형질도입된 TCR알파 불활성화된 세포들은 형질도입되지 않은 세포들 (BFP- 세포들)에 비교하여 더 높은 레벨들의 CD3를 보인다. 대조군 BFP 벡터로 형질도입된 세포들 간에는 차이가 관찰되지 않는다. 이들 결과들은 pT알파(pTalpha)가 TCR알파 불활성화된 세포들의 세포 표면에서 CD3 발현의 회복을 매개한다는 것을 가리킨다. 대조적으로, TCR알파/베타 염색은, 예상대로, pTalpha-△48 발현 벡터 없이, 또는 형질도입(transduced) 세포들에서 변하지 않은 상태로 남아 있었다.

[0610] pTalpha-매개된 CD3 발현은 TCR-결핍(deficient) T-세포들에서 활성화를 지지한다:

[0612] 세포 활성화(activation) 신호들을 형질도입하는(transduce) pT알파(pTalpha)의 능력을 결정하기 위하여, 초기(early) 및 늦은(later) 활성화(activation) 마커들의 발현이 pTalpha-△48 및 pTalpha-△48.41BB로 형질도입된 TCR 알파 불활성화된 T 세포들에서 분석되었다. pTalpha-△48.41BB 및 pTalpha-△48 으로 형질도입된 TCR 알파 불활성화된 T 세포들은 도 14A 및 앞 부분에서 기재한 바와 같이 일차(primary) 인간 T-세포들로부터 만들어졌다.

[0614] CD3를 통한(via) 신호전달을 검출하기 위하여, 세포들은, CD3 비드들로 TCR 알파 불활성화된 T 세포들의 정제 3 일 후 항-CD3/CD28-코팅된 비드들을 이용하여 재활성화되었다(도 14A). 세포들은 플루오로크롬-콘주게이트된 항-CD69 (초기 활성화(activation) 마커) 및 항-CD25 (늦은(late) 활성화(activation) 마커)로 염색되었고, 각각 재활성화 24 및 48 시간 후, 유동세포분석법(flow cytometry)에 의하여 분석되었다(도 15A-B). 도 15A-B에 나타난 바와 같이, pTalpha-△48 (KO/pTα-△48) 또는 pTalpha-△48.41BB (KO/pTα-△48.BB) 를 발현하는 TCR 알파 불활성화된 세포들은 TCR알파/베타 expressing 세포들에서 관찰된 그것과 유사한 레벨들로, 활성화 마커들의 상향조절을 보였다(NEP: 비(non) 전공천공된(electroporated) 세포들).

[0616] T 세포 활성화(activation)의 또다른 지표는 가끔 "블래스팅(blasting)"이라 가리켜지는 세포 크기의 증가이다. "블래스팅"을 유도하는 preTCR 복합체들의 능력은 항-CD3/CD28- 비드들을 이용한 재활성화 72 시간 후 세포 크기의 유동세포분석법(flow cytometry) 분석에 의하여 측정되었다(도 15C). 항-CD3/CD28 비드들로의 자극은 pTalpha-△48 또는 pTalpha-△48.41BB를 발현시키는 세포들 vs. TCR알파/베타 복합체들을 발현시키는 세포들에서의 세포 크기의 비교할만한(comparable) 증가를 유도하였다. 둘다 종합하면, 이들 결과들은, preTCR 복합체들이 활성화(activation) 마커(marker) 상향조절을 매개하는 메커니즘들에 효과적으로 커플링하는 신호들을 전달할(transduce) 능력이 있다는 것을 제안한다.

[0618] pTalpha 매개된 CD3 발현은 자극성 항-CD3/CD28 항체들을 이용하여 TCR-결핍(deficient) 일차(primary) T-세포들의 확장을 지지한다.

[0619] 장기간 세포 증식을 지지하는 preTCR 복합체들의 능력을 평가하기 위하여, 전술한 대로 만들어지는 세포들의 증식이 측정되었다. 초기 활성화의 10일 후, 세포들은 IL2 (재작용 없음(non-Re-act))에서 또는 항-CD3/CD28 비드들을 갖는 IL2에서 (재작용(Re-act)), 유지되었다. 각 조건을 위하여, 세포들은 카운팅(count)되었고, BFP+ 세포들의 수를 추정하기 위하여 다른 시간점들에서 유동세포분석법(flow cytometry)에 의하여 분석되었다. BFP-T2A-preTCR α-△48 벡터들 또는 BFP로 형질도입된(transduce) TCR알파 불활성화된 세포들 (KO)의 성장이 비교되었고, 이들 세포들의 배수(fold) 유도(induction)가 재활성화 2일 후 수득된 값에 대하여 추정되었다. 도 16은 두 개의 독립적인 도너들로부터 수득된 결과들을 보여준다. 두 케이스들 모두에서, pTalpha-△48을 발현시키는 TCR알파 불활성화된 세포들은 BFP 대조군 벡터만을 발현시키는 TCR 알파 불활성화된 세포들보다 더 큰 확장을 보였다. 두 번째 도너를 위하여, 전장 pT알파(pTalpha) 또는 pTalpha-△48.41BB를 발현시키는 TCR알파 불활성화된 세포들 또한 포함되었고, BFP 대조군 벡터만을 발현시키는 TCR알파 불활성화된 세포들보다 더 큰 확장을 보였다.

[0621] 실시예 5: 사이토피스(Cytopulse) 기술을 이용한 T 세포들에서의 mRNA 형질감염(transfection)의 최적화.

[0622] 최적화된 사이토피스(cytopulse) 프로그램의 결정

[0623] 실험들의 첫 번째 세트는 세포들이 형질감염될 수 있는 전압 범위를 결정하기 위하여 불활성화된 PBMC들 상에서 수행되었다. 다섯 개의 다른 프로그램들이 표 14에 기재된 대로 테스트되었다.

표 14

| 사이토피스 프로그램 | 그룹 1 | | | | 그룹 2 | | | | 그룹 3 | | | |
|---------------|------|------|------------|------------|------|------|------------|------------|---------|-----|------------|------------|
| | 펄스들 | V | 나비 (ms) | 간격 (ms) | 펄스들 | V | 나비 (ms) | 간격 (ms) | 펄스 들 | V | 나비 (ms) | 간격 (ms) |
| 1 | 1 | 600 | 0.1 | 0.2 | 1 | 600 | 0.1 | 100 | 4 | 130 | 0.2 | 2 |
| 2 | 1 | 900 | 0.1 | 0.2 | 1 | 900 | 0.1 | 100 | 4 | 130 | 0.2 | 2 |
| 3 | 1 | 1200 | 0.1 | 0.2 | 1 | 1200 | 0.1 | 100 | 4 | 130 | 0.2 | 2 |
| 4 | 1 | 1200 | 0.1 | 10 | 1 | 900 | 0.1 | 100 | 4 | 130 | 0.2 | 2 |
| 5 | 1 | 900 | 0.1 | 20 | 1 | 600 | 0.1 | 100 | 4 | 130 | 0.2 | 2 |

[0625]

[0626] 표 14: 다른 사이토피스 프로그램들이 PBMC 유래된 T-세포들에서 전기천공법(electroporation)에 요구되는 최소 전압을 결정하는데 사용되었다.

[0628] 3 또는 6 백만개의 세포들이 다른 사이토피스(Cytopulse) 프로그램들을 이용하여 대조군 플라스미드들 pUC 및 GFP를 코딩하는 플라스미드들 20 µg으로 0.4 cm 갭(gap) 큐벳(cuvette) (30 또는 15x10⁶ 세포들/ml) 에서 전기 천공되었다. 전기천공법(electroporation) 24 시간 후, GFP 발현이 형질감염(transfection)의 효율을 결정하기 위하여 유동세포분석법(flow cytometry)에 의하여 전기천공된 세포들에서 분석되었다. 도 17에 보여지는 데이터 들은 PBMC 유래된 T 세포들에서 플라스미드 전기천공법(electroporation)에 요구되는 최소 전압을 가리킨다. 이들 결과들은 사이토피스(cytopulse) 프로그램 3 및 4 가 T 세포들의 효율적인 형질전환(transformation)을 가능하게 한다는 것을 입증한다(EP#3 및 #4).

[0630] 활성화된 정제된 T세포들의 mRNA 전기천공

[0631] T 세포들의 효율적인 DNA 전기천공법(electroporation)을 가능하게 하는 최고의 사이토피스(cytopulse) 프로그램을 결정한 후, 우리는 이 방법이 mRNA 전기천공법에도 적용가능한지 여부를 테스트하였다.

[0632]

[0633] PHA/IL2로 6 일 미리활성화된(preactivated) 5x10⁶ 정제된 T 세포들이 사이토포레이션(cytoporation) 버퍼 T (BTX-Harvard apparatus)에서 재현탁(resuspend)되었고, 이전 부분에서 결정된 대로 선호되는 사이토피스(cytopulse) 프로그램을 이용하여 pUC 또는 GFP를 코딩하는 플라스미드들 20 µg 또는 GFP를 코딩하는 mRNA 10 µg으로 0.4 cm 큐벳(cuvettes)에서 전기천공되었다(표 15).

표 15

| 사이토피스 프로그램 | 그룹 1 | | | | 그룹 2 | | | | 그룹 3 | | | |
|---------------|------|------|------------|------------|------|------|------------|------------|------|-----|------------|------------|
| | 펄스 | V | 나비 (ms) | 간격 (ms) | 펄스 | V | 나비 (ms) | 간격 (ms) | 펄스 | V | 나비 (ms) | 간격 (ms) |
| 3 | 1 | 1200 | 0.1 | 0.2 | 1 | 1200 | 0.1 | 100 | 4 | 130 | 0.2 | 2 |

[0635]

- [0636] Table 15: 표 15: 정제된 T-세포들을 전기천공하는데 사용되는 사이토피스(Cytopulse) 프로그램.
- [0638] 형질감염(transfection) 48 시간(h) 후, 세포들이 생존능력(viability) 염료(eFluor-450)로 염색되었고, 세포 생존능력(viability) 및 살아있는(viable) GFP+ 세포들의 %가 유동세포분석법(flow cytometry) 분석에 의하여 결정되었다(도 18).
- [0640] 도 18에 보여지는 데이터들은 여기에서 결정된 최적 조건으로 RNA의 전기천공이 독성이 없으며, 살아있는(viable) 세포들의 95%보다 많은 형질감염(transfection)을 가능하게 한다는 것을 가리킨다.
- [0642] 합성에서, 전체 데이터세트(dataset)는 T-세포들이 DNA 또는 RNA로 효율적으로 형질감염될 수 있다는 것을 보여 준다. 특히, RNA 형질감염(transfection)은 세포 생존능력(viability)에 아무 영향이 없으며, 세포 개체군(population)에서 관심있는 형질감염된 유전자의 균일한(uniform) 발현 레벨들을 가능하게 한다.
- [0644] 효율적인 형질감염(transfection)은 사용된 활성화 방법(PHA/IL-2 또는 CD3/CD28-코팅된-비드들)의 독립적으로, 세포 활성화 후 일찍 달성될 수 있다. 본 발명자들은 >95%의 효율들로 활성화(activation) 72 시간(h) 후로부터 세포들을 형질감염시키는데 성공하였다. 게다가 해동(thawing) 및 활성화(activation) 후 T 세포들의 효율적인 형질감염(transfection)은 또한 동일한 전기천공법(electroporation) 프로토콜을 이용하여 수득될 수 있다.
- [0646] TALE-뉴클레아제 기능적 발현을 위한 일차(primary) 인간 T 세포들에서의 mRNA 전기천공법(electroporation)
- [0648] mRNA 전기천공법(electroporation)이 일차(primary) 인간 T 세포들에서 GFP의 효율적인 발현을 가능하게 한다는 것을 입증한 후, 우리는 이 방법이 관심있는 다른 단백질들의 발현에 적용될 수 있는지 여부를 테스트하였다. 전사(Transcription) 액티베이터(activator)-유사(like) 이펙터(effector) 뉴클레아제들 (TALE-nuclease)는 DNA 절단(cleavage) 도메인에 대한 TAL DNA 결합 도메인의 융합에 의하여 만들어지는 위치(site)-특이적 뉴클레아제들이다. 그것들은 강력한 게놈 편집 도구들인데, 이는 그것들이 사실상 임의의 원하는 DNA 서열에서 이중-가닥 손상들(breaks)을 유도하기 때문이다. 이들 이중-가닥 손상들(breaks)은 비상동(Non-homologous) 말단 연결(end-joining) (NHEJ), 에러-프론 DNA 수선 메커니즘을 활성화시키며, 관심있는 임의의 원하는 유전자의 불활성화를 잠재적으로 이끈다. 대체하여, 만약 적절한 수선 주형이 동시에 세포들 내로 도입되면, TALE-뉴클레아제-induced DNA 손상들은 상동 재조합에 의하여 수선될 수 있고, 그러므로 유전자 서열을 마음대로 변형하는 가능성을 제공한다.
- [0650] 우리는 T 세포 항원 수용체 (TRAC)의 알파 사슬을 코드하는 인간 유전자 내 서열을 특이적으로 절단하기 위하여 디자인된 TALE-뉴클레아제를 발현시키기 위하여 mRNA 전기천공법(electroporation)을 사용하였다. 이 서열에 유도된 돌연변이들은 세포 표면으로부터 TCR $\alpha \beta$ 복합체(complex)의 상실 및 유전자 불활성화를 야기할 것으로 기대된다. 대조군으로서 코드하지 않는(non coding) RNA 또는 TRAC TALE-뉴클레아제 RNA가 사이토피스(Cytopulse) 기술을 이용하여 활성화된 일차(primary) 인간 T 림프구들 내로 형질감염된다(transfect). 전기천공법(electroporation) 서열은 1200 V의 2 펄스들로 구성되었고, 뒤이어 표 15에서 기재된 대로 130 V의 네 개의 펄스들이 이어졌다.
- [0652] 전기천공 7 일 후 TCR 표면 발현의 유동세포분석법(flow cytometry) 분석에 의하여(도 19, 위쪽 패널), 우리는 44%의 T 세포들이 TCR $\alpha \beta$ 의 발현을 상실한 것을 관찰하였다. 우리는 TRAC 위치(locus)의 PCR 증폭에 의하여 형질감염된 세포들의 게놈 DNA를 분석하였고, 뒤이어 454 고처리량(high throughput) 시퀀싱이 이어졌다. 시퀀싱된 대립형질들(alleles) 중 33%(2153 중 727)이 TALE-뉴클레아제 절단(cleavage)의 자리(site)에 삽입 또는 결실을 포함하였다. 도 19 (아래 패널)은 돌연변이된 대립형질들의 예들을 보여준다.

- [0654] 이들 데이터들은 사이토피스(cytoplex) 기술을 이용한 mRNA의 전기천공이 TRAC TALE-뉴클레아제의 기능적 발현을 야기한다는 것을 가리킨다.
- [0656] 항-CD19 단일 사슬 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 모노시스트론(monocistronic) mRNA으로 T 세포들의 전기천공:
- [0657] IL2 및 항-CD3/CD28 코팅된 비드들로 며칠(3-5) 미리활성화된(preactivated) 5×10^6 T 세포들이 사이토피레이션(cytoporation) 버퍼 T에서 재현탁되었고(resuspended), 표 15에서 기재한 프로그램을 이용하여 단일 사슬 CAR (서열번호: 73)를 코딩하는 mRNA 10 μ g 또는 mRNA 없이 0.4cm 큐벳(cuvettes)에서 전기천공되었다.
- [0659] 전기천공법(electroporation) 24 시간 후, 세포들은 살아있는(live) 세포들 상 CAR의 세포 표면 발현을 평가하는데 특이적인 PE-콘주게이트(conjugated)된 염소 항 마우스 IgG F(ab')₂ 단편 및 고정가능한 생존능력(viability) 염료 eFluor-780로 염색되었다. 데이터들은 도 20에 보여진다. A 는 전에 기재된 모노시스트론(monocistronic) mRNA로 전기천공된 살아있는 T 세포들의 압도적인 다수가 그것들의 표면에서 CAR를 발현한다는 것을 가리킨다. 전기천공 24 시간 후, T 세포들은 Daudi (CD19+) 세포들과 6 시간 동안 공배양(coculture)되었고 그것들의 표면에서 탈과립화 마커 CD107a의 발현을 검출하기 위하여 유동세포분석법(flow cytometry)에 의하여 분석되었다(Betts, Brenchley et al. 2003).
- [0661] 도 20에 보여지는 데이터는 전에 기재되었던 모노시스트론(monocistronic) mRNA로 전기천공된 세포들의 다수가 CD19를 발현시키는 타겟 세포들의 존재 하 탈과립된다(degranulate)는 것을 가리킨다. 이들 결과들은 전기천공된 T 세포들의 표면에서 발현되는 CAR가 활성(active)이라는 것을 명확히 입증한다.
- [0663] 항-CD19 멀티서브유닛(multisubunit) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 폴리시스트론(polycistronic) mRNA로 T 세포들의 전기천공:
- [0664] IL2 및 항 CD3/CD28 코팅된 비드들로 며칠 (3-5) 미리활성화된(preactivated) 5×10^6 T 세포들이 사이토피레이션(cytoporation) 버퍼 T에서 전기천공되었고, 표 15에 기재된 대로 프로그램을 이용하여 (서열번호: 125, 서열번호: 126에 의하여 코딩됨, 도 21A 및 도 4B (csm4)), 다사슬(multi-chain) CAR를 코딩하는 mRNA 45 μ g 또는 mRNA 없이 0.4cm 큐벳(cuvettes)에서 전기천공되었다.
- [0666] 전기천공 24 시간 후, 세포들은 살아있는(live) 세포들 상 CAR 의 세포 표면 발현을 평가하는데 특이적인, PE-콘주게이트된(conjugated) 염소 항 마우스 IgG F(ab')₂ 단편 및 고정가능한 생존능력(viability) dye eFluor-780으로 염색되었다. 도 21에 보여지는 데이터들은 전에 기재한 폴리시스트론(polycistronic) mRNA로 전기천공된 살아있는 T 세포들의 압도적인 다수가 그것들의 표면에서 CAR를 발현시킨다는 것을 가리킨다.
- [0668] 전기천공 24 시간 후, T 세포들은 6 시간 동안 Daudi (CD19+)와 공배양되었고, 그것들의 표면에서 탈과립화(degranulation) 마커(marker) CD107a의 발현을 검출하기 위하여 유동세포분석법(flow cytometry)에 의하여 분석되었다. 도 21에 보여지는 데이터들은 전에 기재되었던 폴리시스트론(polycistronic) mRNA로 전기천공된 세포들의 다수가 CD19를 발현하는 타겟 세포들의 존재 하 탈과립된다(degranulate)는 것을 가리킨다. 이들 결과들은 전기천공된 T 세포들의 표면에서 발현되는 CAR가 활성(active)이라는 것을 명백히 입증한다.
- [0670] 본 명세서에서 인용한 문헌들의 리스트
- [0671] 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.

- [0672] 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.
- [0673] Ashwell, J. D. and R. D. Klusner (1990). "Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor." *Annu Rev Immunol* 8: 139-67.
- [0674] Betts, M. R., J. M. Brenchley, et al. (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." *J Immunol Methods* 281(1-2): 65-78.
- [0675] Boch, J., H. Scholze, et al. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." *Science* 326(5959): 1509-12.
- [0676] 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.
- [0677] 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.
- [0678] Cambier, J. C. (1995). "Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)." *J Immunol* 155(7): 3281-5.
- [0679] Carrasco, Y. R., A. R. Ramiro, et al. (2001). "An endoplasmic reticulum retention function for the cytoplasmic tail of the human pre-T cell receptor (TCR) alpha chain: potential role in the regulation of cell surface pre-TCR expression levels." *J Exp Med* 193(9): 1045-58.
- [0680] 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.
- [0681] Chames, P., J. C. Epinat, et al. (2005). "In vivo selection of engineered homing endonucleases using double-strand break induced homologous recombination." *Nucleic Acids Res* 33(20): e178.
- [0682] Choulika, A., A. Perrin, et al. (1995). "Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 15(4): 1968-73.
- [0683] Christian, M., T. Cermak, et al. (2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases." *Genetics* 186(2): 757-61.
- [0684] 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.
- [0685] Critchlow, S. E. and S. P. Jackson (1998). "DNA end-joining: from yeast to man." *Trends Biochem Sci* 23(10): 394-8.
- [0686] Deng, D., C. Yan, et al. (2012). "Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors." *Science* 335(6069): 720-3.
- [0687] Eisenschmidt, K., T. Lanio, et al. (2005). "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage." *Nucleic Acids Res* 33(22): 7039-47.
- [0688] Epinat, J. C., S. Arnould, et al. (2003). "A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells." *Nucleic Acids Res* 31(11): 2952-62.
- [0689] Geissler, R., H. Scholze, et al. (2011). "Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity." *PLoS One* 6(5): e19509.
- [0690] Howard, F. D., H. R. Rodewald, et al. (1990). "CD3 zeta subunit can substitute for the gamma subunit of Fc epsilon receptor type I in assembly and functional expression of the high-affinity IgE receptor: evidence for interreceptor complementation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(18): 7015-9.

- [0691] Huang, P., A. Xiao, et al. (2011). "Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs." *Nat Biotechnol* 29(8): 699-700.
- [0692] Jena, B., G. Dotti, et al. (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." *Blood* 116(7): 1035-44.
- [0693] Kalish, J. M. and P. M. Glazer (2005). "Targeted genome modification via triple helix formation." *Ann N Y Acad Sci* 1058: 151-61.
- [0694] 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.
- [0695] 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.
- [0696] 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.
- [0697] 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.
- [0698] 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.
- [0699] 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.
- [0700] Mak, A. N., P. Bradley, et al. (2012). "The crystal structure of TAL effector PthXol1 bound to its DNA target." *Science* 335(6069): 716-9.
- [0701] Metzger, H., G. Alcaraz, et al. (1986). "The receptor with high affinity for immunoglobulin E." *Annu Rev Immunol* 4: 419-70.
- [0702] Miller, J. C., S. Tan, et al. (2011). "A TALE nuclease architecture for efficient genome editing." *Nat Biotechnol* 29(2): 143-8.
- [0703] 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.
- [0704] Moscou, M. J. and A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." *Science* 326(5959): 1501.
- [0705] 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.
- [0706] Pang, S. S., R. Berry, et al. (2010). "The structural basis for autonomous dimerization of the pre-T-cell antigen receptor." *Nature* 467(7317): 844-8.
- [0707] 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.
- [0708] Pardoll, D. and C. Drake (2012). "Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy." *J Exp Med* 209(2): 201-9.
- [0709] Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* 12(4): 252-64.
- [0710] Park, T. S., S. A. Rosenberg, et al. (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." *Trends Biotechnol* 29(11): 550-7.

- [0711] Pingoud, A. and G. H. Silva (2007). "Precision genome surgery." Nat Biotechnol 25(7): 743-4.
- [0712] Porteus, M. H. and D. Carroll (2005). "Gene targeting using zinc finger nucleases." Nat Biotechnol 23(8): 967-73.
- [0713] 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.
- [0714] 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.
- [0715] Saint-Ruf, C., O. Lechner, et al. (1998). "Genomic structure of the human pre-T cell receptor alpha chain and expression of two mRNA isoforms." Eur J Immunol 28(11): 3824-31.
- [0716] Sander, J. D., L. Cade, et al. (2011). "Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs." Nat Biotechnol 29(8): 697-8.
- [0717] Smith, J., S. Grizot, et al. (2006). "A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences." Nucleic Acids Res 34(22): e149.
- [0718] Stoddard, B. L. (2005). "Homing endonuclease structure and function." Q Rev Biophys 38(1): 49-95.
- [0719] Tesson, L., C. Usal, et al. (2011). "Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs." Nat Biotechnol 29(8): 695-6.
- [0720] von Boehmer, H. (2005). "Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate." Nat Rev Immunol 5(7): 571-7.
- [0721] Waldmann, H. and G. Hale (2005). "CAMPATH: from concept to clinic." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 360(1461): 1707-11.
- [0722] Weber, E., R. Gruetzner, et al. (2011). "Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning." PLoS One 6(5): e19722.
- [0723] Yamasaki, S., E. Ishikawa, et al. (2006). "Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development." Nat Immunol 7(1): 67-75.
- [0724] 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

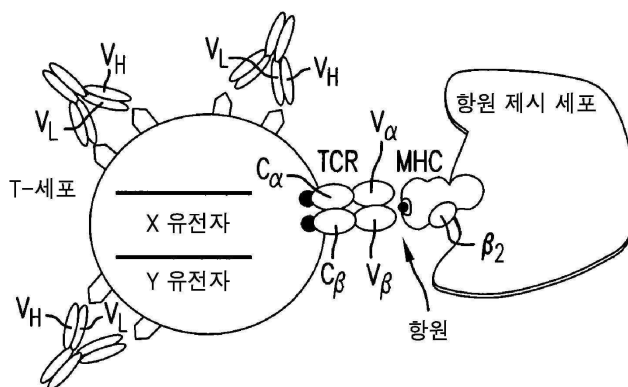


Fig.1

도면2

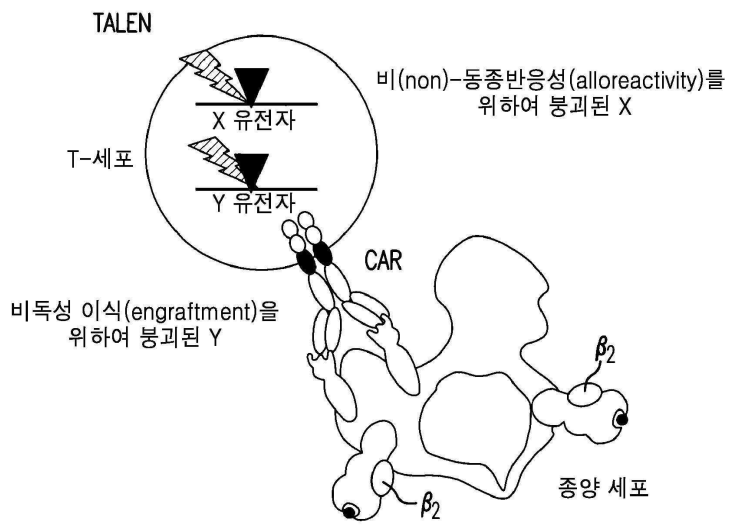
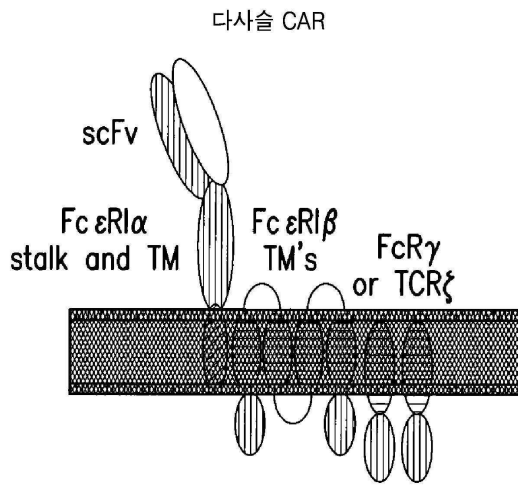


Fig.2

도면3



활성화시키는 신호전달 도메인들

-베타 사슬은 모든 신호전달
도메인들이 가까운막
위치에 있게 한다.

-베타 사슬은 FcRγ 또는
TCR제타로부터 신호들의
상호작용을 위하여 이미
위치하였다.

Fig.3

도면4a

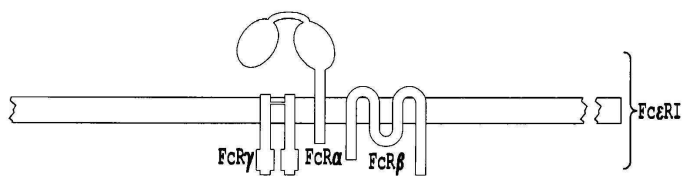
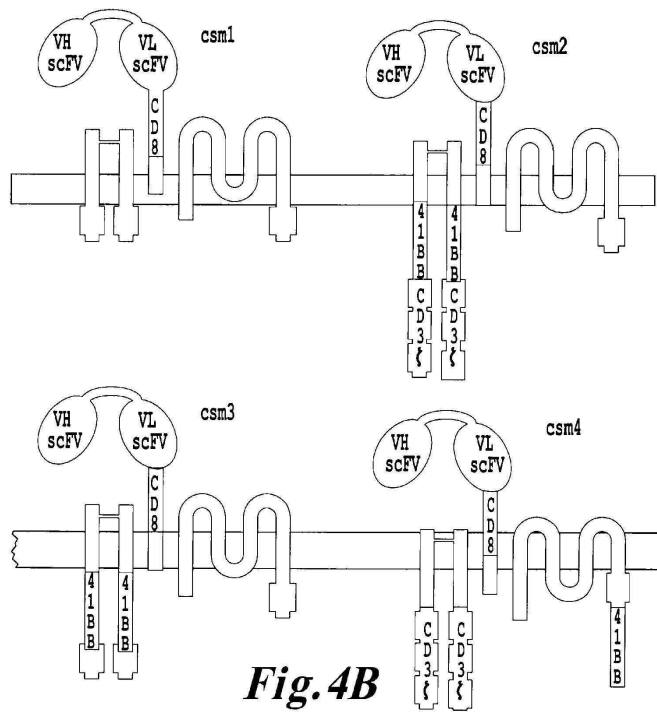
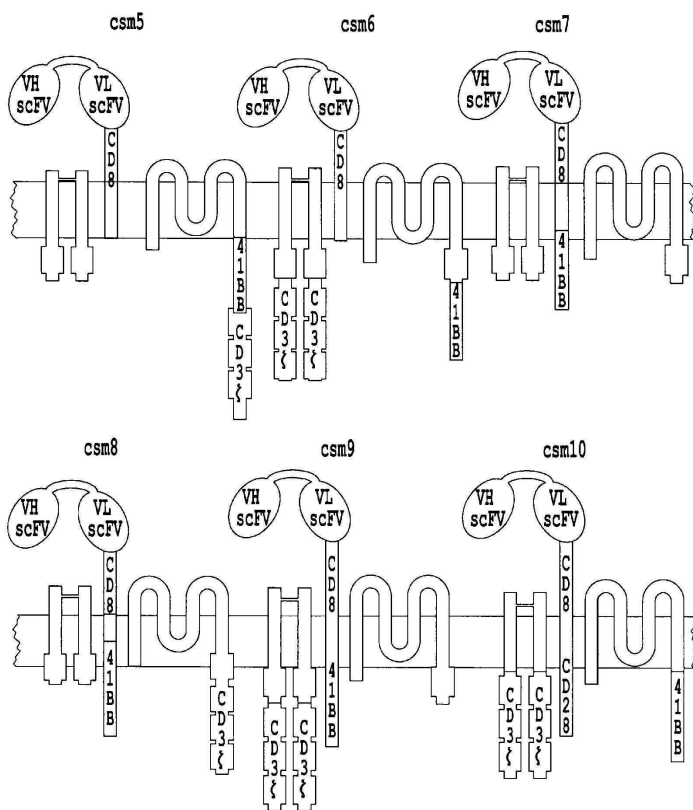


Fig.4A

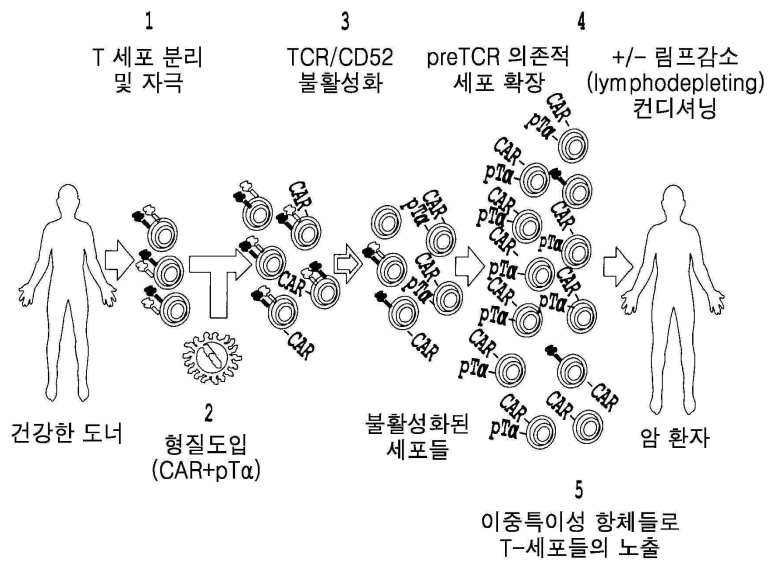
도면4b



도면4c



도면5



- CD52 CD52 봉괴는 화학요법 저항성을 제공한다
- TCR TCRα 봉괴는 동종반응성(alloreactivity)을 제거한다(GvHD)
- CAR T-세포 방향수정/종양 인식
- pTα pre-TCRα(pTα)는 세포 증식을 추진한다

Fig.5

도면6

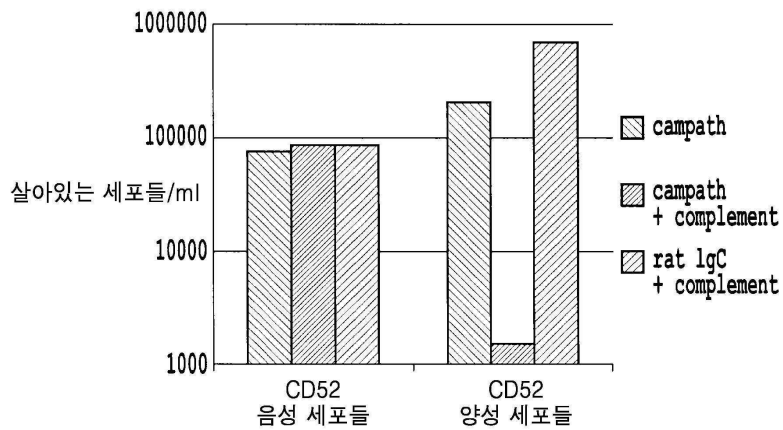


Fig.6

도면7

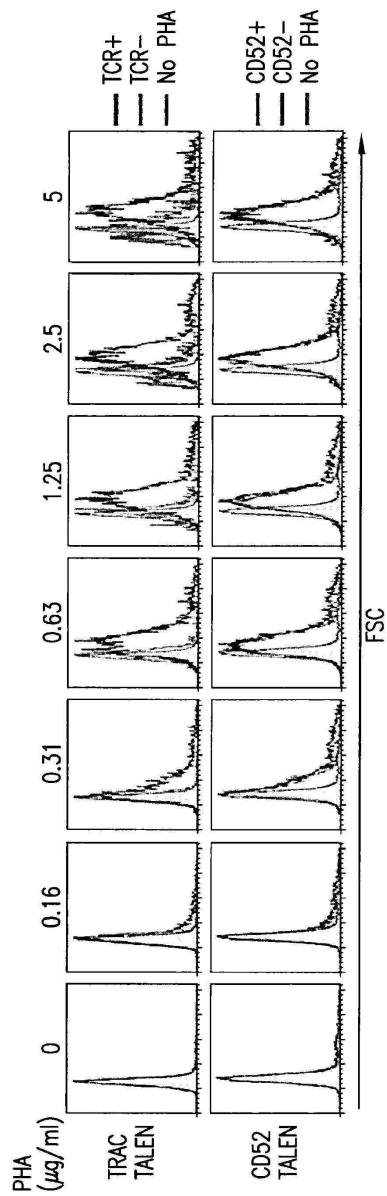


Fig. 7

도면8a

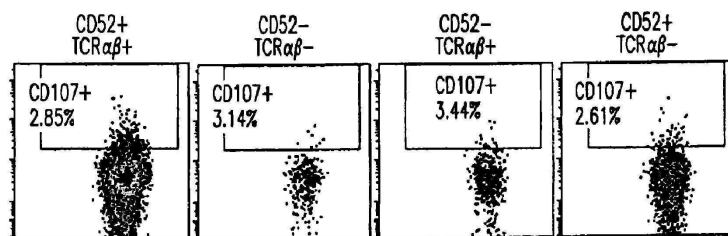


Fig. 8A

도면8b

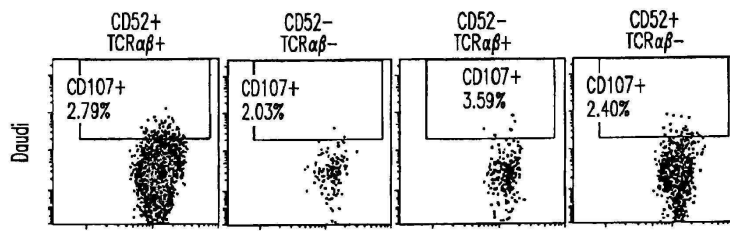


Fig.8B

도면8c

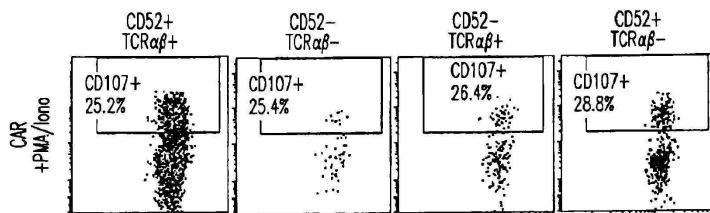


Fig.8C

도면8d

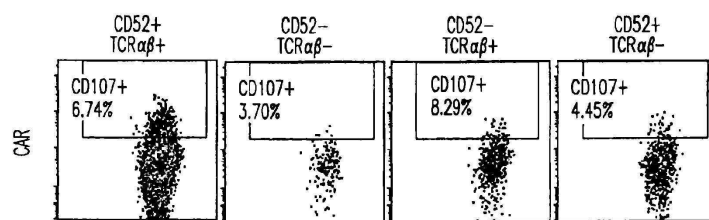


Fig.8D

도면8e

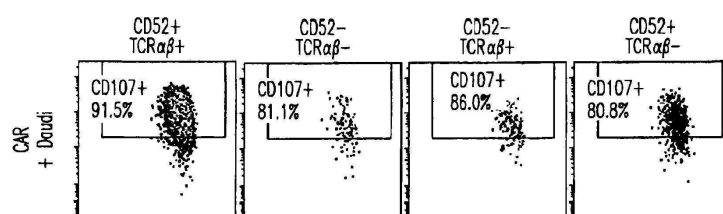


Fig.8E

도면9a

| | 왼쪽 반 타겟 | 스페이스 크기 (bp) | 오른쪽 반 타겟 | |
|---------------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------|
| TRAC | TTGTCCACAGATATCC | 15 | CCGTGTACCCAGCTGAGA | |
| CD52 | TTCCTCCTACTCACCAT | 15 | GGTACAGGTAAGAGCA A | |
| Potential offsite targets | Left matched sequence | Spacer size (bp) | Right matched sequence | Mis- matc hes |
| 1 | ttgtctcCaccAgtaTA | 25 | TtTcaggtaagTgcaa | 8 |
| 2 | tCActcttacctgGacc | 19 | CCtacaggttaagGgcCa | 7 |
| 3 | tctcagAtgAtacacCC | 24 | AgtacaggCaTgagcCa | 8 |
| 4 | tGAtcccacagaAatAc | 18 | gCatTtctgtgggaTca | 8 |
| 5 | ttCctctAacctgtaTT | 25 | gAtCcaggtaagGTcaa | 8 |
| 6 | tAgteccCagatatGA | 19 | aAggtgTgGaTgaggaa | 8 |
| 7 | ttgtcAcacaTataCcG | 21 | TgGtatTtgtgTgacaa | 8 |
| 8 | tAActcttacctgtaGT | 16 | AgatTtctCtgggGcaa | 8 |
| 9 | ttActccAactAacTat | 16 | ccgtTtaccGgctTaga | 7 |
| 10 | tGgctcAtacctgtaGT | 14 | aGgAtgagGTggaggaa | 8 |
| 11 | ttgctcAtacAtgtGcA | 21 | atgCtgTgtaggTggTa | 8 |
| 12 | ttgtcccacagaCatTc | 18 | ccACgtaGcagctgGga | 6 |
| 13 | tcAcaCctggtacaTAg | 27 | GtgTtTagtaggGggaa | 8 |
| 14 | ttgtcccacagCtaCcc | 29 | gAgtCtTtgtAggacaa | 6 |
| 15 | tctcaActgAAacaAgg | 23 | TgtaAtgTcaagagcaa | 8 |

Fig. 9A

도면9b

| | 대조군 형질감염 (RNA 없음) | | | CD52-TALEN+TRAC+TALEN 형질감염 | | |
|---------------------|----------------------|------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------|-----------------------|
| | 분석된 Nb 서열 | Nb 삽입- 결실들 | 빈도 삽입- 결실들 (미만) | 분석된 Nb 서열 | Nb 삽입- 결실들 | 빈도 삽입- 결실들 (미만) |
| | 3965 | 0 | 2.52E-04 | 7560 | 3371 | 0.44 |
| | 1046 | 0 | 9.56E-04 | 2266 | 1056 | 0.47 |
| Matched sequence | | | | | | |
| CD52-R_TRAC-R | 7132 | 0 | 1.4E-04 | 7644 | 1 | 1.3E-04 |
| CD52-R_TRAC-R | 6431 | 0 | 1.6E-04 | 7377 | 2 | 2.7E-04 |
| CD52-R_TRAC-R | 2771 | 0 | 3.6E-04 | 2704 | 80 | 3.7E-04 |
| TRAC-L_CD52-L | 5525 | 0 | 1.8E-04 | 4739 | 0 | 2.1E-04 |
| CD52-R_TRAC-R | 27958 | 0 | 3.6E-05 | 16646 | 0 | 6.0E-05 |
| TRAC-L_CD52-L | 22456 | 0 | 4.5E-05 | 32912 | 10 | 3.0E-04 |
| TRAC-L_CD52-L | 8275 | 0 | 1.2E-04 | 5629 | 0 | 1.8E-04 |
| TRAC-L_CD52-R | 23253 | 0 | 4.3E-05 | 22054 | 16 | 7.3E-04 |
| CD52-L_TRAC-R | 13371 | 0 | 7.5E-05 | 13688 | 1 | 7.3E-05 |
| CD52 | 22856 | 0 | 4.4E-05 | 31292 | 0 | 3.2E-05 |
| CD52 | 3238 | 1 | 3.1E-04 | 3064 | 0 | 3.3E-04 |
| TRAC | 4530 | 0 | 2.2E-04 | 4652 | 0 | 2.1E-04 |
| CD52-L_TRAC-R | 17361 | 0 | 5.8E-05 | 14454 | 0 | 6.9E-05 |
| TRAC-L_CD52-L | 32823 | 0 | 3.0E-05 | 33911 | 1 | 2.9E-05 |
| CD52-R_TRAC-R | 6479 | 0 | 1.5E-04 | 6088 | 0 | 1.6E-04 |

Fig. 9B

도면10

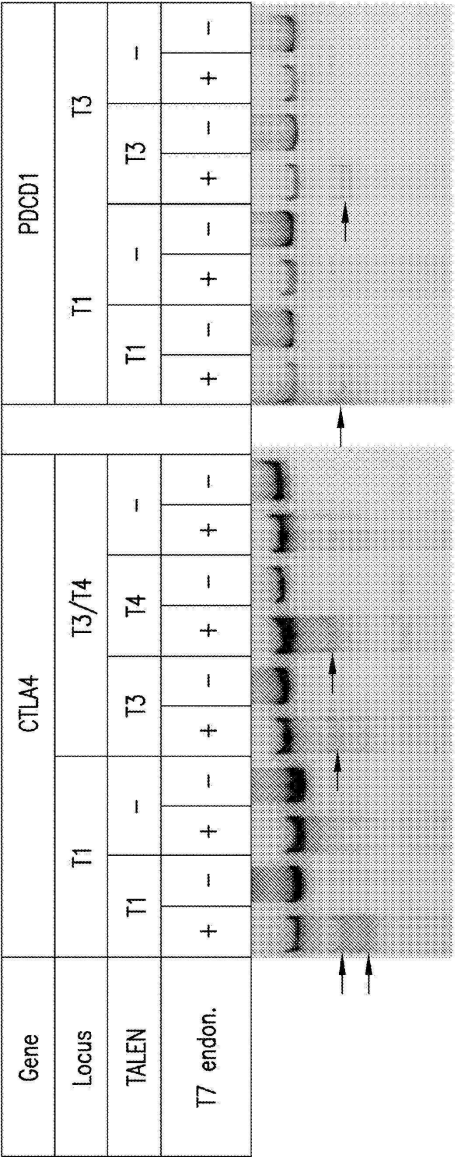


Fig.10

도면11

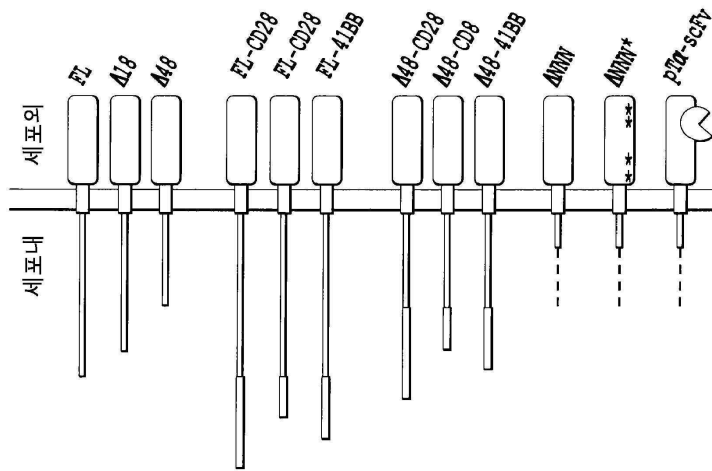


Fig. 11

도면12

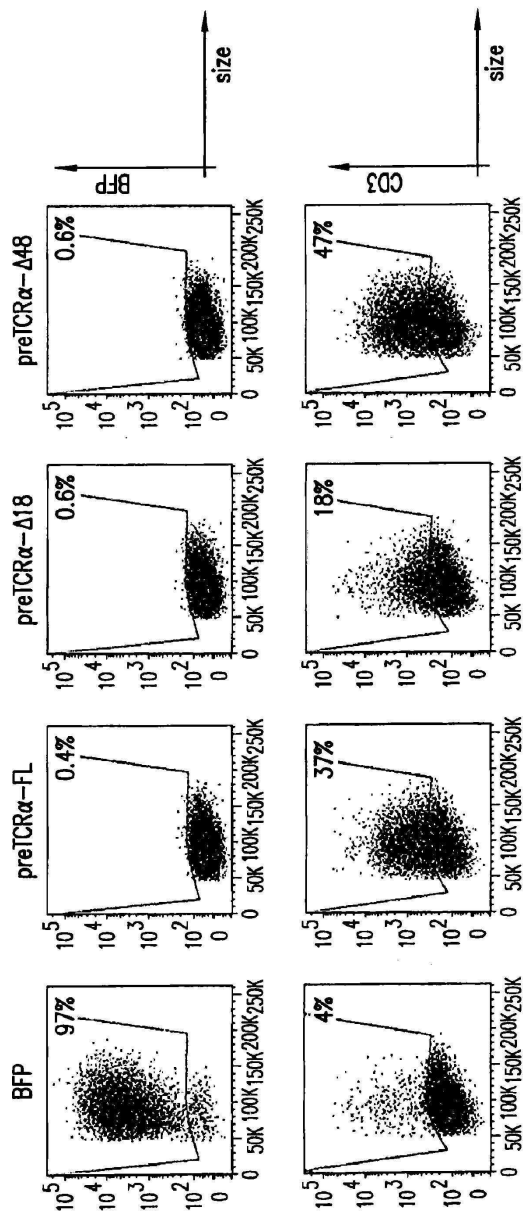


Fig.12

도면13



Fig.13

도면14a

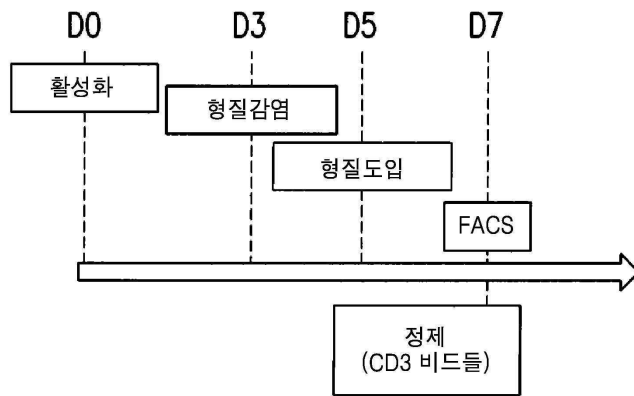


Fig.14A

도면14b

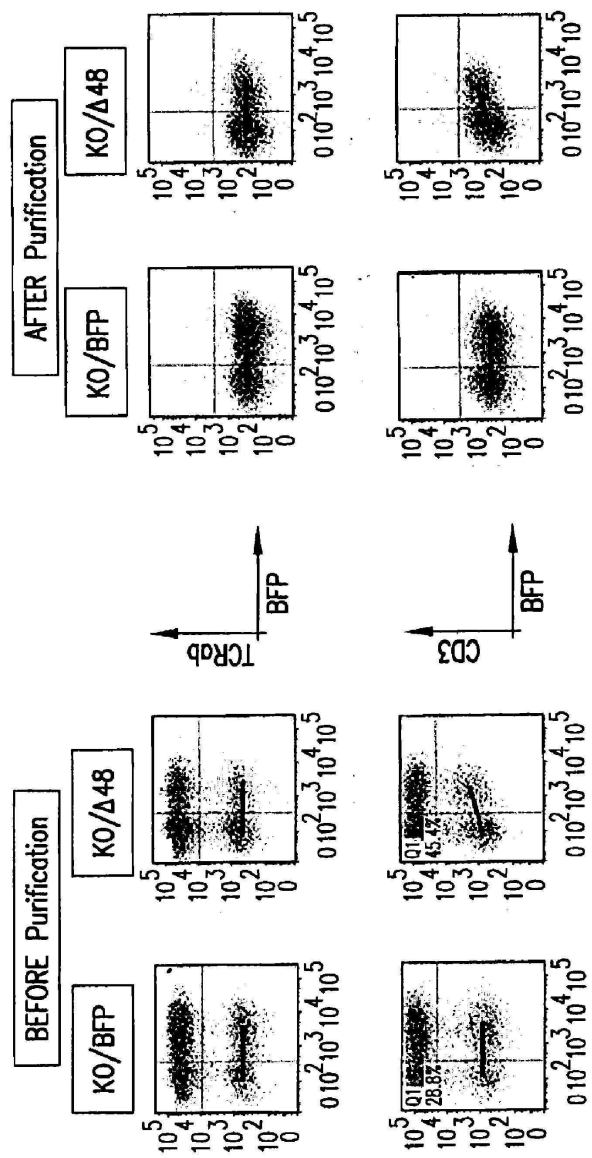


Fig. 14B

도면14c

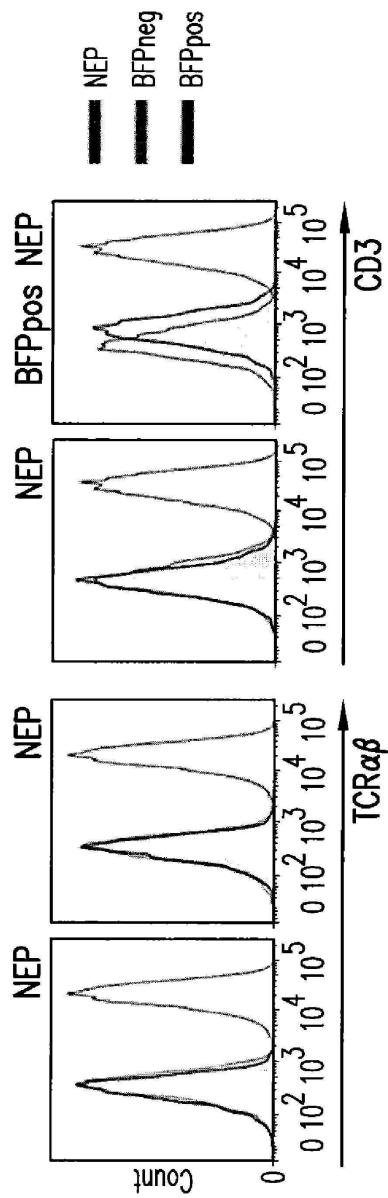


Fig.14C

도면15a

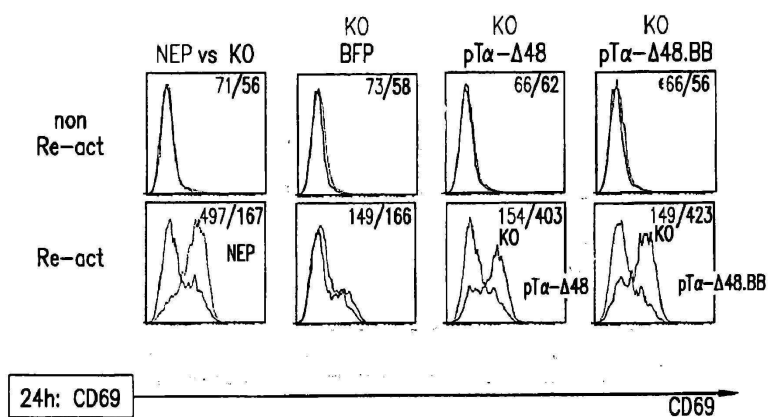


Fig.15A

도면15b

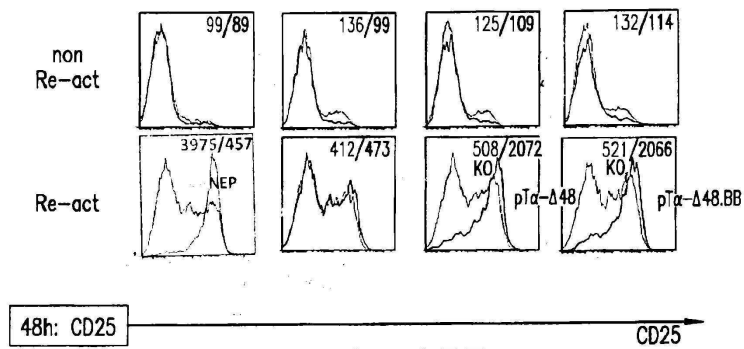


Fig.15B

도면15c

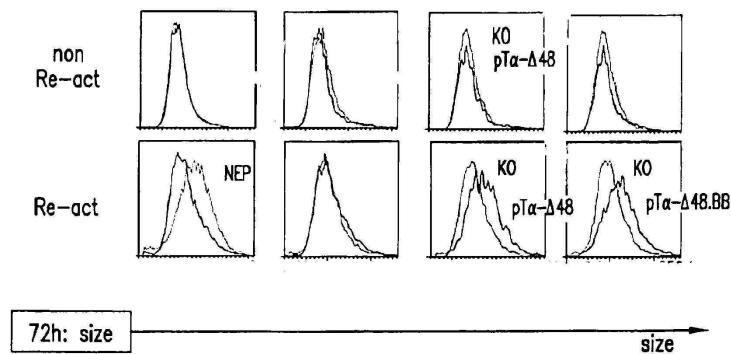


Fig.15C

도면16a

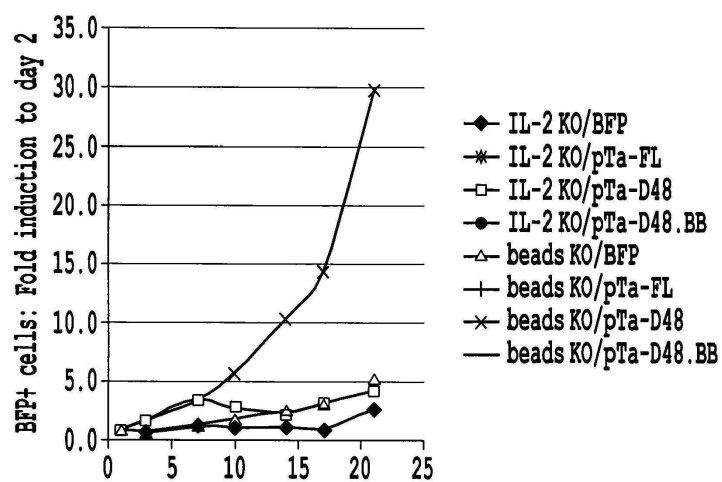


Fig.16A

도면16b

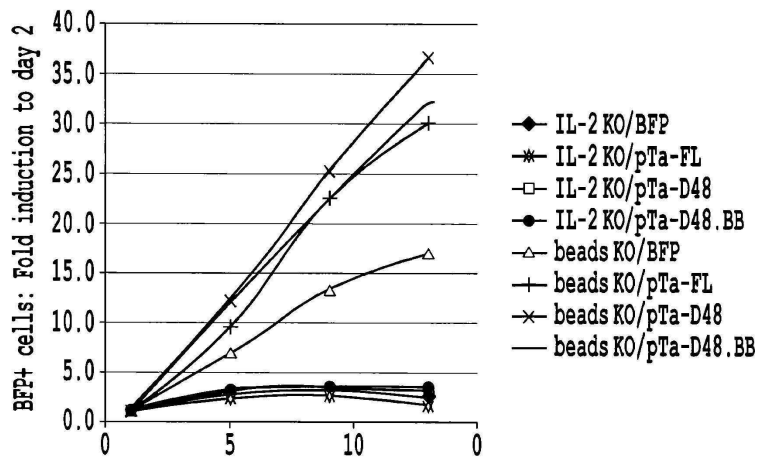


Fig. 16B

도면17a

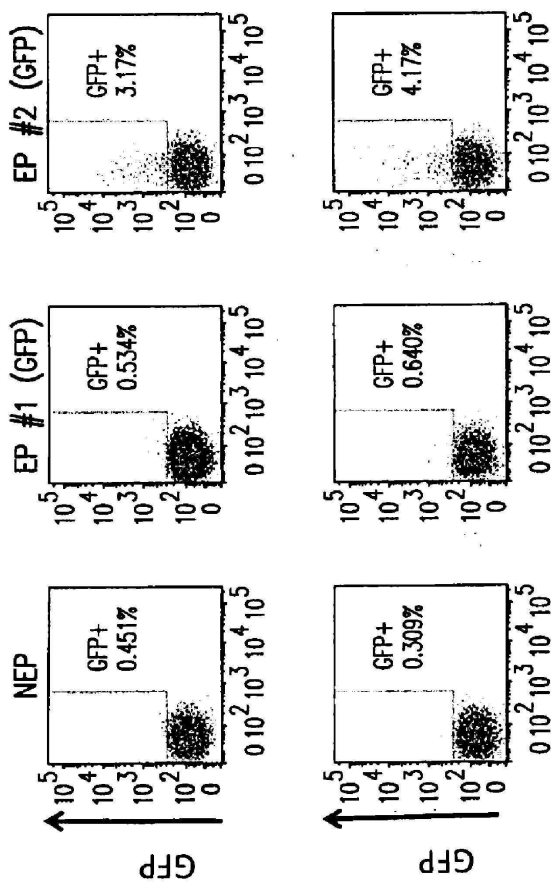


Fig. 17

도면17b

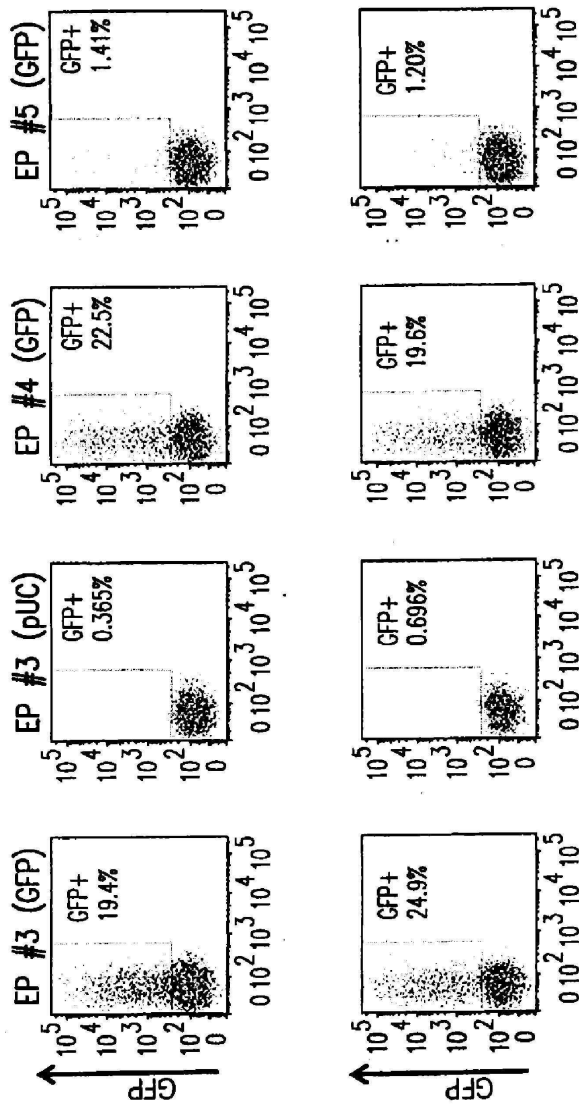


Fig. 17-1

도면18a

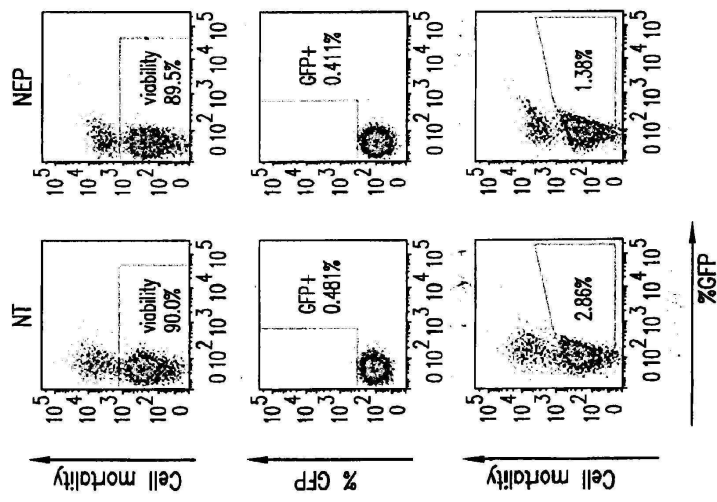


Fig. 18

도면18b

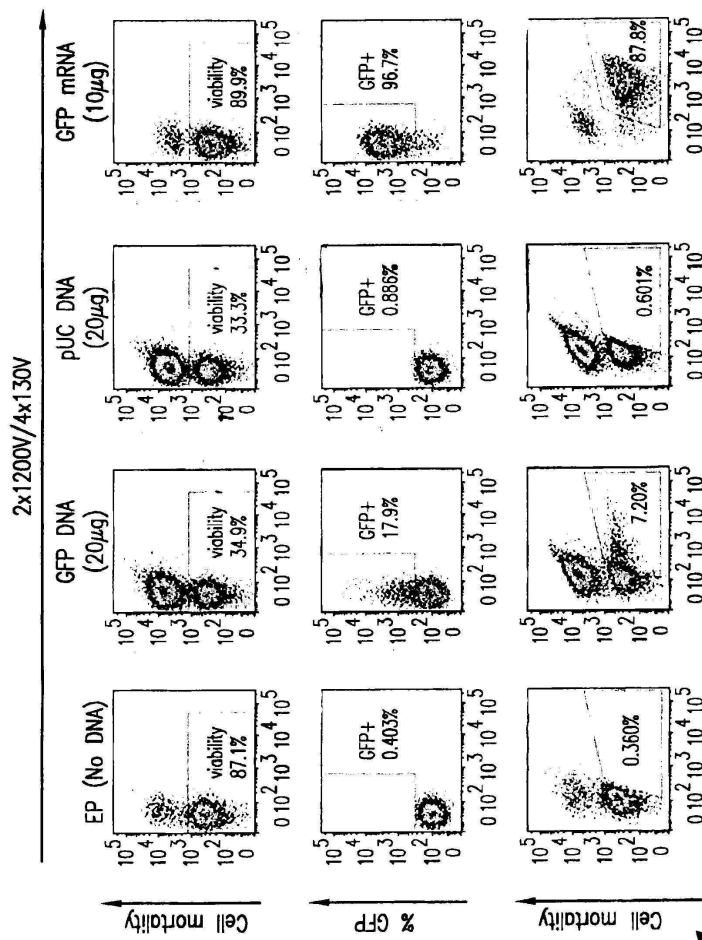


Fig.18-1

도면20a

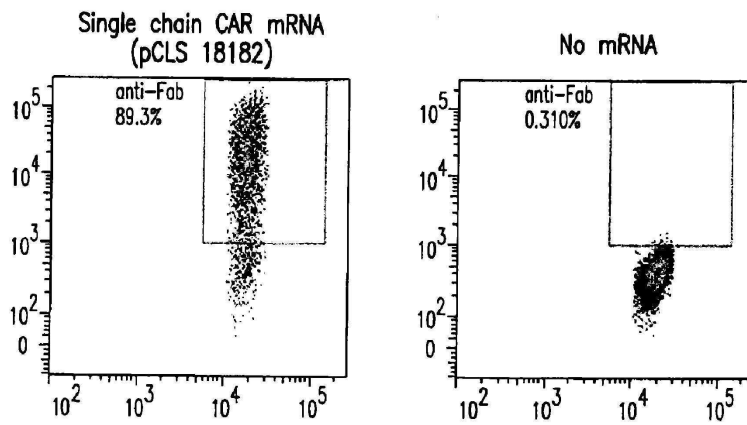


Fig.20A

도면20b

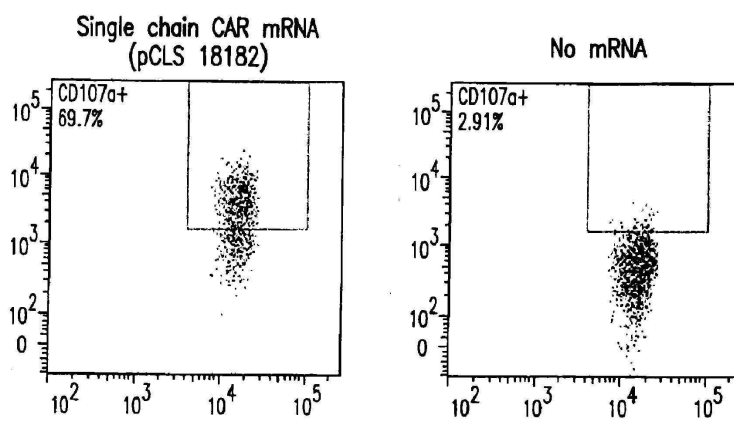


Fig.20B

도면21a

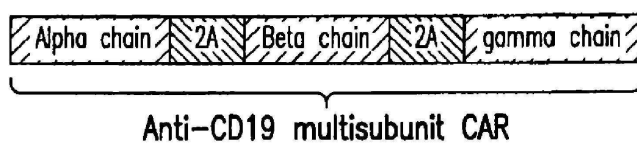


Fig.21A

도면21b

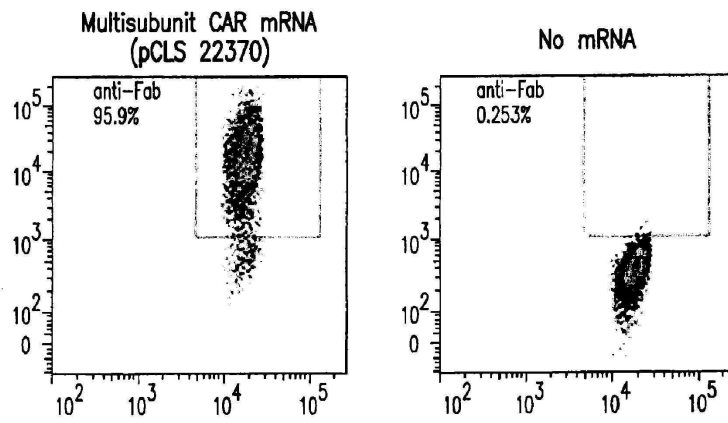


Fig.21B

도면21c

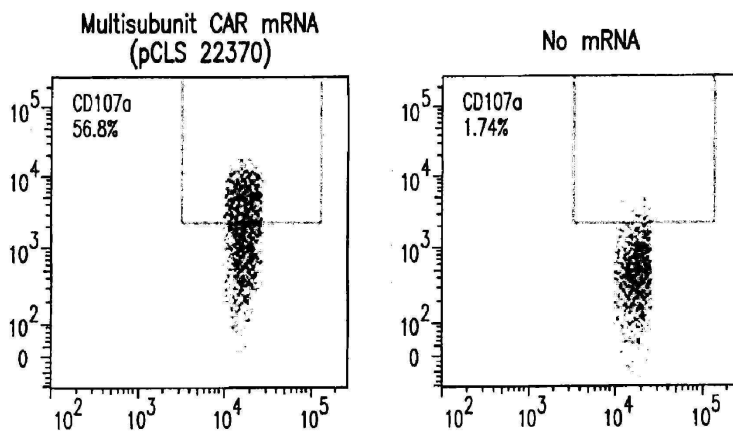


Fig.21C

도면22

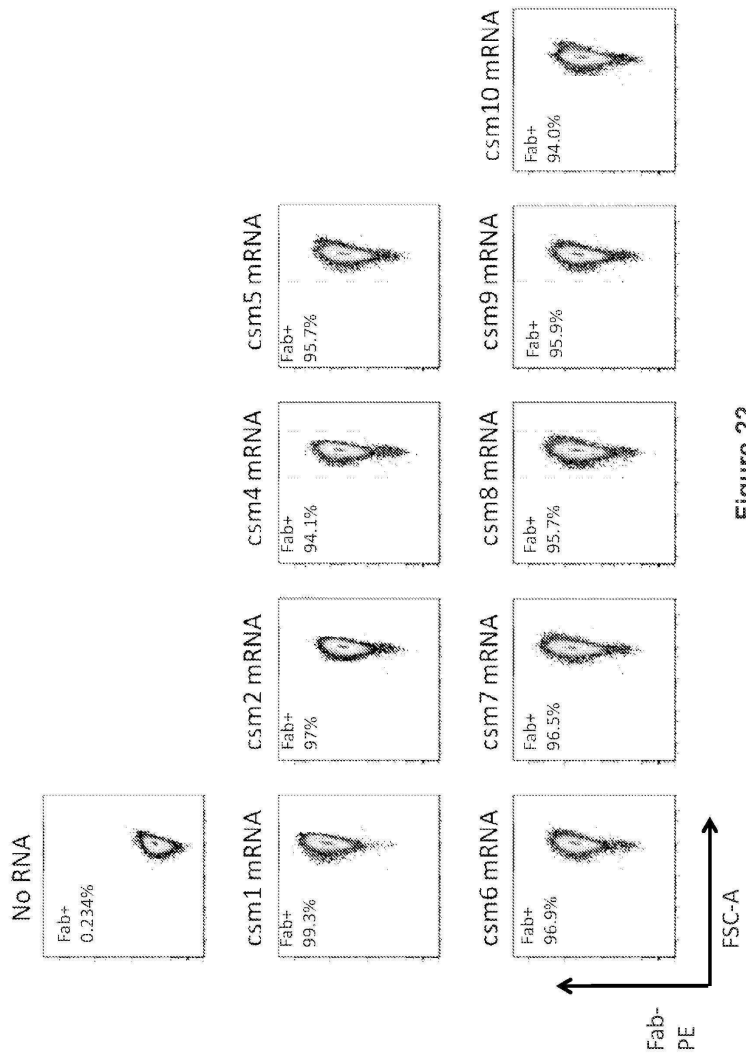


Figure 22

도면23

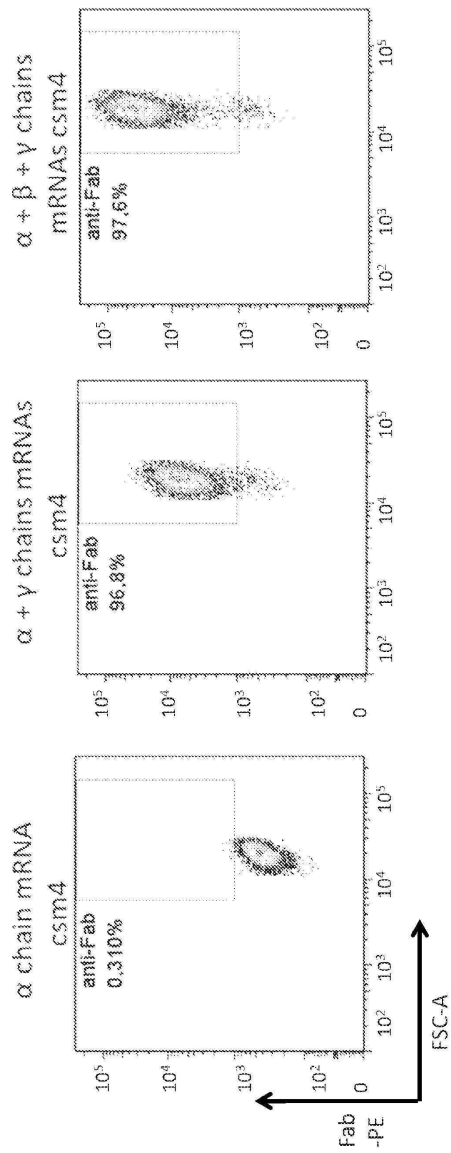


Figure 23

도면24a

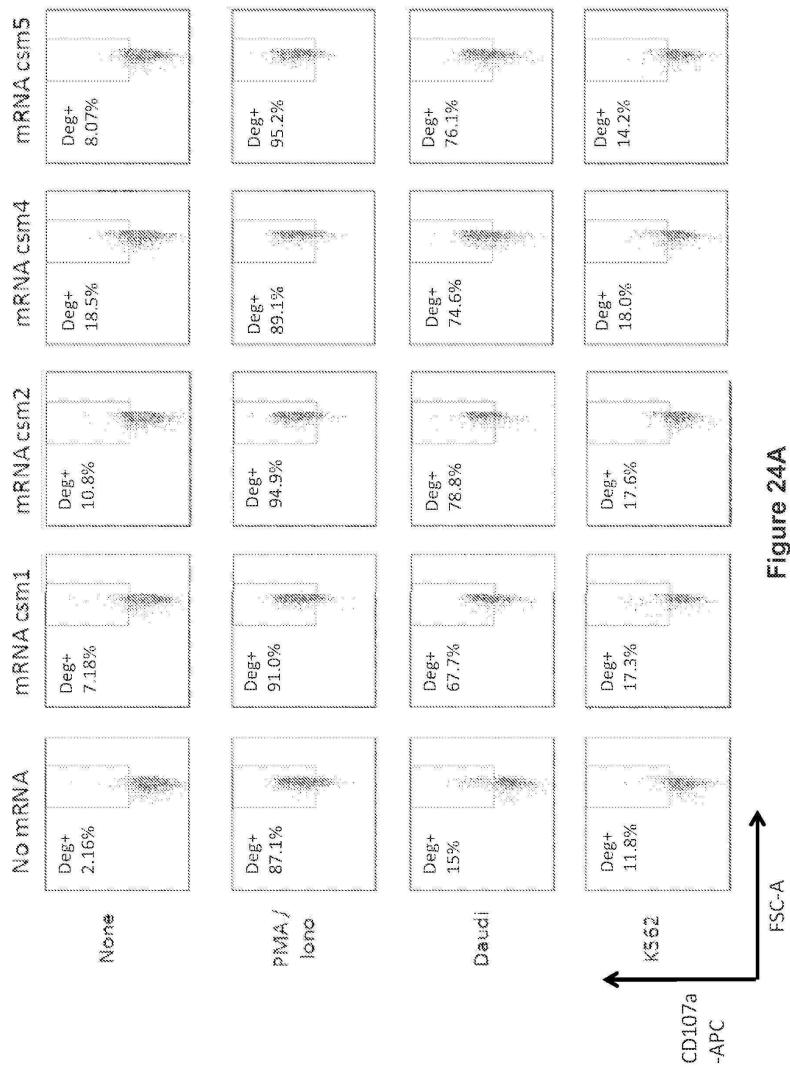
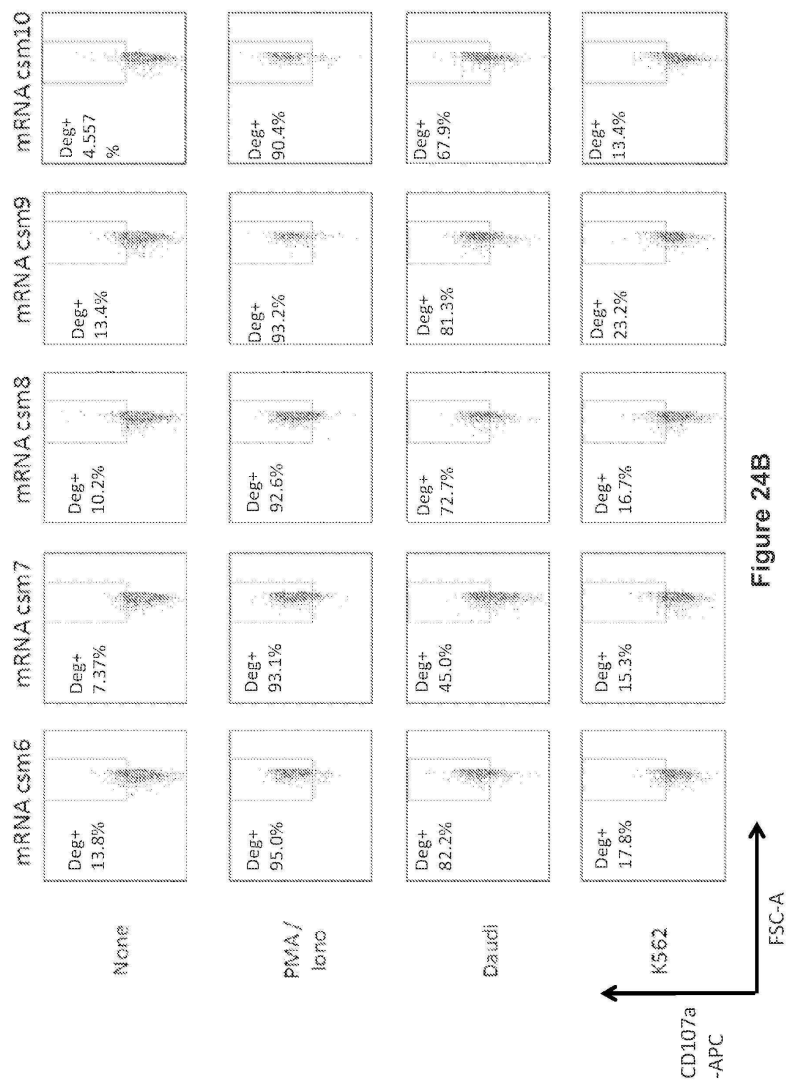


Figure 24A

도면24b



도면25a

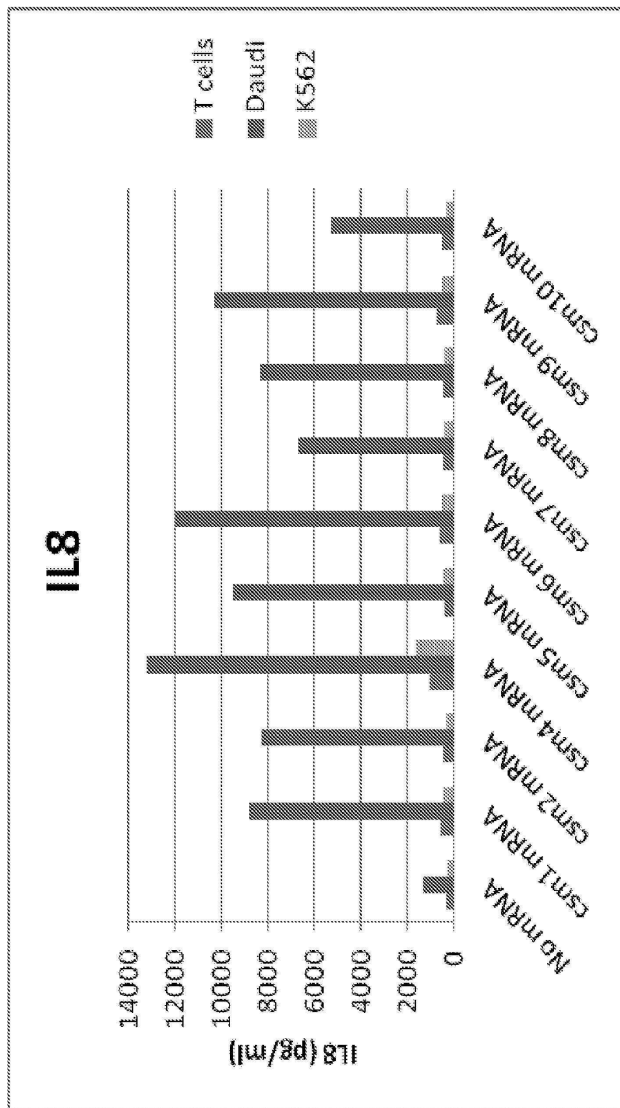


Figure 25A

도면25b

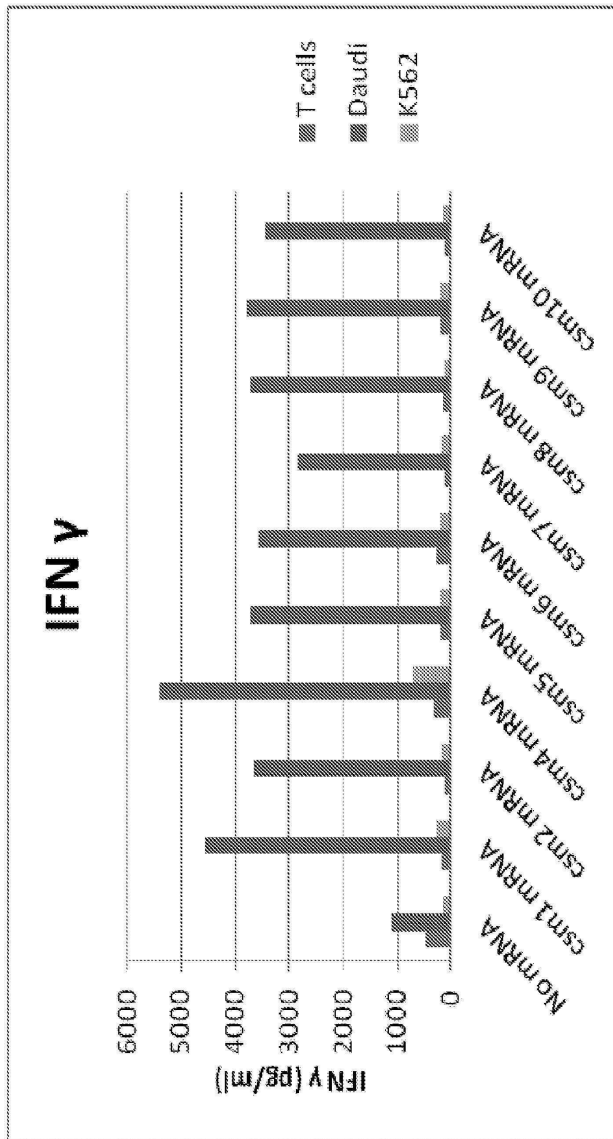


Figure 25B

도면25c

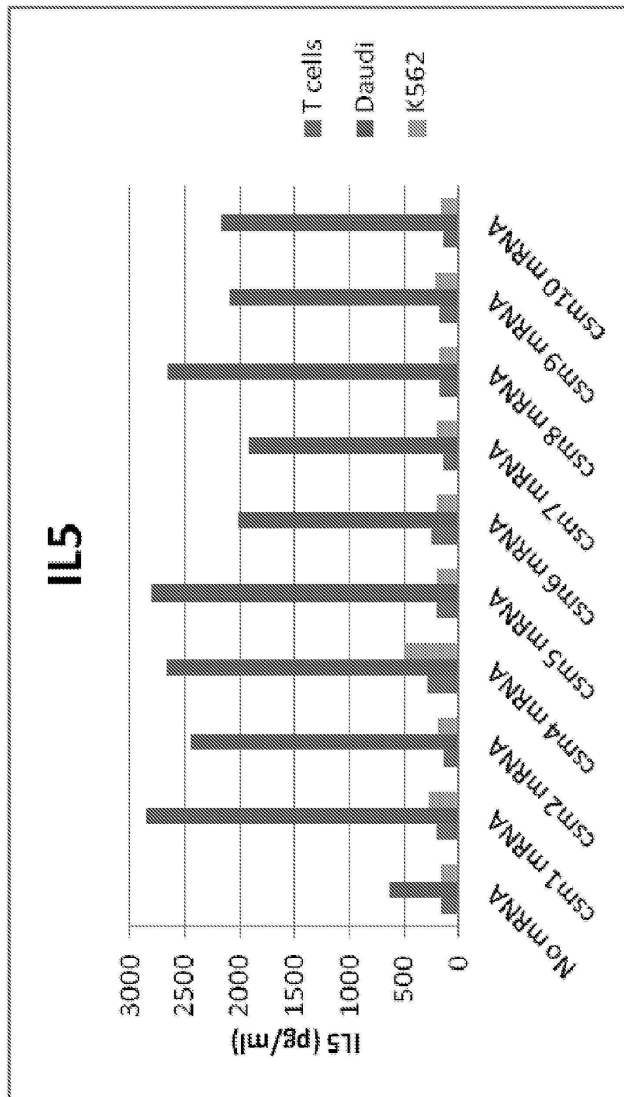


Figure 25C

도면26

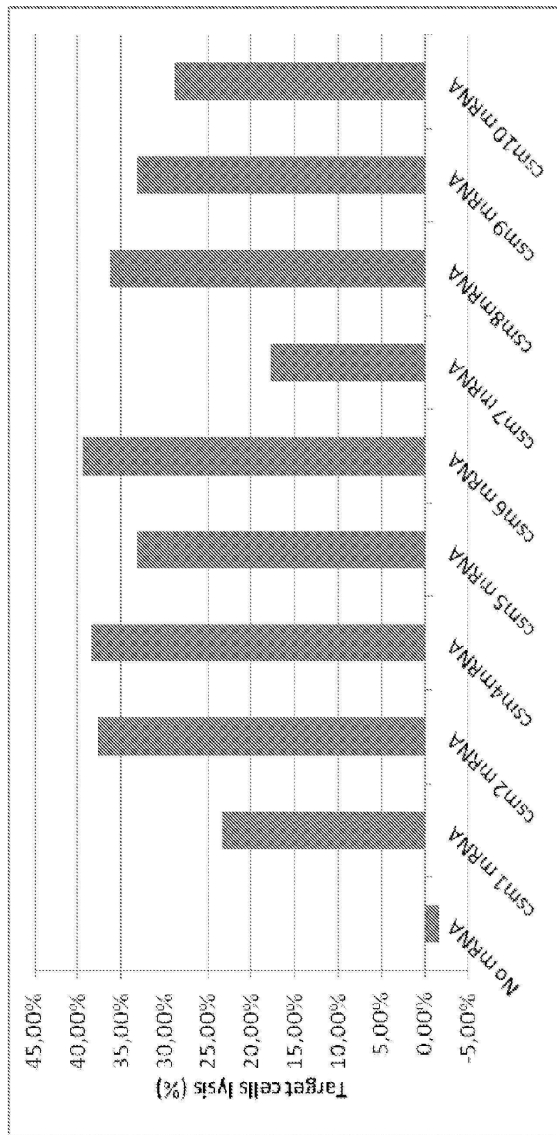
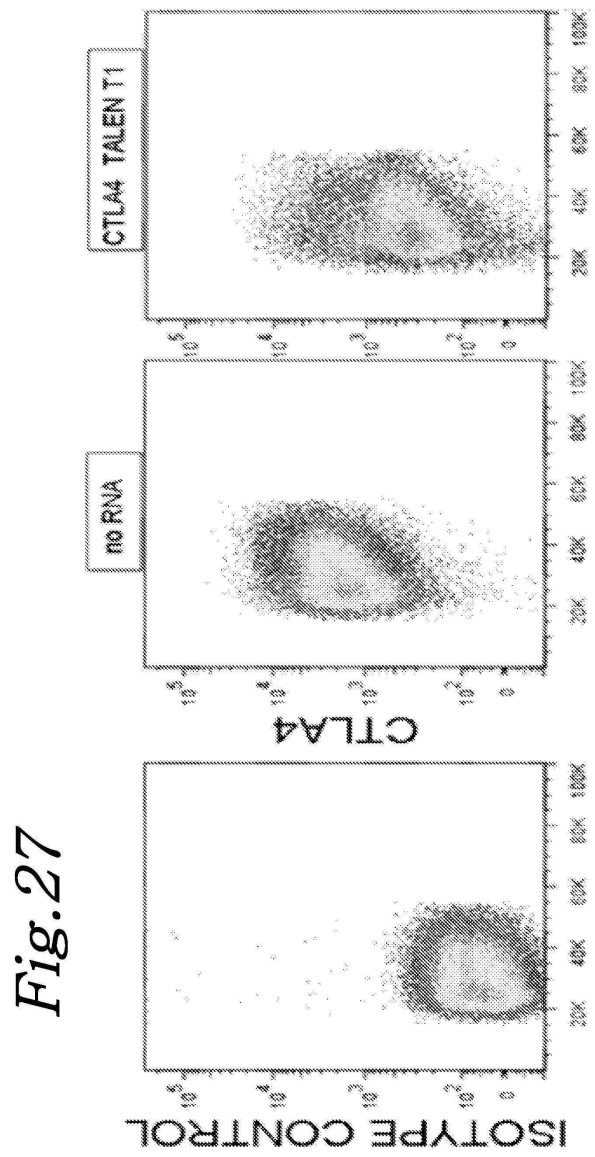
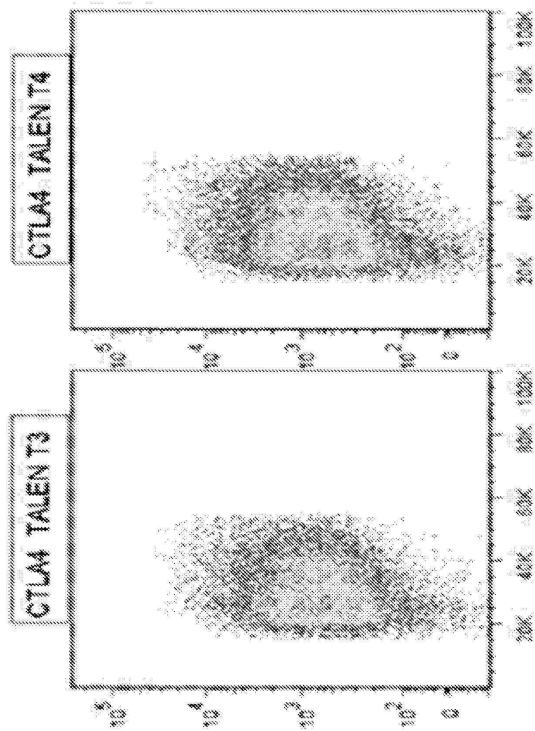


Figure 26

도면27a



도면27b



도면28

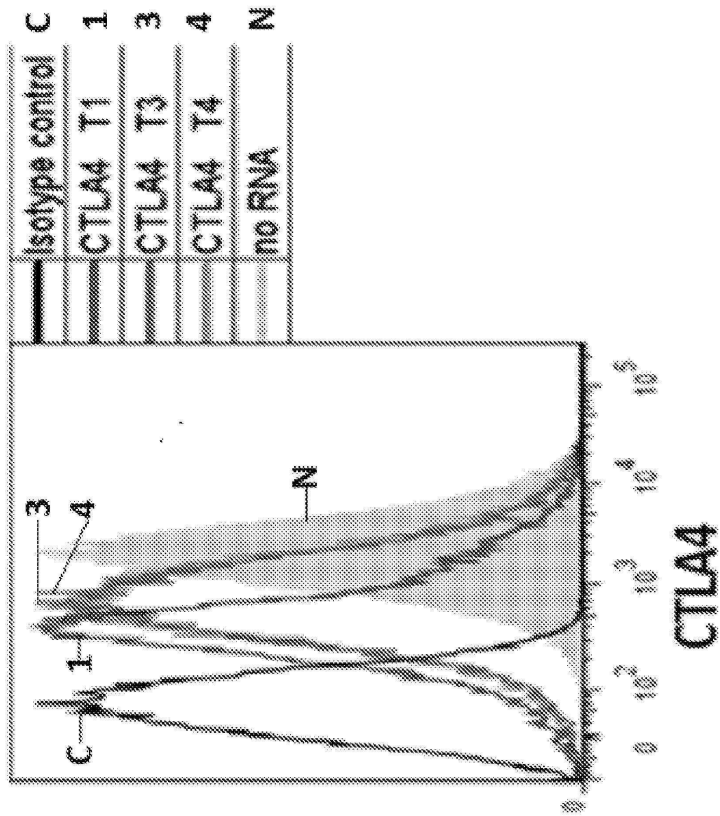


Fig. 28

도면29

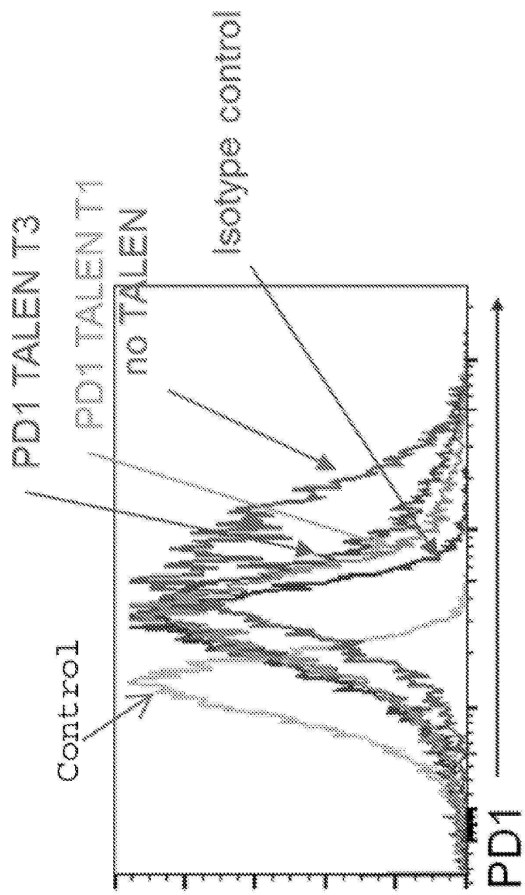


Fig. 29

도면30

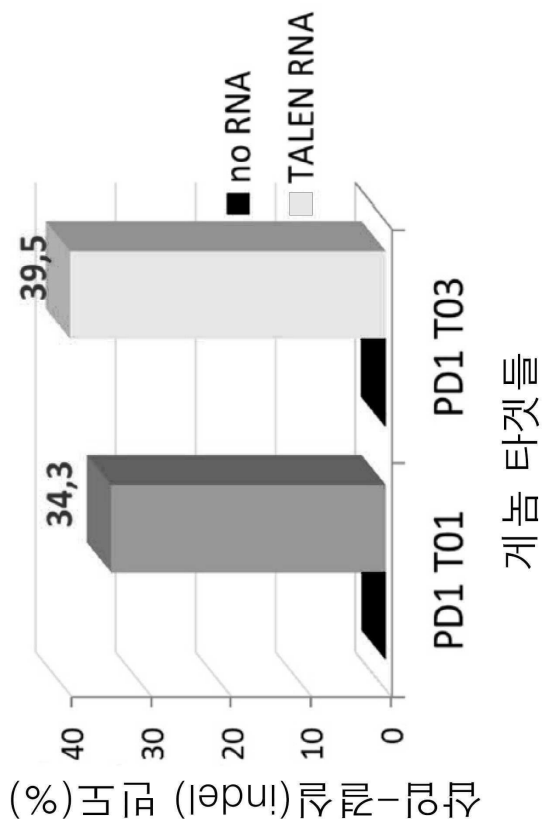


Fig. 30

도면31

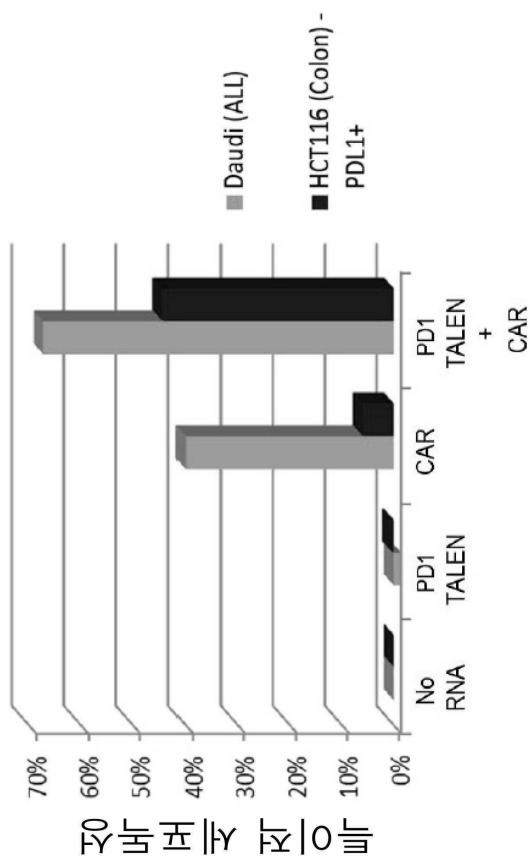


Fig. 31

서열 목록

| | | |
|------------|---|----|
| <110> | GALETTO ROMAN GROSSE STEPHANIE GOUBLE AGNES MANNIOUI CECILE POIROT LAURENT SMITH JULIANNE SCHARENBERG ANDREW CELLECTIS | |
| <120> | METHODS FOR ENGINEERING ALLOGENEIC AND HIGHLY ACTIVE T CELL FOR IMMUNOTHERAPY | |
| <130> | 435147WO (DI2013-18PCT) | |
| <160> | 126 | |
| <170> | PatentIn version 3.5 | |
| <210> | 1 | |
| <211> | 49 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | GRex2 | |
| <400> | 1 | |
| | tattcactga tggactccaa agaatcatta actcctggta gagaagaaa | 49 |
| <210> | 2 | |
| <211> | 49 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | GRex3T2 | |
| <400> | 2 | |
| | tgctgtgtgt gctctgatga agcttcagga tgcattatg gagtcttaa | 49 |
| <210> | 3 | |
| <211> | 49 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | GRex3T4 | |
| <400> | 3 | |

tgctctgatg aagcttcagg atgtcattat ggagtcttaa cttgtggaa 49

<210> 4

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GRex5T1

<400> 4

tgggtgcact gttggaggtt attgaacctg aagtgttata tgcaggata 49

<210> 5

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GRex5T2

<400> 5

tatgatagct ctgttcaga ctcaacttgg aggatcatga ctacgtca 49

<210> 6

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GRex5T3

<400> 6

ttatatgcag gatatgatag ctctgttcca gactcaactt ggaggatca 49

<210> 7

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat-GRex2-LPT9-L1

<400> 7

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly

35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 65 70 75 80

 Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110
 Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 130 135 140
 Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala

 145 150 155 160
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 165 170 175
 Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 195 200 205
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220

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

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

290

295

300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly

305

310

315

320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

325

330

335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

340

345

350

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

355

360

365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

370

375

380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

385

390

395

400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala

405

410

415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala

420

425

430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val

435

440

445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

450

455

460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

465

470

475

480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

485

490

495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

500

505

510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala

515

520

525

Leu Glu

530

<210> 8

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat-GRex2-LPT9-R1

<400> 8

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His

65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala

130 135 140

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val

165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

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

 245 250 255
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
 275 280 285
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
 305 310 315 320

 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 340 345 350
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 355 360 365
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380
 Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

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

| | | | | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------|-----|-----|-----|
| 450 | | 455 | | 460 | |
| Gln Arg Leu Leu Pro Val | Leu Cys Gln Ala His | Gly Leu Thr Pro Gln | | | |
| 465 | | 470 | | 475 | 480 |
| Gln Val Val Ala Ile Ala Ser | Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu | | | | |
| | 485 | | 490 | | 495 |
| Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro | Val Leu Cys Gln Ala His | Gly Leu Thr | | | |
| | 500 | | 505 | | 510 |
| Pro Gln Gln Val Val Ala Ile | Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala | | | | |
| | 515 | | 520 | | 525 |
| Leu Glu | | | | | |

| | |
|------------|---------------------|
| 530 | |
| <210> | 9 |
| <211> | 530 |
| <212> | PRT |
| <213> | Artificial Sequence |
| <220><223> | Repeat-GRex3T2-L1 |
| <400> | 9 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Thr | Pro | Gln | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | Asn | Asn | Gly | Gly | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val | Leu | Cys | Gln | Ala |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| His | Gly | Leu | Thr | Pro | Glu | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | His | Asp | Gly |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val | Leu | Cys |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | | | | |
| Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | Pro | Glu | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | His | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | | | |
| Asp | Gly | Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val | | | | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | |
| Leu | Cys | Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | Pro | Gln | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | | | | |
| 100 | | | | | | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | |
| Ser | Asn | Gly | Gly | Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | | | | |

115 120 125
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 130 135 140
 Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 165 170 175
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 195 200 205
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
 245 250 255
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
 275 280 285
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
 305 310 315 320
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 340 345 350
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 355 360 365

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

 Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 420 425 430
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 435 440 445
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 465 470 475 480
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525
 Leu Glu
 530
 <210> 10
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Repeat-GRex3T2-R1
 <400> 10
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys

 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
65 70 75 80

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

290

295

300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly

305

310

315

320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys

325

330

335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

340

345

350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

355

360

365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

370

375

380

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu

385

390

395

400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala

405

410

415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala

420

425

430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val

435

440

445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

450

455

460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

465

470

475

480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

485

490

495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

500

505

510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala

515

520

525

Leu Glu

530

<210> 11

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat-GRex3T4-L1

<400> 11

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala

130 135 140

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val

165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu

195 200 205
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220
 Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala

 245 250 255
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 275 280 285
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
 305 310 315 320

 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350
 Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
 355 360 365
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380
 Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

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

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----|--|--|--|--|--|
| | | | | | | 450 | | | | | | | | | | | | 455 | | | | | | | | | | | | 460 | | | | | |
| Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val | Leu | Cys | Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | Pro | Gln | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 465 | | | | | | 470 | | | | | | 475 | | | | | | 480 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | Asn | Gly | Gly | Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | 485 | | | | | | 490 | | | | | | 495 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val | Leu | Cys | Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 500 | | | | | | 505 | | | | | | 510 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Gln | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | Asn | Gly | Gly | Gly | Arg | Pro | Ala | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 515 | | | | | | 520 | | | | | | 525 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Glu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | |
|------------|---------------------|
| 530 | |
| <210> | 12 |
| <211> | 530 |
| <212> | PRT |
| <213> | Artificial Sequence |
| <220><223> | Repeat-GRex3T4-R1 |
| <400> | 12 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Thr | Pro | Gln | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | Asn | Gly | Gly | Gly | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val | Leu | Cys | Gln | Ala |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| His | Gly | Leu | Thr | Pro | Glu | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | His | Asp | Gly |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val | Leu | Cys |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | | | | |
| Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | Pro | Glu | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | His | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | | | |
| Asp | Gly | Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val | | | | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | |
| Leu | Cys | Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | Pro | Glu | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | | | | |
| 100 | | | | | | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | |
| Ser | Asn | Ile | Gly | Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Ala | Leu | Leu | | | | |

115 120 125
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 130 135 140
 Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 165 170 175
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190
 Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 195 200 205
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220
 Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
 245 250 255
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
 275 280 285
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 305 310 315 320
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350
 Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
 355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu

530

<210> 13

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat-GRex5T1-LPT8-L1

<400> 13

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
 35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 65 70 75 80

 Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110
 Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 130 135 140
 Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

 145 150 155 160
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 165 170 175
 Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 195 200 205
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220

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

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

290

295

300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly

305

310

315

320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

325

330

335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

340

345

350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

355

360

365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

370

375

380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

385

390

395

400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala

405

410

415

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

420

425

430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val

435

440

445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

450

455

460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu

465

470

475

480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

485

490

495

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

500

505

510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala

515

520

525

Leu Glu

530

<210> 14

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat-GRex5T1-LPT8-R1

<400> 14

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His

65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala

130 135 140

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val

165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu

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

 245 250 255
 Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
 275 280 285
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
 305 310 315 320

 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350
 Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 355 360 365
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380
 Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu

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

[illegible]

| | |
|------------|---------------------|
| 530 | |
| <210> | 15 |
| <211> | 530 |
| <212> | PRT |
| <213> | Artificial Sequence |
| <220><223> | Repeat-GRex5T2-L1 |
| <400> | 15 |

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
1 5 10 15
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20 25 30
His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
35 40 45
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|
| 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | | | | | |
| Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | Pro | Gln | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | Asn | | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | | | | |
| Asn | Gly | Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val | | | | | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | | |
| Leu | Cys | Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | Pro | Glu | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | | | | | |
| 100 | | | | | | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | |
| Ser | Asn | Ile | Gly | Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Ala | Leu | Leu | | | | | |

115 120 125
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 130 135 140
 Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 165 170 175
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190
 Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 195 200 205
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
 245 250 255
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
 275 280 285
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
 305 310 315 320
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350
 Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 355 360 365

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

 Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 420 425 430
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 435 440 445
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 465 470 475 480
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525
 Leu Glu
 530
 <210> 16
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Repeat-GRex5T2-R1
 <400> 16
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys

 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
65 70 75 80

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

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

290

295

300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly

305

310

315

320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

325

330

335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

340

345

350

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

355

360

365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

370

375

380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

385

390

395

400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala

405

410

415

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

420

425

430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val

435

440

445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

450

455

460

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

465

470

475

480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

485

490

495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

500

505

510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala

515

520

525

Leu Glu

530

<210> 17

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat-GRex5T3-L1

<400> 17

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu

115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala

130 135 140

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val

165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu

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

 245 250 255
 Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 275 280 285
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
 305 310 315 320

 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350
 Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
 355 360 365
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

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

[illegible]

| | |
|------------|---------------------|
| 530 | |
| <210> | 18 |
| <211> | 530 |
| <212> | PRT |
| <213> | Artificial Sequence |
| <220><223> | Repeat-GRex5T3-R1 |
| <400> | 18 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Thr | Pro | Gln | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | Asn | Asn | Gly | Gly | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val | Leu | Cys | Gln | Ala |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| His | Gly | Leu | Thr | Pro | Glu | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | Asn | Ile | Gly |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Ala | Leu | Leu | Pro | Val | Leu | Cys |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | | | | |
| Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | Pro | Gln | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | Asn | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | | | |
| Gly | Gly | Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val | | | | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | |
| Leu | Cys | Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | Pro | Glu | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | | | | |
| 100 | | | | | | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | |
| Ser | His | Asp | Gly | Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | | | | |

115 120 125
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 130 135 140
 Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 165 170 175
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 195 200 205
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
 245 250 255
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
 275 280 285
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
 305 310 315 320
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350
 Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 355 360 365

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

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

485 490 495
 Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 19

<211> 2814

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GRex2-L TALEN

<400> 19

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120

aaaccgaagg ttctgttcgac agtggcgag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt 180

acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccgcgag cgtagggac cgtcgtgtc 240

| | |
|---|------|
| aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcga cgttggcgtc | 300 |
| ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagtgtg | 360 |
| agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc | 420 |
| gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac | 480 |
| ttgaccccg agcagggtgt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag | 540 |
| acggtgcagg cgtgtgtgcc ggtgtgtgtc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 600 |
| gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 660 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggcat cgccagcaat | 720 |
| ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 780 |
| cacggcttga ccccgagca ggtgtgtggc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 840 |
| ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 900 |
| cagggtgtgg ccatcgccag caatatgtgt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg | 960 |
| ctgttgccgg tgcgtgtcca ggcccacggc ttgaccccg agcagggtgt ggccatcgcc | 1020 |
| agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgtc | 1080 |
| caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag | 1140 |
| caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgtgt gccaggccca cggttgacc | 1200 |
| cccagcagg tgggtggcat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc | 1260 |
| cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtgtgtggc | 1320 |
| atcgccagca atattgtgtg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg | 1380 |
| ctgtgccagg cccacggctt gacccccag cagggtgtgt ccatcgccag caatggcgggt | 1440 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgtcca ggcccacggc | 1500 |
| ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag | 1560 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgtc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 1620 |
| gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 1680 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc ccggagcagg tgggtggcat cgccagcaat | 1740 |
| attgtgtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1800 |
| cacggcttga ccccgagca ggtgtgtggc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 1860 |
| ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag | 1920 |
| cagggtgtgt ccatcgccag caatggcgggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 1980 |
| ctgttgccgg tgcgtgtcca ggcccacggc ttgacccctc agcagggtgt ggccatcgcc | 2040 |
| agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg ccagttatc tcgccctgat | 2100 |

| | |
|---|------|
| ccggcggttg ccgcgttgac caacgaccac ctgcgtgcct tggcctgcct cggcgggct | 2160 |
| ctgcgttg atgcagtga aaagggttg gggatccta tcagccgttc ccagctggtg | 2220 |
| aagtcgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac | 2280 |
| gagtacatcg agctgatcga gatcggcccg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg | 2340 |
| aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggctcc | 2400 |
| aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggtccccca tcgactacgg cgtgatcgtg | 2460 |
| gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag | 2520 |
| aggtactgtg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag | 2580 |
| gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc | 2640 |
| aactacaagg ccagcgtgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg | 2700 |
| tccgtggagg agtcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag | 2760 |
| gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cgcccgactg ataa | 2814 |
| <210> 20 | |
| <211> 2832 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> GRex2-R TALEN | |
| <400> 20 | |
| atggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagtgc | 60 |
| gagagacagc acatggacag catcgatac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag | 120 |
| cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggca | 180 |
| ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcggttcgt taagccaaca cccggcagcg | 240 |
| ttagggaccg tcgctgtcaa 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 gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcgg | 540 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 600 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag | 660 |
| acggtccagc ggtgtgtgc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 720 |
| gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg | 780 |

| | |
|--|------|
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtagccat cgccagcaat | 840 |
| ggcggtaggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 900 |
| | |
| cagcgttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtag caagcaggcg | 960 |
| ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 1020 |
| caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 1080 |
| ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc | 1140 |
| agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc | 1200 |
| caggccccag gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggaag | 1260 |
| caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1320 |
| | |
| cccagcagg tggtagccat cgccagcaat ggcggtaggca agcaggcgct ggagacggtc | 1380 |
| cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cagcgttga ccccgagca ggtggtggcc | 1440 |
| atcgccagca atatgtgtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg | 1500 |
| ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc | 1560 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc | 1620 |
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggaagca ggcgctggag | 1680 |
| acggtccagc ggcgtgtgcc ggtgctgtgc caggccccag gcttgacccc ggagcaggtg | 1740 |
| | |
| gtggccatcg ccagcaatat tggtaggaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg | 1800 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtagccat cgccagcaat | 1860 |
| aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1920 |
| cacgcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg | 1980 |
| ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag | 2040 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgc | 2100 |
| cagttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg | 2160 |
| | |
| gcctgcctcg gcgggcgctc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatectatc | 2220 |
| agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag | 2280 |
| ctgaagtacg tgccccagca gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccag | 2340 |
| gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc | 2400 |
| aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggcgcatct acaccgtggg ctccccatc | 2460 |
| gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc | 2520 |

| | |
|---|------|
| caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac | 2580 |
| cccaacgagt ggtggaaggt gtacccctcc 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> 21 | |
| <211> 2814 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> GRex3T2-L TALEN | |
| <400> 21 | |
| atgggcgatc ctaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catac gatgt tccagattac | 60 |
| gctatcgata tcgccatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc | 120 |
| aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt | 180 |
| acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccgcgag cgtagggac cgtcgtgtc | 240 |
| aagtatcagg acatgatcg agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc | 300 |
| ggcaaacagt ggtccggcg acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg | 360 |
| agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaa acgtggcggc | 420 |
| gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac | 480 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag | 540 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 600 |
| gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 660 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg ttgtggccat cgccagccac | 720 |
| gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc | 780 |
| cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcgttg caagcaggcg | 840 |
| ctggagacgg tcagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag | 900 |
| caggtggtgg ccatcgccag caataatggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 960 |
| ctgttgccgg tctgtgtcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc | 1020 |
| agcaataatg gtggcaagca ggcgtggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc | 1080 |
| caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaatgg cgttggaag | 1140 |

| | |
|---|------|
| caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg ccgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1200 |
| ccccagcagg tggtaggcat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc | 1260 |
| cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cagggttga cccccagca ggtggtggcc | 1320 |
| atgccagca atggcggtag caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg | 1380 |
| ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtaggtg ccatgccag caataatgt | 1440 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 1500 |
| ttgaccccg agcaggtagt ggccatgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag | 1560 |
| acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgtgtgc caggccacg gcttgaccc ccagcaggtag | 1620 |
| gtggccatcg ccagcaatgg cggtaggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg | 1680 |
| ccgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtaggcat cgccagccac | 1740 |
| gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc | 1800 |
| cagggttga cccccagca ggtggtggcc atgccagca atggcggtag caagcaggcg | 1860 |
| ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag | 1920 |
| caggtaggtg ccatgccag caataatgt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 1980 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtagt ggccatgcc | 2040 |
| agcaatggcg gcggcaggcc ggcgtggag agcattgttg ccagttatc tcgccctgat | 2100 |
| ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctctgcctt tggcctgcct cggcgggct | 2160 |
| cctgcctgg atgcagtga aaagggttg ggggaccta tcagccgtt ccagctggtg | 2220 |
| aagtcgagc tggaggagaa gaaatccag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac | 2280 |
| gagtacatcg agctgatca gatcggcgg aacagcacc aggaccgat cctggagatg | 2340 |
| aagtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggtcc | 2400 |
| aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggtccccc tgcactacgg cgtgatcgtg | 2460 |
| gacaccaagg cctactccg cggtacaac ctgccatcg gccaggccga cgaaatgcag | 2520 |
| aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca acccaacga gtggtggaag | 2580 |
| gtgtaccct ccagcgtgac cgagttaag ttctgttcg tgtccggcca cttaagggc | 2640 |
| aactacaagg ccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgcctgctg | 2700 |
| tccgtggagg agtctctgat gggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag | 2760 |
| gaggtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttcg cgcccgactg ataa | 2814 |
| <210> 22 | |
| <211> 2832 | |
| <212> DNA | |

<213> Artificial Sequence

<220><223> GRex3T2-R TALEN

<400> 22

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc 60
gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgtcgcg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggtt 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 ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420

attgcaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg 480
acgggtgccc cgctcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcgggt 540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 600
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatgt gtggcaagca ggcgctggag 660
acggtgcagg cgctgttgcc ggtgtgtgtc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg 720
gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg 780
ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc cccagcagg tggtgccat cgccagcaat 840

aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 900
cacggttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg 960
ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 1020
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgtc 1200
caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggaag 1260

caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc 1320
ccggagcagg tggtgccat cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc 1380
cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggttga ccccgagca ggtggtggcc 1440
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg 1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcgggt 1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1620

| | |
|--|------|
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag | 1680 |
| acggtgcagg cgctgttgcc ggtgtgtgac caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 1740 |
| gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg | 1800 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggcat cgccagcaat | 1860 |
| ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc | 1920 |
| cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtg caagcaggcg | 1980 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccctcag | 2040 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc | 2100 |
| cagttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg | 2160 |
| gcctgcctcg gcgggctgcc 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 gaagcccgc ggcgcatct acacgtggg 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 ccgtgtgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc | 2760 |
| ggcacctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg | 2820 |
| gccgactgat aa | 2832 |
| <210> 23 | |
| <211> 2814 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> GRex3T4-L TALEN | |
| <400> 23 | |
| atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggta atcgattacc catacgatgt tccagattac | 60 |
| gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc | 120 |
| aaaccgaagg ttctgttcgac agtggcgag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt | 180 |
| acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccggcgag cgtagggac cgtcgctgtc | 240 |

| | |
|--|------|
| aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc | 300 |
| ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagtgtg | 360 |
| agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caactttctca agattgcaaa acgtggcggc | 420 |
| gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac | 480 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag | 540 |
| acggtccagc ggtgtttgcc ggtgtgtgtc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 600 |
| gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 660 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggccat cgccagcaat | 720 |
| ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 780 |
| cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 840 |
| ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag | 900 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 960 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc | 1020 |
| agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggtgtttgcc ggtgtgtgtc | 1080 |
| caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag | 1140 |
| caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgtgtg gccaggccca cggcttgacc | 1200 |
| ccccagcagg tgggtggccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc | 1260 |
| cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc | 1320 |
| atcgccagca ataattggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg | 1380 |
| ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag caatatgtgt | 1440 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 1500 |
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag | 1560 |
| acggtgcagg cgctgttgcc ggtgtgtgtc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 1620 |
| gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 1680 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggccat cgccagccac | 1740 |
| gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1800 |
| cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcgggtg caagcaggcg | 1860 |
| ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag | 1920 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 1980 |

| | |
|---|------|
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc | 2040 |
| agcaatggcg gcggcaggcc ggcgtggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat | 2100 |
| ccggcgttgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcctgcct tggcctgcct cggcggggt | 2160 |
| cctgcgttgg atgcagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg | 2220 |
| aagtcggagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac | 2280 |
| gagtacatcg agctgatcga gatcggcgg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg | 2340 |
| aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggctcc | 2400 |
| aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggctccccc tgcactacgg cgtgatcgtg | 2460 |
| gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag | 2520 |
| aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag | 2580 |
| gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttctg tgtccggcca cttcaagggc | 2640 |
| aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg | 2700 |
| tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacctt gaccctggag | 2760 |
| gaggtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa | 2814 |
| <210> 24 | |
| <211> 2832 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> GRex3T4-R TALEN | |
| <400> 24 | |
| atgggcgac ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc | 60 |
| gagagacagc acatggacag catcgatata gcgatctac gcacgctcgg ctacagccag | 120 |
| cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggga | 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 actttcaag | 420 |
| attgcaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg | 480 |
| acgggtgccc cgtcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcgtt | 540 |
| ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 600 |
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag | 660 |

| | |
|---|------|
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 720 |
| gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg | 780 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggaggccat cgccagcaat | 840 |
| attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 900 |
| cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 960 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 1020 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatatgtgt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg | 1080 |
| ctgttgccgg tgcgtgtcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc | 1140 |
| agcaatatgt gtggcaagca ggcgtggag acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc | 1200 |
| caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tggaggcaag | 1260 |
| caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1320 |
| ccccagcagg tggaggccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc | 1380 |
| cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc | 1440 |
| atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg | 1500 |
| ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag caatatgtgt | 1560 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgcgtgtcca ggcccacggc | 1620 |
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatgt gtggcaagca ggcgtggag | 1680 |
| acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 1740 |
| gtggccatcg ccagcaataa tggaggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg | 1800 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggaggccat cgccagcaat | 1860 |
| attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1920 |
| cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 1980 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag | 2040 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggaggccgg cgctggagag cattgttgcc | 2100 |
| cagttatctc gccctgatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg | 2160 |
| gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggtacatc | 2220 |
| agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag | 2280 |
| ctgaagtacg tgccccagca gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccag | 2340 |
| gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc | 2400 |

| | |
|--|------|
| aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggcgccatct acaccgtggg ctcccccatc | 2460 |
| gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccacggc | 2520 |
| caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac | 2580 |
| cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg | 2640 |
| tccggccact tcaaggga ctacaaggcc cagctgacca ggtgaacca catcaccaac | 2700 |
| tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc | 2760 |
| ggcacctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg | 2820 |
| gccgactgat aa | 2832 |
| <210> 25 | |
| <211> 2814 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> GRex5T1-L TALEN | |
| <400> 25 | |
| atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac | 60 |
| gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc | 120 |
| aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt | 180 |
| acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccggcgag cgttagggac cgtcgctgtc | 240 |
| aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc | 300 |
| ggcaaacagt ggtccggcg acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagtgtg | 360 |
| agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaa acgtggcggc | 420 |
| gtgacgcgag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac | 480 |
| ttgaccccc agcaggttgt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag | 540 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 600 |
| gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtgttg | 660 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggcat cgccagcaat | 720 |
| ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc | 780 |
| cacggcttga cccccagca ggtgtgtggc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg | 840 |
| ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag | 900 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 960 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc | 1020 |

| | |
|---|------|
| agccacgatg gcggaagca ggcgtggag acggtccagc ggctgttgc ggtgctgtgc | 1080 |
| caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tggaggcaag | 1140 |
| caggcgtgg agacggtgca ggcgtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1200 |
| ccggagcagg tggaggccat cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc | 1260 |
| cagcgctgt tgcgggtgt gtgccaggcc caggcctga ccccccagca ggtggtggcc | 1320 |
| atgccagca atggcggagg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg | 1380 |
| ctgtgccagg cccacggctt gacccccag cagggtgtgg ccatgccag caataatggt | 1440 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 1500 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag | 1560 |
| acggtccagc ggctgttgc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 1620 |
| gtggccatcg ccagcaatgg cggaggcaag caggcgtgg agacggtcca ggcgtgttg | 1680 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggaggccat cgccagcaat | 1740 |
| aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgt tgcgggtgt gtgccaggcc | 1800 |
| cagcgttga ccccccagca ggtggtggcc atgccagca ataattgtgg caagcaggcg | 1860 |
| ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccgag | 1920 |
| cagggtgtgg ccatgccag caatatggt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg | 1980 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccctc agcaggtggt ggccatcgcc | 2040 |
| agcaatggcg ggcgagccc ggcgtggag agcattgttg ccagttatc tcgccctgat | 2100 |
| ccggcgttgg ccggttgac caacgaccac ctgctgcct tggcctgcct cggcggcggt | 2160 |
| cctgcgttgg atgcagtga aaagggtatg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg | 2220 |
| aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgcccac | 2280 |
| gagtacatcg agctgatga gatcggcgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg | 2340 |
| aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct ggcggtctcc | 2400 |
| aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggtccccca tcgactacgg cgtgatcgtg | 2460 |
| gacaccaagg cctactccg cggtiacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag | 2520 |
| aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag | 2580 |
| gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttgc tgtccggcca cttaagggc | 2640 |
| aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cggcgtgctg | 2700 |
| tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag | 2760 |

gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

<210> 26

<211> 2832

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GRex5T1-R TALEN

<400> 26

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc 60

gagagacagc acatggacag catcgataac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120

cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgagca ccacgaggca 180

ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg 240

ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac 300

gaagcgatcg ttggcgctcg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc 360

acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420

attgcaaaac gtggcggtcg gaccgcagtg gaggcagtg atgatggcg caatgcactg 480

acgggtgccc cgtcgaactt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag caatatggt 540

ggcaagcagg cgttgagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc 600

ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 660

acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 720

gtggccatcg ccagccagca tggcggaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg 780

ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg ttgtggccat cgccagccac 840

gatggcgga agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgt tgcgggtgct gtgccaggcc 900

cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 960

ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 1020

caggtggtgg ccatcgccag caataatggt ggcaagcagg cgttgagac ggtccagcgg 1080

ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc 1140

agccacgatg gcggaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1200

caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtaggaag 1260

caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320

ccccagcagg ttgtggccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1380

cagcgctgt tgcgggtgct gtgccaggcc caggcttga cccggagca ggtggtggcc 1440

atgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg 1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatgccag caatggcgg 1560

ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc 1620
ttgaccccg agcaggtggt ggccatgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag 1680
acggtgcagg cgctgttgc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgaccc ggagcaggtg 1740
gtggccatcg ccagcaatat tggaggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgtt 1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggaggccat cgccagccac 1860
gatggcgga agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgcgggtgct gtgccaggcc 1920
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atgccagca atattggtgg caagcaggcg 1980

ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccctcag 2040
caggtggtgg ccatgccag caatggcggc ggaggccgg cgctggagag cattgttgc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg 2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc 2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgcaccagca gtacatcgag ctgatcgaga tgcggcgaa cagcaccag 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400

aagcacctgg gcggctccag gaagcccagc ggcccatct acacgtggg cccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccacggc 2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaaca gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tccggccact tcaaggcga ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcacctga ccctggagga ggtgaggagg aagttaaca acggcgagat caacttcgcg 2820

gccgactgat aa 2832

<210> 27
<211> 2814
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> GRex5T2-L TALEN
<400> 27

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggct atcgattacc catagatgt tccagattac 60

| | |
|--|------|
| gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc | 120 |
| aaaccgaagg ttctgttcgac agtggcgagc caccacgagg cactggctcg ccacgggttt | 180 |
| acacacgcgc acatcgttgc gtttaagccaa caccgcgagc cgttagggac cgtcgtctgc | 240 |
| aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc | 300 |
| ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagtgt | 360 |
| agaggctcac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc | 420 |
| gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac | 480 |
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag | 540 |
| acggtgcagg cgtgtgtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 600 |
| gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 660 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat | 720 |
| aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc | 780 |
| cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg | 840 |
| ctggagacgg tgcaggcgt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag | 900 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 960 |
| ctgttgccgg tgcgtgtcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc | 1020 |
| agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag acggtgcagg cgtgtgtgcc ggtgctgtgc | 1080 |
| caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag | 1140 |
| caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1200 |
| ccggagcagg tggtgccat cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc | 1260 |
| cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cagggcttga cccccagca ggtggtggcc | 1320 |
| atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg | 1380 |
| ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc | 1440 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgtcca ggcccacggc | 1500 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag | 1560 |
| acgtccagc ggtgtgtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 1620 |
| gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 1680 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat | 1740 |
| ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc | 1800 |
| cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg | 1860 |

| | |
|---|------|
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccgtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 1920 |
| caggtggtgg ccatgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 1980 |
| ctgttgccgg tgcgtgccca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc | 2040 |
| agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat | 2100 |
| ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcct tggcctgcct cggcgggct | 2160 |
| cctgcgtgg atgcagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg | 2220 |
| aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac | 2280 |
| gagtacatcg agctgatcga gatcgcccgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg | 2340 |
| aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggctcc | 2400 |
| aggaagccc acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg | 2460 |
| gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccatcg gccaggccga cgaaatgcag | 2520 |
| aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag | 2580 |
| gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttaagggc | 2640 |
| aactacaagg ccagcgtgac caggtgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg | 2700 |
| tccgtggagg agtcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag | 2760 |
| gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa | 2814 |
| <210> 28 | |
| <211> 2832 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> GRex5T2-R TALEN | |
| <400> 28 | |
| atgggcgatc ctaaaagaa acgtaaggc atcgataagg agaccgccg tgccaagttc | 60 |
| gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgtcgg ctacagccag | 120 |
| cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggca | 180 |
| ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttcgt taagccaaca cccggcagcg | 240 |
| ttagggaccg tcgtgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac | 300 |
| gaagcgatcg ttggcgtcg caaacagtgg tccggcgac gcgctctgga ggccttgctc | 360 |
| acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagtgg acacaggcca acttctcaag | 420 |
| attgcaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg | 480 |
| acgggtgccc cgctcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt | 540 |

| | |
|--|------|
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca gggccacggc | 600 |
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg ttggcaagca ggcgctggag | 660 |
| acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 720 |
| gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 780 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg ttgtggccat cgccagccac | 840 |
| gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc | 900 |
| cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataattgttg caagcaggcg | 960 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag | 1020 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 1080 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca gggccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc | 1140 |
| agcaatattg ttggcaagca ggcgctggag acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc | 1200 |
| caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag | 1260 |
| caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1320 |
| ccccagcagg ttgtggccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc | 1380 |
| cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc | 1440 |
| atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg | 1500 |
| ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag caatattggt | 1560 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcca gggccacggc | 1620 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg ttggcaagca ggcgctggag | 1680 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 1740 |
| gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 1800 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg ttgtggccat cgccagcaat | 1860 |
| attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1920 |
| cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtg caagcaggcg | 1980 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag | 2040 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc | 2100 |
| cagttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtgccttg | 2160 |
| gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc | 2220 |
| agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag | 2280 |

| | |
|--|------|
| ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgacgaga tcgcccggaa cagcacccag | 2340 |
| gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc | 2400 |
| aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac 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> 29 | |
| <211> 2814 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> GRex5T3-L TALEN | |
| <400> 29 | |
| atgggcgacg ctaaaaagaa acgtaaggct atcgattacc catacgatgt tccagattac | 60 |
| gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc | 120 |
| aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt | 180 |
| acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccggcgag cgttagggac cgtcgctgtc | 240 |
| aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc | 300 |
| ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagttg | 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 caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 600 |
| gtggccatcg ccagcaatat tggtaggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg | 660 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtaggcat cgccagcaat | 720 |
| ggcggtagga agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 780 |
| cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg | 840 |
| ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag | 900 |

| | |
|--|------|
| caggtggtgg ccatgccag caatggcggg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 960 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc | 1020 |
| | |
| agcaataatg gtggcaagca ggcgtggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc | 1080 |
| caggcccacg gcttgacccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag | 1140 |
| caggcgtgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc | 1200 |
| ccggagcagg tgggtggccat cgccagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacggtg | 1260 |
| caggcgtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc | 1320 |
| atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtg gttgccggtg | 1380 |
| ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatgccag caataatggt | 1440 |
| | |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 1500 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgtggag | 1560 |
| acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcagggtg | 1620 |
| gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgtgg agacggtcca gcggctgttg | 1680 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc ccggagcagg tgggtggccat cgccagcaat | 1740 |
| attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgtgtg tgccggtgct gtgccaggcc | 1800 |
| cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg | 1860 |
| | |
| ctggagacgg tccagcggtg gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag | 1920 |
| caggtggtgg ccatgccag caataatggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 1980 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc | 2040 |
| agcaatggcg gcggcaggcc ggcgtggag agcattgttg ccagttatc tcgccctgat | 2100 |
| ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcct tggcctgcct cggcggcgct | 2160 |
| cctgcgtgg atgcagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg | 2220 |
| aagtccgagc tggaggagaa gaaatccag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac | 2280 |
| | |
| gagtacatcg agctgatcga gatgccccgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg | 2340 |
| aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggctcc | 2400 |
| aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg | 2460 |
| gacaccaagg cctactccgg cggtacaac ctgcccacg gccaggccga cgaatgcag | 2520 |
| aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag | 2580 |
| gigtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc | 2640 |

| | |
|---|------|
| aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg | 2700 |
| tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag | 2760 |
| gaggtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttcg cgcccgactg ataa | 2814 |
| <210> 30 | |
| <211> 2832 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> GRex5T3-R TALEN | |
| <400> 30 | |
| atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc | 60 |
| gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgtctcg ctacagccag | 120 |
| cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggca | 180 |
| ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg | 240 |
| ttagggaccg tcgtgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac | 300 |
| gaagcgatcg ttggcgtcg caaacagtgg tccggcgac gcgctctgga ggccttgctc | 360 |
| acggtggcgg gagagttag aggtccaccg ttacagtgg acacaggcca acttctcaag | 420 |
| attgcaaac gtggcggtc gaccgcagtg gaggcagtgc atgatggcg caatgcactg | 480 |
| acgggtgccc cgctcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt | 540 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 600 |
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg ttggcaagca ggcgctggag | 660 |
| acggtgcagg cgctgttgcc ggtgtgtgtc caggcccag gcttgaccc ccagcaggtg | 720 |
| gtggccatcg ccagcaatgg cggcggcaag caggcgtgg agacgggtcca gcggtgttg | 780 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggcggccat cgccagccac | 840 |
| gatggcgga agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgt tgccggtgt gtgccaggcc | 900 |
| cacggttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcg caagcaggcg | 960 |
| ctggagacgg tccagcggt gttgccggt ctgtgccagg ccacggctt gacccccag | 1020 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 1080 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc | 1140 |
| agccacgatg gcggcaagca ggcgtggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgtc | 1200 |
| caggcccag gcttgaccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggaag | 1260 |
| caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg ccggtgtgt gccaggccca cggttgacc | 1320 |

| | |
|--|------|
| ccggagcagg tggaggccat cgccagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacgggtg | 1380 |
| caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc caggcctga ccccgagca ggtggtggcc | 1440 |
| atgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg | 1500 |
| ctgtgccagg cccacggctt gacccccag cagggtggtgg ccatgccag caataatggt | 1560 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccaggcg ctgttgccgg tgcgtgcca gggccacggc | 1620 |
| ttgaccccc agcagggtgt ggccatgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag | 1680 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcagggtg | 1740 |
| gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg | 1800 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggaggccat cgccagcaat | 1860 |
| aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1920 |
| caggcctga ccccgagca ggtggtggcc atgccagca atattggtgg caagcaggcg | 1980 |
| ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag | 2040 |
| cagggtggtgg ccatgccag caatggcggc ggccaggccg cgctggagag cattgttgcc | 2100 |
| cagttatctc gccctgatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtgccttg | 2160 |
| gcctgcctcg gggggcgtcc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc | 2220 |
| agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag | 2280 |
| ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcacccag | 2340 |
| gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc | 2400 |
| aagcacctgg gcggtccag 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 ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg | 2820 |
| gccgactgat aa | 2832 |
| <210> 31 | |
| <211> 60 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> Forward primer GR exon 2 | |

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(40)

<223> n is a or c or t or g

<400> 31

ccatctcacc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn gggtcattta acaagctgcc 60

60

<210> 32

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer GR exon 3

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(40)

<223> n is a or c or t or g

<400> 32

ccatctcacc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn gcattctgac tatgaagtga 60

60

<210> 33

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer GR exon 5

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(40)

<223> n is a or c or t or g

<400> 33

ccatctcacc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn tcagcaggcc actacaggag 60

tctcacaag 69

<210> 34

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer GR exon 2

<400> 34
cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag agccagtgag ggtgaagacg 50
<210> 35
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse primer GR exon 3
<400> 35
cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag gggctttgca tataatggaa 50
<210> 36
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse primer GR exon 5
<400> 36
cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag ctgactctcc cttcatagt cccagaac 59
<210> 37
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> TRAC_T01
<400> 37
ttgtcccaca gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgaga 49
<210> 38
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> TRBC_T01
<400> 38
tgtgtttgag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa aaggccaca 49
<210> 39
<211> 50
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TRBC_T02

<400> 39

ttcccaccgc aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctccca 50

<210> 40

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD52_T02

<400> 40

ttctctctac tcaccatcag cctcctggtt atggtacagg taagagcaa 49

<210> 41

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat TRAC_T01-L

<400> 41

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

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

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

 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
 275 280 285
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
 305 310 315 320
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

 325 330 335
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350
 Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
 355 360 365
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

370 375 380
 Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 405 410 415
 Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
 420 425 430
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 435 440 445
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu

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

Leu Glu

530

<210> 42

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat TRAC_T01-R

<400> 42

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly

35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 65 70 75 80
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110
 Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
 115 120 125
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala

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

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

 275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 43
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Repeat TRBC_T01-L
 <400> 43
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 1 5 10 15

 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 65 70 75 80
 Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110
 Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 130 135 140
 Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160

 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 165 170 175
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
340 345 350

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

370 375 380

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

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

515 520 525
 Leu Glu
 530

<210> 44
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Repeat TRBC_T01-R
 <400> 44

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly

35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 65 70 75 80
 Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110
 Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

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

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

 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
 275 280 285
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 305 310 315 320
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

 325 330 335
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350
 Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 355 360 365
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

370 375 380
 Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 405 410 415
 Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 420 425 430
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 435 440 445
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

465 470 475 480
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu

530

<210> 45

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat TRBC_T02-L

<400> 45

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly

35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 65 70 75 80
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110
 Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
 115 120 125
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala

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

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

 275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 46

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat TRBC_T02-R

<400> 46

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

65 70 75 80

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu

115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala

130 135 140

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val

165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

180 185 190

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

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

515 520 525
 Leu Glu
 530

<210> 47
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Repeat CD52_T02-L
 <400> 47

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly

35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 65 70 75 80
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110
 Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

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

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

 Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 275 280 285
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 305 310 315 320
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

 325 330 335
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 340 345 350
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 355 360 365
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

370 375 380
 Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
 385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 405 410 415
 Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 420 425 430
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 435 440 445
 Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu

465 470 475 480
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495
 Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu

530

<210> 48

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat CD52_T02-R

<400> 48

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly

35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 65 70 75 80
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110
 Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala

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

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

 275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

| | | |
|--|---------------------|--|
| <210> | 49 | |
| <211> | 2814 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | TRAC_T01-L TALEN | |
| <400> | 49 | |
| atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac | 60 | |
| gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc | 120 | |
| aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt | 180 | |
| acacacgcgc acatcgttgc gtttaagccaa cccccgcag cgttagggac cgtcgctgtc | 240 | |
| aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc | 300 | |
| ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagtgt | 360 | |
| agagggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaa acgtggcggc | 420 | |
| gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac | 480 | |
| ttgaccccc agcagggtgtt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag | 540 | |
| acggtccagc ggtctgttgc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 600 | |
| gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgtt | 660 | |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtaggcat cgccagcaat | 720 | |
| ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 780 | |
| cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 840 | |
| ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 900 | |
| caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 960 | |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcagggtgtt ggccatcgcc | 1020 | |
| agccacgatg gcggcaagca ggcgtggag acggtccagc ggtctgttgc ggtgctgtgc | 1080 | |
| caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtaggcaag | 1140 | |
| caggcgctgg agacggtgca ggcgtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1200 | |
| ccggagcagg tggtaggcat cgccagccac gatggcgga agcaggcgct ggagacggtc | 1260 | |
| cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc | 1320 | |
| atcgccagca atatggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg | 1380 | |
| ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt | 1440 | |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 1500 | |

| | |
|--|------|
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag | 1560 |
| acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 1620 |
| gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 1680 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggaggccat cgccagcaat | 1740 |
| attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1800 |
| | |
| cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg | 1860 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag | 1920 |
| caggtggtgg ccatcgccac ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 1980 |
| ctgttgccgg tctgtgtcca ggcccacggc ttgaccctc agcaggtggt ggccatcgcc | 2040 |
| agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat | 2100 |
| ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcct tggcctgcct cggcgggctt | 2160 |
| cctgcgctgg atgcagttaa aaagggttg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg | 2220 |
| | |
| aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac | 2280 |
| gagtacatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg | 2340 |
| aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtcc | 2400 |
| aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg | 2460 |
| gacaccaagg cctactccgg cggtacaac ctgccatcg gccaggccga cgaaatgcag | 2520 |
| aggtactggt aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag | 2580 |
| gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc | 2640 |
| | |
| aactacaagg ccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg gcccgctg | 2700 |
| tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag | 2760 |
| gaggtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa | 2814 |
| <210> 50 | |
| <211> 2832 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> TRAC_T01-R TALEN | |
| <400> 50 | |
| atgggcgatc ctaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc | 60 |
| gagagacagc acatggacag catcgatcgc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag | 120 |
| | |
| cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggca | 180 |

| | |
|---|------|
| ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg | 240 |
| ttagggaccg tcgtgtcaa gtatcaggac atgatcgag cggtgccaga ggcgacacac | 300 |
| gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgac gcgctctgga ggccttgctc | 360 |
| acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagtgg acacaggcca acttctcaag | 420 |
| attgcaaac gtggcgcggt gaccgcagtg gaggcagtgc atgatggcg caatgcactg | 480 |
| acgggtgccc cgctcaactt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc | 540 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 600 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag | 660 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 720 |
| gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 780 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg ttgtggccat cgccagcaat | 840 |
| attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 900 |
| cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg | 960 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 1020 |
| caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 1080 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc | 1140 |
| agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc | 1200 |
| caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa ttgtggcaag | 1260 |
| caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1320 |
| ccccagcagg ttgtggccat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc | 1380 |
| cagcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc | 1440 |
| atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg | 1500 |
| ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag caatatggt | 1560 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 1620 |
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag | 1680 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 1740 |
| gtggccatcg ccagcaatat ttgtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg | 1800 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg ttgtggccat cgccagccac | 1860 |
| gatggcgga agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1920 |
| cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg | 1980 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag | 2040 |

caggtggtgg ccatgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg 2160
gcctgcctcg gcgggcgtcc tgcgtggat gcagtgaaaa 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 tcaaggcga ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcacctga ccttgagga ggtgaggagg aagttaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa 2832

<210> 51
<211> 2814
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> TRBC_T01-L TALEN
<400> 51

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgaatg tccagattac 60

gctatcgata tcgccatct acgcacgctc ggtacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt 180
acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccgcgag cgttaggac cgtcgtgtc 240
aagtatcagg acatgatcg agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttgccgtc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg 360
agaggccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaa acgtggcggc 420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgtcaac 480

ttgaccccc agcaggtggt ggccatgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 540
acgtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggccacg gcttgaccc ccagcaggtg 600
gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgtt 660

| | |
|---|------|
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggaggccat cgccagcaat | 720 |
| aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 780 |
| cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcgggtg caagcaggcg | 840 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag | 900 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 960 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc | 1020 |
| agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc | 1080 |
| caggccccag gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tggtaggaag | 1140 |
| caggcgtggt agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1200 |
| ccggagcagg tggaggccat cgccagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacggtg | 1260 |
| caggcgtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cagggcttga 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 caggccccag gcttgacccc ggagcaggtg | 1620 |
| gtggccatcg ccagcaatat tggtaggaag caggcgtgg agacggtgca ggcgtgttg | 1680 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggaggccat cgccagcaat | 1740 |
| ggcggtagga agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1800 |
| cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 1860 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 1920 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatatggtt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg | 1980 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc | 2040 |
| agcaatggcg gcggcaggcc ggcgtggag agcattgttg ccagttatc tcgacctgat | 2100 |
| ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcctt tggcctgcct cggcggcggt | 2160 |
| cctgcgtggt atgcagtga aaagggttg gggatccta tcagccgttc ccagctggtg | 2220 |
| aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac | 2280 |
| gagtacatcg agctgatcga gatcggcgga aacagcacc aggaccgtat cctggagatg | 2340 |
| aagtgatagg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggtcc | 2400 |
| aggaagcccc acggcgccat ctacacctg ggtccccca tcgactacgg cgtgatcgtg | 2460 |
| gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag | 2520 |

| | |
|---|------|
| aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag | 2580 |
| gigtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc | 2640 |
| aactacaagg cccagctgac caggetgaac cacatcacca actgcaacgg cggcgtgctg | 2700 |
| tccgtggagg agtcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacctt gaccctggag | 2760 |
| gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa | 2814 |
| <210> 52 | |
| <211> 2832 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> TRBC_T01-R TALEN | |
| <400> 52 | |
| 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 tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac | 300 |
| gaagcgatcg ttggcgctgg caaacagtgg tccggcgac 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 ttgtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg | 780 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc cccagcagg ttgtggccat cgccagcaat | 840 |
| aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 900 |
| cacggttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 960 |
| ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 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 cgggtggcaag | 1260 |
| caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1320 |
| ccccagcagg tgggtggccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc | 1380 |
| cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc | 1440 |
| atgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtg gttgccggtg | 1500 |
| ctgtgccagg ccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatgccag caataatggt | 1560 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 1620 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag | 1680 |
| acgtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 1740 |
| gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 1800 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggccat cgccagcaat | 1860 |
| ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc | 1920 |
| cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atgccagca ataagtgtgg caagcaggcg | 1980 |
| ctggagacgg tccagcggtg gttgccggtg ctgtgccagg ccacggctt gaccctcag | 2040 |
| caggtggtgg ccatgccag caatggcggc ggccagccgg cgctggagag cattgttgcc | 2100 |
| cagttatctc gccctgatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgccttg | 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> 53 | |
| <211> 2814 | |
| <212> DNA | |

<213> Artificial Sequence

<220><223> TRBC_T02-L TALEN

<400> 53

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggct atcgattacc catacgatgt tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt 180
acacacgcgc acatcgttgc gtttaagccaa cccccggcag cgttagggac cgtcgctgtc 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
ttgaccccg agcagggtgt ggccatcgcc agccacgatg gcggaagca ggcgctggag 540
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg 600
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtgttg 660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cgccagccac 720
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtgt gtgccaggcc 780
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg 840

ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 900
caggtggtgg ccacgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcagggtgt ggccatcgcc 1020
agccacgatg gcggaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1080
caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag 1140
caggcgctgg agacgggtcca gcggtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccccagcagg tgggtggcat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1260

cagcggctgt tgccgggtgt gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc 1320
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct 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 ccagcaatgg cggtaggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg | 1680 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtaggcat cgccagccac | 1740 |
| gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccgggtgt gtgccaggcc | 1800 |
| cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg | 1860 |
| ctggagacgg tccagcggtg gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 1920 |
| caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 1980 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccttc agcaggtggt ggccatcgcc | 2040 |
| agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat | 2100 |
| ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcct tggcctgcct cggcgggcgt | 2160 |
| cctgcgttgg atgcagtga aaagggttg ggggaccta tcagccgttc ccagctggtg | 2220 |
| aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac | 2280 |
| gagtacatcg agctgatcga gatcggcgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg | 2340 |
| aagtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggtcc | 2400 |
| aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg | 2460 |
| gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccatcg 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 ccggcacct gaccctggag | 2760 |
| gaggtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa | 2814 |
| <210> 54 | |
| <211> 2832 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> TRBC_T02-R TALEN | |
| <400> 54 | |
| atgggcgac ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagtgc | 60 |
| gagagacagc acatggacag catcgataac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag | 120 |
| cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggca | 180 |
| ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg | 240 |
| ttagggaccg tcgtgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac | 300 |

| | |
|---|------|
| gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc | 360 |
| acggtggcgg gagagttag aggtccaccg ttacagtgg acacaggcca acttctcaag | 420 |
| | |
| attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg | 480 |
| acgggtgccc cgctcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt | 540 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc | 600 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag | 660 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 720 |
| gtggccatcg ccagcaataa tggtaggaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 780 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtagccat cgccagcaat | 840 |
| | |
| attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 900 |
| cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg | 960 |
| ctggagacgg tccagcgctt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag | 1020 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatatggt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg | 1080 |
| ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc | 1140 |
| agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc | 1200 |
| caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggaag | 1260 |
| | |
| caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1320 |
| ccccagcagg tggtagccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc | 1380 |
| cagcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc | 1440 |
| atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcgctt gttgccggtg | 1500 |
| ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcgg | 1560 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc | 1620 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag | 1680 |
| | |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 1740 |
| gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 1800 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtagccat cgccagcaat | 1860 |
| ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1920 |
| cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg | 1980 |
| ctggagacgg tccagcgctt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag | 2040 |

caggtggtgg ccacgccag caatggcggc ggccaggccgg cgctggagag cattgttgcc 2100

cagttatctc gccctgatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg 2160

gcctgcctcg gggggcgcc tgcctggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc 2220

agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280

ctgaagtacg tccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tccccggaa cagcaccag 2340

gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400

aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggccgcatct 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 tcaaggcga ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700

tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760

ggcacctga cctggagga ggtgaggagg aagtccaaca acggcgagat caacttcgcg 2820

gccgactgat aa 2832

<210> 55

<211> 2814

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD52_T02-L TALEN

<400> 55

atgggcgac ctaaaaagaa acgtaaggct atcgattacc catacgatgt tccagattac 60

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggtacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120

aaaccgaagg ttctgttcgac agtggcgag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt 180

acacacgcgc acatcgttgc gtttaagcaa caccgcgag cgttaggagc cgtcgtgtc 240

aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttgccgtc 300

ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg 360

agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caactttca agattgcaaa acgtggcggc 420

gtgaccgcag tggaggcagt gcatgatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480

ttgaccccc agcaggtggt ggccatgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 540

acggtccagc ggctgttgc ggtgtgtgtc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 600

gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg 660

| | |
|---|------|
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggaggccat cgccagccac | 720 |
| gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 780 |
| caggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggagg 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 |
| cagggccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaatgg cggtaggaag | 1140 |
| caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1200 |
| ccggagcagg tggaggccat cgccagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacggtg | 1260 |
| caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc caggcttga ccccgagca ggtggtggcc | 1320 |
| atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg | 1380 |
| ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcgggt | 1440 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 1500 |
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag | 1560 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc cagggccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 1620 |
| gtggccatcg ccagcaatat tggtaggaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg | 1680 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggaggccat cgccagccac | 1740 |
| gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1800 |
| caggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 1860 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 1920 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatatggtt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg | 1980 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc | 2040 |
| agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgacctgat | 2100 |
| ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcctt tggcctgcct cggcggcgct | 2160 |
| cctgcgctgg atgcagtga aaagggttg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg | 2220 |
| aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac | 2280 |
| gagtacatcg agctgatcga gatcggcgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg | 2340 |
| aagtgatagg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggtccc | 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 cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700

tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760

gaggtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttcg cgcccgactg ataa 2814

<210> 56

<211> 2832

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD52_T02-R TALEN

<400> 56

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc 60

gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120

cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggcca 180

ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcggttcgt taagccaaca cccggcagcg 240

ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cggtgccaga ggcgacacac 300

gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc 360

acggtggcgg gagagttag aggtccaccg tiacagtgg acacaggcca actttcaag 420

attgcaaaac gtggcgcgct gaccgcagtg gaggcagtgc atgatggcg caatgcactg 480

acgggtgccc cgtcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcgg 540

ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca ggccacggc 600

ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 660

acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgtgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 720

gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgtt 780

ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat 840

ggcgggtgga agcaggcgct ggagacggct cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 900

cacggcttga ccccgagca ggtgtgtgcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 960

ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 1020

caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080

| | |
|---|------|
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc | 1140 |
| agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc | 1200 |
| caggccccag gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtaggaag | 1260 |
| caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1320 |
| ccggagcagg tggtaggcat cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc | 1380 |
| cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cagcgcttga ccccgagca ggtggtggcc | 1440 |
| atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg | 1500 |
| ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatgccag caatggcgg | 1560 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 1620 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag | 1680 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccccag gcttgacccc ccagcaggtg | 1740 |
| gtggccatcg ccagcaatgg cggtaggaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 1800 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtaggcat cgccagcaat | 1860 |
| attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1920 |
| cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 1980 |
| ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag | 2040 |
| caggtggtgg ccatgccag caatggcggc ggccaggcgg cgctggagag cattgttgcc | 2100 |
| cagttatctc gccctgatcc ggcgttgccc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg | 2160 |
| gcctgcctcg gcgggcgctc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc | 2220 |
| agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag | 2280 |
| ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcggccgga cagcaccag | 2340 |
| gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc | 2400 |
| aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggcgcatct 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 ccttgaggga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcg | 2820 |

gccgactgat aa

2832

<210> 57

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TRAC_T02

<400> 57

tttagaaagt tcctgtgatg tcaagctggt cgagaaaagc ttgaaaca

49

<210> 58

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TRAC_T03

<400> 58

tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc gatTTtgatt ctcaaaca

49

<210> 59

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TRAC_T04

<400> 59

tatatcacag acaaaactgt gctagacatg aggtctatgg acttcaaga

49

<210> 60

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TRAC_T05

<400> 60

tgaggcttat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaaca

49

<210> 61

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD52_T01

<400> 61

ttctctttcc tctaccacc atcagctcc ttacctgta ccataac 47

<210> 62

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD52_T04

<400> 62

ttctctctac tcaccacagc ctctgggtct tacctgtacc ata 43

<210> 63

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD52_T05

<400> 63

tcctactcac catcagctcc tggttatttg ctcttacctg tac 43

<210> 64

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD52_T06

<400> 64

ttatccact tctctctac agatacaaac tttttgtcct gagagtc 47

<210> 65

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD52_T07

<400> 65

tggactctca ggacaaacga caccagccaa atgctgaggg gctgctg 47

<210> 66

<211> 60

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer CD52
 <220><221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> n is a or c or t or g
 <400> 66
 ccatctcacc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn cagatctgca gaaaggaagc 60
 60
 <210> 67
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer TRAC
 <220><221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> n is a or c or t or g
 <400> 67
 ccatctcacc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn atcactggca tctggactcc 60
 a 61
 <210> 68
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer TRBC1
 <220><221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> n is a or c or t or g
 <400> 68
 ccatctcacc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn agagccccta ccagaaccag 60
 ac 62
 <210> 69
 <211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer TRBC2

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(40)

<223> n is a or c or t or g

<400> 69

ccatctcacc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn ggacctagta acataattgt 60

gc 62

<210> 70

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer GR CD52

<400> 70

cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag cctgttggag tccatctgct g 51

<210> 71

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer GR TRAC

<400> 71

cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag cctcatgtct agcacagttt 50

<210> 72

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer GR TRBC1-2

<400> 72

cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag accagctcag ctccacgtgg t 51

<210> 73

<211> 495

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 CAR

<400> 73

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile

20 25 30

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr

35 40 45

Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met

145 150 155 160

Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser

165 170 175

Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr

180 185 190

Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu

195 200 205

Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu

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

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

 355 360 365
 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
 370 375 380
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 385 390 395 400
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 405 410 415
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 420 425 430

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

| | | | |
|------------|--|-----|-----|
| | 485 | 490 | 495 |
| <210> | 74 | | |
| <211> | 49 | | |
| <212> | DNA | | |
| <213> | Artificial Sequence | | |
| <220><223> | CTLA4_T01 | | |
| <400> | 74 | | |
| | tggccctgca ctctcctgtt tttctttctc ttcacccctg tcttctgca | | 49 |
| <210> | 75 | | |
| <211> | 49 | | |
| <212> | DNA | | |
| <213> | Artificial Sequence | | |
| <220><223> | CTLA4_T03 | | |
| <400> | 75 | | |
| | ttttccatgc tagcaatgca cgtggcccag cctgctgtgg tactggcca | | 49 |
| <210> | 76 | | |
| <211> | 49 | | |
| <212> | DNA | | |
| <213> | Artificial Sequence | | |
| <220><223> | CTLA4_T04 | | |
| <400> | 76 | | |
| | tccatgctag caatgcacgt ggcccagcct gctgtgtgtac tggccagca | | 49 |
| <210> | 77 | | |
| <211> | 49 | | |
| <212> | DNA | | |
| <213> | Artificial Sequence | | |
| <220><223> | PDCD1_T01 | | |
| <400> | 77 | | |
| | ttctccccag ccctgctcgt ggtgaccgaa ggggacaacg ccaccttca | | 49 |
| <210> | 78 | | |
| <211> | 49 | | |
| <212> | DNA | | |
| <213> | Artificial Sequence | | |

<220><223> PDCD1_T03

<400> 78

tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagaga

49

<210> 79

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat CTLA4_T01-L

<400> 79

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys

1 5 10 15
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30
His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly

35 40 45
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His

65 70 75 80

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

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

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

165 170 175
Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

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

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val

435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu

465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala

515 520 525

Leu Glu

530

<210> 80

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat CTLA4_T01-R

<400> 80

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala

130 135 140

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala

145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val

165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

180 185 190

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala

245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly

260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys

275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly

305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys

325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

340 345 350
 Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 355 360 365
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380
 Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

 385 390 395 400
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 405 410 415
 Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 420 425 430
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 435 440 445
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460

 Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 465 470 475 480
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525
 Leu Glu

530

<210> 81

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RepeatCTLA4_T03-L

<400> 81

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys

1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

 50 55 60
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110
 Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125

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

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

| | | |
|---|-----|-----|
| 260 | 265 | 270 |
| Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala | | |
| 290 | 295 | 300 |
| His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys | | |
| 325 | 330 | 335 |
| Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn | | |
| 340 | 345 | 350 |
| Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr | | |
| 500 | 505 | 510 |

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala

515 520 525

Leu Glu

530

<210> 82

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat CTLA4_T03-R

<400> 82

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His

65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala

130 135 140

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala

145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val

165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val

435 440 445
Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu

530

<210> 83

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat CTLA4_T04-L

<400> 83

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala

130 135 140

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val

165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala

245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly

260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys

275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly

305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

340 345 350
 Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
 355 360 365
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380
 Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu

 385 390 395 400
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 405 410 415
 Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 420 425 430
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 435 440 445
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460

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

530

<210> 84

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat CTLA4_T04-R

<400> 84

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys

1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
 35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

 50 55 60
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110
 Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125

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

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

260 265 270
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 275 280 285
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 305 310 315 320
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350
 Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
 355 360 365
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380
 Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 405 410 415
 420 425 430
 Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 435 440 445
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 450 455 460
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 465 470 475 480
 Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 485 490 495
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 500 505 510
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala

515 520 525

Leu Glu

530

<210> 85

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat PDCD1_T01-L

<400> 85

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala

130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val

165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
340 345 350

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val

435 440 445
Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu

530

<210> 86

<211> 529

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat PDCD1_T01-R

<400> 86

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala

130 135 140

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val

165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala

245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly

260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln

275 280 285

Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His

290 295 300

Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly

305 310 315 320

Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln

325 330 335

Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly

340 345 350
 Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu
 355 360 365
 Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro

 385 390 395 400
 Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile
 405 410 415
 Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu
 420 425 430
 Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val
 435 440 445
 Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln
 450 455 460

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

<210> 87

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat PDCD1_T03-L

<400> 87

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys

1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
 35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

 50 55 60
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 65 70 75 80
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110
 Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125

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

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

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 260 | | | | 265 | | | | 270 | | | |
| Leu | Thr | Pro | Gln | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | Asn | Asn | Gly | Gly | Lys |
| 275 | | | | 280 | | | | 285 | | | | | | | |
| Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val | Leu | Cys | Gln | Ala |
| 290 | | | | 295 | | | | 300 | | | | | | | |
| His | Gly | Leu | Thr | Pro | Gln | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | Asn | Asn | Gly |
| 305 | | | | 310 | | | | 315 | | | | 320 | | | |
| Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val | Leu | Cys |
| 325 | | | | 330 | | | | 335 | | | | | | | |
| Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | Pro | Gln | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | Asn |
| 340 | | | | 345 | | | | 350 | | | | | | | |
| Asn | Gly | Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val |
| 355 | | | | 360 | | | | 365 | | | | | | | |
| Leu | Cys | Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | Pro | Gln | Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala |
| 370 | | | | 375 | | | | 380 | | | | | | | |
| Ser | Asn | Asn | Gly | Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg | Leu | Leu |
| 385 | | | | 390 | | | | 395 | | | | 400 | | | |
| Pro | Val | Leu | Cys | Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | Pro | Glu | Gln | Val | Val | Ala |
| 405 | | | | 410 | | | | 415 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ile | Ala | Ser | His | Asp | Gly | Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val | Gln | Arg |
| 420 | | | | 425 | | | | 430 | | | | | | | |
| Leu | Leu | Pro | Val | Leu | Cys | Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | Pro | Glu | Gln | Val |
| 435 | | | | 440 | | | | 445 | | | | | | | |
| Val | Ala | Ile | Ala | Ser | His | Asp | Gly | Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Thr | Val |
| 450 | | | | 455 | | | | 460 | | | | | | | |
| Gln | Arg | Leu | Leu | Pro | Val | Leu | Cys | Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr | Pro | Glu |
| 465 | | | | 470 | | | | 475 | | | | 480 | | | |
| Gln | Val | Val | Ala | Ile | Ala | Ser | Asn | Ile | Gly | Gly | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu |
| 485 | | | | 490 | | | | 495 | | | | | | | |
| Thr | Val | Gln | Ala | Leu | Leu | Pro | Val | Leu | Cys | Gln | Ala | His | Gly | Leu | Thr |
| 500 | | | | 505 | | | | 510 | | | | | | | |

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala

515 520 525

Leu Glu

530

<210> 88

<211> 529

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repeat PDCD1_T03-R

<400> 88

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His

65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala

130 135 140

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val

165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu
420 425 430

Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val

435 440 445
Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln
450 455 460
Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln
465 470 475 480
Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr
485 490 495
Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro
500 505 510

Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala Leu
515 520 525
Glu

<210> 89
<211> 2814
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> CTLA4_T01-L TALEN
<400> 89

| | |
|--|-----|
| atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac | 60 |
| gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc | 120 |
| aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgcag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt | 180 |
| acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccgcgcag cgtagggac cgtcgtctgc | 240 |
| | |
| aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc | 300 |
| ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg | 360 |
| agaggccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaa acgtggcggc | 420 |
| gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac | 480 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag | 540 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccccag gcttgacccc ccagcaggtg | 600 |
| gtggccatcg ccagcaataa tggcggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgttg | 660 |

| | |
|---|------|
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggaggccat cgccagccac | 720 |
| gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc | 780 |
| cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 840 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 900 |
| caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 960 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc | 1020 |
| agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc | 1080 |
| | |
| cagggccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tggaggcaag | 1140 |
| caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1200 |
| ccggagcagg tggaggccat cgccagccac gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc | 1260 |
| cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cagggcttga ccccgagca ggtggtggcc | 1320 |
| atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg | 1380 |
| ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc | 1440 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 1500 |
| | |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag | 1560 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc cagggccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 1620 |
| gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 1680 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggaggccat cgccagcaat | 1740 |
| ggcggtgcca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc | 1800 |
| cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 1860 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 1920 |
| | |
| caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 1980 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccctc agcaggtggt ggccatcgcc | 2040 |
| agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat | 2100 |
| ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcct tggcctgcct cggcggcggt | 2160 |
| cctgcgttgg atgcagtga aaagggttg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg | 2220 |
| aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac | 2280 |
| gagtacatcg agctgatga gatcggcgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg | 2340 |
| | |
| aagtgatagg agttcttcat gaagtgtag ggctacagg gcaagcacct gggcggtcc | 2400 |
| aggaagccc acggcgccat ctacaccgtg ggtccccca 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 caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700
 tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag 2760

gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cgcccgactg ataa 2814

<210> 90
 <211> 2832
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CTLA4_T01-R TALEN
 <400> 90

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc 60
 gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
 cagcaacagg agaagatcaa accgaagggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggca 180
 ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg 240

ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cggtgccaga ggcgacacac 300
 gaagcgatcg ttggcgctgg caaacagtgg tccggcgac gcgctctgga ggccttgctc 360
 acggtggcgg gagagtttag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420
 attgcaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg 480
 acgggtgccc cgctcaactt gacccccag cagggtggtgg ccatcgccag caataatggt 540
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgttgcca ggcccacggc 600
 ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcgcaagca ggcgctggag 660

acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg 720
 gtggccatcg ccagcaatat tggtaggaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg 780
 ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc cccagcagg tggtagccat cgccagcaat 840
 aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 900
 cacggttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtg caagcaggcg 960
 ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 1020
 caggtggtgg ccatcgccag caatatggt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg 1080

ctgttgccgg tgcgttgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1140
 agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1200

| | |
|--|------|
| caggccacg gcttgacccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtaggaag | 1260 |
| caggcgctgg agacgggtgca ggcgtgtgtg ccggtgtgtg gccaggccca cggcttgacc | 1320 |
| ccggagcagg tggtaggcat cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc | 1380 |
| cagcggctgt tgccggtgtg gtgccaggcc cagcgcttga ccccgagca ggtggtggcc | 1440 |
| atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg | 1500 |
| ctgtgccagg ccacaggctt gacccccag caggtaggtg ccatcgccag caataatgt | 1560 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccg tgctgtgcca gggccacggc | 1620 |
| ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc agcaataatg ttggcaagca ggcgctggag | 1680 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgtg caggccacg gcttgacccc ccagcagggtg | 1740 |
| gtggccatcg ccagcaataa tggtaggaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 1800 |
| ccggtgtgtg gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtaggcat cgccagcaat | 1860 |
| attggtggca agcaggcgct ggagacgggt caggcgctgt tgccggtgtg gtgccaggcc | 1920 |
| caggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg | 1980 |
| ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg ccacaggctt gaccctcag | 2040 |
| caggtaggtg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc | 2100 |
| cagttatctc gccctgatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg | 2160 |
| gcctgcctcg gggggcgtcc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatectatc | 2220 |
| agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag | 2280 |
| ctgaagtacg tgccccagca gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccgaa 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 ccttgaggga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg | 2820 |
| gccgactgat aa | 2832 |
| <210> 91 | |
| <211> 2814 | |
| <212> DNA | |

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4_T03-L TALEN

<400> 91

| | |
|---|------|
| atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacatgtt tccagattac | 60 |
| gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc | 120 |
| aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgcag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt | 180 |
| | |
| acacacgcgc acatcgttgc gtttaagcaa cccccggcag cgttagggac cgtcgctgtc | 240 |
| aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc | 300 |
| ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagtgt | 360 |
| agaggctcac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc | 420 |
| gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac | 480 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag | 540 |
| acgttccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 600 |
| | |
| gtggccatcg ccagcaatgg cggtaggcaag caggcgttgg agacgggtcca gcggtgtttg | 660 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtaggcat cgccagcaat | 720 |
| ggcggtaggca agcaggcgtt ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtgt gtgccaggcc | 780 |
| cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 840 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccgttg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 900 |
| caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 960 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc | 1020 |
| | |
| agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc | 1080 |
| caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaatgg cggtaggcaag | 1140 |
| caggcgttgg agacgggtcca gcggtgtttg ccggtgtgtt gccaggccca cggcttgacc | 1200 |
| ccccagcagg tggtaggcat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgtt ggagacggtc | 1260 |
| cagcggctgt tgccgggtgt gtgccaggcc cagcgttga ccccgagca ggtggtggcc | 1320 |
| atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccgggtg | 1380 |
| ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcgtt | 1440 |
| | |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 1500 |
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag | 1560 |
| acgttgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 1620 |
| gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag caggcgttgg agacgggtcca gcggtgtttg | 1680 |

ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggaggccat cgccagccac 1740
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1800
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg 1860

ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 1920
cagtggtggtg ccatcgccag caatattggt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg 1980
ctgttgccgg tctgtgtcca ggcccacggc ttgaccctc agcagggtgt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgtggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat 2100
ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcct tggcctgcct cggcggcgct 2160
cctgcgttg atgcagtga aaagggttg ggggatccta tcagccgtt ccagctggtg 2220
aagtcgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280

gagtacatcg agctgatcg gatcgcccg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg 2340
aagtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggctcc 2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag 2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaaggcg 2640
aactacaagg ccagcgtgac caggtgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700

tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag 2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cgcccgactg ataa 2814

<210> 92
<211> 2832
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> CTLA4_T03-RTALEN
<400> 92

atgggcgatc ctaaaagaa acgtaaggc atcgataagg agaccgccc tgccaagtgc 60
gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggca 180

ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg 240
ttagggaccg tcgtgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac 300
gaagcgatcg ttggcgctcg caaacagtgg tccggcgac gcgctctgga ggccttgctc 360

| | |
|--|------|
| acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag | 420 |
| attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg | 480 |
| acgggtgccc cgctcaactt gacccccag caggtggtgg ccatgccag caataatggt | 540 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc | 600 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag | 660 |
| acgtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 720 |
| gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 780 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggccat cgccagccac | 840 |
| gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 900 |
| cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg | 960 |
| ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag | 1020 |
| caggtggtgg ccatgccag caataatggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 1080 |
| ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatgcc | 1140 |
| agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acgtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc | 1200 |
| caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag | 1260 |
| caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc | 1320 |
| ccggagcagg tgggtggccat cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc | 1380 |
| cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc | 1440 |
| atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg | 1500 |
| ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatgccag caatatggt | 1560 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc | 1620 |
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag | 1680 |
| acgtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 1740 |
| gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg | 1800 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc cccagcagg tgggtggccat cgccagcaat | 1860 |
| aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1920 |
| cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 1980 |
| ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag | 2040 |
| caggtggtgg ccatgccag caatggcggc ggccaggccg cgctggagag cattgttgcc | 2100 |
| cagttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtgccttg | 2160 |
| gcctgcctcg gcgggcgtcc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc | 2220 |

agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280

ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccacg 2340

gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400

aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac 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> 93

<211> 2814

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4_T04-L TALEN

<400> 93

atgggcgac ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120

aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt 180

acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccgcgcag cgtagggac cgtcgtgtc 240

aagtatcagg acatgatcg agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300

ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagtgtg 360

agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaa acgtggcggc 420

gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgtcaac 480

ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcgcaagca ggcgctggag 540

acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 600

gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggctgtt 660

ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc ccggagcagg tggtaggcat cgccagcaat 720

attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc 780

cacggcttga cccccacga ggtggtggcc atcgccagca atggcgggtg caagcaggcg 840

| | |
|---|------|
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag | 900 |
| caggtggtgg ccatcgccag caataatggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 960 |
| | |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc | 1020 |
| agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc | 1080 |
| cagggccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaatgg cggcggcaag | 1140 |
| caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1200 |
| ccggagcagg tggcggccat cgccagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacggtg | 1260 |
| caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc cagggttga cccccagca ggtggtggcc | 1320 |
| atcgccagca ataattggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg | 1380 |
| | |
| ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc | 1440 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 1500 |
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag | 1560 |
| acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc cagggccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 1620 |
| gtggccatcg ccagcaatat tggcggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg | 1680 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggcggccat cgccagcaat | 1740 |
| ggcggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagggtgtgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1800 |
| | |
| cagggttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataattggtg 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 cccagttatc tcgccctgat | 2100 |
| ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcctt tggcctgcct cggcgggct | 2160 |
| cctgcgctgg atgcagtga aaagggttgg ggggaccta tcagccgttc ccagctggtg | 2220 |
| | |
| aagtcagagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac | 2280 |
| gagtacatcg agctgatcga gatcggcgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg | 2340 |
| aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggctcc | 2400 |
| aggaagcccc acggcgccat ctacacgtg ggctccccc tcgactacgg cgtgatcgtg | 2460 |
| gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag | 2520 |
| aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag | 2580 |

gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttctg tgtccggcca ctccaagggc 2640

aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700

tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760

gaggtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

<210> 94

<211> 2832

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4_T04-R TALEN

<400> 94

atgggcgac ctaaaaagaa acgtaaggta atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc 60

gagagacagc acatggacag catcgataac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120

cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggcca 180

ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg 240

ttagggaccg tcgtgtgtaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac 300

gaagcgatcg ttggcgtagg caaacagtgg tccggcgac gcgctctgga ggccttgctc 360

acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420

attgcaaaac gtggcgagcg gaccgcagtg gaggcagtg atgatggcg caatgcactg 480

acgggtgccc cgtcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 540

ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc 600

ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggaagca ggcgctggag 660

acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 720

gtggccatcg ccagcaatgg cggtaggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg 780

ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg ttggtggcat cgccagcaat 840

aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 900

cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataaggtgg caagcaggcg 960

ctggagacgg tcagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 1020

caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080

ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc 1140

agccacgatg gcggaagca ggcgtggag acggtccagc ggtgtgtgcc ggtgctgtgc 1200

caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat ttggtgcaag 1260

| | |
|--|------|
| caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc | 1320 |
| ccccagcagg tggtaggcat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc | 1380 |
| cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc caggccttga cccccagca ggtggtggcc | 1440 |
| atgccagca atggcggtag caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtg gttgccggtg | 1500 |
| ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtaggtg ccatgccag caatattggt | 1560 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgcgtgccca ggcccacggc | 1620 |
| ttgaccccg agcaggtagt ggccatgcc agccacgatg gcgcaagca ggcgctggag | 1680 |
| acggtccagc ggcgtgtgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgaccc ggagcaggtag | 1740 |
| gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 1800 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtaggcat cgccagcaat | 1860 |
| attgtaggca agcaggcgct ggagacggtag caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1920 |
| caggccttga ccccgagca ggtggtggcc atgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 1980 |
| ctggagacgg tccagcggtg gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag | 2040 |
| caggtaggtg ccatgccag caatggcggc ggccaggcgg cgctggagag cattgttgc | 2100 |
| cagttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg | 2160 |
| gcctgcctcg gcgggcgtcc tgcgtggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc | 2220 |
| agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag | 2280 |
| ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tgcggcgaa cagcaccag | 2340 |
| gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc | 2400 |
| aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggcgcatct acaccgtggg ctccccatc | 2460 |
| gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc | 2520 |
| caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac | 2580 |
| cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg | 2640 |
| tcgggcaact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac | 2700 |
| tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc | 2760 |
| ggcacctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg | 2820 |
| gccgactgat aa | 2832 |
| <210> 95 | |
| <211> 2814 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |

<220><223> PDCD1_T01-L TALEN

<400> 95

| | |
|--|------|
| atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgaatgt tccagattac | 60 |
| | |
| gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc | 120 |
| aaaccgaagg ttctgttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt | 180 |
| acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccgcgcag cgttagggac cgtcgtgtc | 240 |
| aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcga cgttggcgtc | 300 |
| ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagtgc | 360 |
| agaggctcac 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 ggagcaggtg | 600 |
| gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgttgg agacggtcca gcggtgttg | 660 |
| ccggtgtgtg gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtagccat cgccagcaat | 720 |
| ggcgttgcca agcaggcgtt ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 780 |
| cacggttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 840 |
| ctggagacgg tcagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 900 |
| | |
| caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 960 |
| ctgttgccgg tgcgtgtcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc | 1020 |
| agccacgatg gcggcaagca ggcgttgag acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgtc | 1080 |
| caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag | 1140 |
| caggcgttgg agacggtcca gcggtgttg ccggtgtgt gccaggccca cggcttgacc | 1200 |
| ccggagcagg tggtagccat cgccagcaat attggtggca agcaggcgtt ggagacggtg | 1260 |
| caggcgtgt tgccggtgt gtgccaggcc caggttga cccccagca ggtggtggcc | 1320 |
| | |
| atcgccagca ataattggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg | 1380 |
| ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc | 1440 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgcgtgtcca ggcccacggc | 1500 |
| ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag | 1560 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgtc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 1620 |
| gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgttgg agacggtcca gcggtgttg | 1680 |

| | |
|--|------|
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggaggccat cgccagcaat | 1740 |
| ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1800 |
| cacggttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtg caagcaggcg | 1860 |
| ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag | 1920 |
| caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 1980 |
| ctgttgccgg tctgtgtcca ggcccacggc ttgaccttc agcaggtggt ggccatcgcc | 2040 |
| agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat | 2100 |
| ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcct tggcctgcct cggcgggct | 2160 |
| ctgctgctgg atgcagtga aaagggttg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg | 2220 |
| aagtccgagc tggaggagaa gaaatccag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac | 2280 |
| gagtacatcg agctgatcga gatcggcgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg | 2340 |
| aaggtgatgg agttcttcac gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggctcc | 2400 |
| aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg | 2460 |
| gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgccatcg gccaggccga cgaaatgcag | 2520 |
| aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag | 2580 |
| gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttaagggc | 2640 |
| aactacaagg ccagcgtgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg gccgtgctg | 2700 |
| tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gacctggag | 2760 |
| gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttc cggccgactg ataa | 2814 |
| <210> 96 | |
| <211> 2829 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> PDCD1_T01-R TALEN | |
| <400> 96 | |
| atgggcgatc ctaaaagaa acgtaaggc atcgataagg agaccggcg tgccaagttc | 60 |
| gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag | 120 |
| cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgagca ccacaggcca | 180 |
| ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttcgt taagccaaca cccggcagcg | 240 |
| ttagggaccg tcgtgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac | 300 |
| gaagcgatcg ttggcgctcg caaacagtgg tccggcgac gcgctctgga ggccttgctc | 360 |

| | |
|--|------|
| acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag | 420 |
| attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtg atgcatggcg caatgcactg | 480 |
| | |
| acgggtgccc cgtcaactt gacccccag caagtcgtcg caatcgccag caataacgga | 540 |
| gggaagcaag ccctcgaac cgtgcagcgg ttgcttcctg tgctctgcca gggccacggc | 600 |
| cttaccctg agcaggtggt ggccatcgca agtaacattg gaggaagca agccttgag | 660 |
| acagtgcagg cctgttgcc cgtgtgtgc caggcacacg gcctcacacc agagcaggtc | 720 |
| gtggccattg cctcaacat cggggggaaa caggctctgg agaccgtcca ggccctgctg | 780 |
| cccgtcctct gtcaagtcga cggcctgact cccaacaag tggtcgcat cgcctctaat | 840 |
| aacggcggga agcaggcact ggaaacagtg cagagactgc tccctgtgct ttgccaagct | 900 |
| | |
| catgggttga ccccccaaca ggtcgtcgt attgcctcaa acaacggggg caagcaggcc | 960 |
| cttgagactg tgcagaggct gttgccagtg ctgtgtcagg ctacgggct cactccaaa | 1020 |
| caggtggtcg caattgccag caacggcggc ggaaagcaag ctcttgaaac cgtgcaacgc | 1080 |
| ctctgcccg tgctctgtca ggctcatggc ctgacaccac aacaagtcgt ggccatcgcc | 1140 |
| agtaataatg gcgggaaaca ggctcttgag accgtccaga ggctgctccc agtgctctgc | 1200 |
| caggcacacg ggctgacccc ccagcaggtg gtggctatcg ccagcaataa tgggggcaag | 1260 |
| caggccctgg aaacagtcca gcgcctgctg ccagtgttt gccaggctca cgggctcact | 1320 |
| | |
| cccgaacagg tcgtggcaat cgcctccaac ggagggaagc aggctctgga gaccgtgcag | 1380 |
| agactgctgc ccgtcttggt ccaggccccc ggactcacac ctacagcaggt cgtcgccatt | 1440 |
| gcctctaaca acgggggcaa acaagccctg gagacagtgc agcggctgtt gcctgtgttg | 1500 |
| tgccaagccc acggcttgac tctcaacaa gtggtcgcca tcgcctcaaa tggcggcgga | 1560 |
| aaacaagctc tggagacagt gcagaggttg ctccccgtcc tctgccaagc ccacggcctg | 1620 |
| actcccaac aggtcgtcgc cattgccagc aacggcggag gaaagcaggc tctcgaaact | 1680 |
| gtgcagcggc tgcttcctgt gctgtgtcag gctcatgggc tgacccccca gcaagtgggtg | 1740 |
| | |
| gctattgcct ctaacaatgg aggcaagcaa gcccttgaga cagtccagag gctgttgcca | 1800 |
| gtgtgtgcc agggccacgg gctcacacc cagcaggtgg tcgcatcgc cagtaacggc | 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 ctgatccggc gttggccgcg ttgaccaacg accacctcgt cgccttggcc | 2160 |
| tgctcggcg ggcgtcctgc gctggatgca gtgaaaaagg gattggggga tcctatcagc | 2220 |
| cgttcccagc tggatgaagtc cgagctggag gagaagaaat ccgagttgag gcacaagctg | 2280 |
| aagtacgtgc cccacgagta catcgagctg atcgagatcg cccggaacag caccagggac | 2340 |
| cgtatcctgg agatgaaggt gatggagttc ttcataaagg tgtacggcta caggggcaag | 2400 |
| cacctggcg gctccaggaa gcccgcggc gccatctaca ccgtgggctc ccccatcgac | 2460 |
| tacggcgtga tcgtggacac caaggcctac tccggcggct acaacctgcc catcgccag | 2520 |
| gccgacgaaa tgcagaggtg cgtggaggag aaccagacca ggaacaagca catcaacccc | 2580 |
| aacgagtggg ggaagggtga cccctccagc gtgaccgagt tcaagttcct gttcgtgtcc | 2640 |
| ggccacttca agggcaacta caaggcccag ctgaccaggc tgaaccacat caccaactgc | 2700 |
| aacggcgccg tgctgtccgt ggaggagctc ctgatcggcg gcgagatgat caaggccggc | 2760 |
| accctgacct tggaggaggt gaggaggaag ttcaacaacg gcgagatcaa cttcgcggcc | 2820 |
| gactgataa | 2829 |
| <210> 97 | |
| <211> 2814 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> PDCD1_T03-L TALEN | |
| <400> 97 | |
| atgggcgac ctaaaaagaa acgtaaggct atcgattacc catacatgtg tccagattac | 60 |
| gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc | 120 |
| aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggctcg ccacgggttt | 180 |
| acacacgcgc acatcgttgc gtttaagcaa caccgcgcag cgttagggac cgtcgtgtc | 240 |
| aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc | 300 |
| ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg | 360 |
| agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaa acgtggcggc | 420 |
| gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac | 480 |
| ttgaccccg agcagggtgt ggccatcgcc agcaatatg gtggcaagca ggcgctggag | 540 |
| acggtgcagg cgtgtgtgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg | 600 |
| gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgtgg agacggtcca gcggtgttg | 660 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggcat cgccagccac | 720 |

| | |
|---|------|
| gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 780 |
| cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggagg caagcaggcg | 840 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 900 |
| caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg | 960 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc | 1020 |
| agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc | 1080 |
| caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tggtaggaag | 1140 |
| caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc | 1200 |
| ccccagcagg tggtaggcat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc | 1260 |
| cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc | 1320 |
| atcgccagca ataattggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg | 1380 |
| ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt | 1440 |
| ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc | 1500 |
| ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgtggag | 1560 |
| acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg | 1620 |
| gtggccatcg ccagcaataa tggtaggaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg | 1680 |
| ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc ccggagcagg tggtaggcat cgccagccac | 1740 |
| gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc | 1800 |
| cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg | 1860 |
| ctggagacgg tccagcggtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag | 1920 |
| caggtggtgg ccatcgccag caatatggtt ggcaagcagg cgctggagac ggtcagcgg | 1980 |
| ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc | 2040 |
| agcaatggcg gcggcaggcc ggcgtggag agcattgttg ccagttatc tcgcctgat | 2100 |
| ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctgctgcct tggcctgcct cggcgggct | 2160 |
| cctgcgttgg atgcagtga aaaggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg | 2220 |
| aagtccgagc tggaggagaa gaaatccag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac | 2280 |
| gagtacatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg | 2340 |
| aagtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggtcc | 2400 |
| aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg | 2460 |

| | |
|---|------|
| gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag | 2520 |
| aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag | 2580 |
| gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca ctccaagggc | 2640 |
| aactacaagg ccagcgtgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg gcccgctgtg | 2700 |
| tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag | 2760 |
| gaggtgagga ggaagttaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa | 2814 |
| <210> 98 | |
| <211> 2829 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> PDCD1_T03-R TALEN | |
| <400> 98 | |
| atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagtgc | 60 |
| gagagacagc acatggacag catcgatata 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 ttggcgctgg caaacagtgg tccggcgac gcgctctgga ggccttgctc | 360 |
| acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagtgg acacaggcca acttctcaag | 420 |
| attgcaaac gtggcgcgct gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg | 480 |
| acgggtgccc cgtcaactt gacccccgag caagtcgtcg caatcgccag ccatgatgga | 540 |
| gggaagcaag cctcgaaac cgtgcagcgg ttgcttctg tgctctgcca gggccacggc | 600 |
| cttaccctc agcaggtggt ggccatcgca agtaacggag gaggaagca agccttgag | 660 |
| acagtgcagc gcctgttgcc cgtgtgtgac caggcacacg gcctcacacc agagcaggtc | 720 |
| gtggccattg cctcccatga cggggggaaa caggctctgg agaccgtcca gaggtgctg | 780 |
| cccgtcctct gtcaagctca cggcctgact cccaacaag tggtcgcat cgcctctaat | 840 |
| ggcggcgagg agcaggcact ggaaacagtg cagagactgc tccctgtgct ttgccaagct | 900 |
| catgggttga ccccccaaca ggtcgtcgtc attgcctcaa acgggggggg caagcaggcc | 960 |
| cttgagactg tgcagaggct gttgccagtg ctgtgtcagg ctcacgggct cactccaaa | 1020 |
| caggtggtcg caattgccag caacggcggc ggaaagcaag ctcttgaaac cgtgcaacgc | 1080 |
| ctcctgcccg tgctctgtca ggctcatggc ctgacaccac aacaagtcgt ggccatcgcc | 1140 |

| | |
|--|------|
| agtaataatg gcgggaaaca ggctcttgag accgtccaga ggctgctccc agtgctctgc | 1200 |
| caggcacacg ggctgacccc cgagcagggtg gtggctatcg ccagcaatat tgggggcaag | 1260 |
| caggccctgg aaacagtcca ggccctgctg ccagtgettt gccagggtca cgggctcact | 1320 |
| ccccagcagg tcgtggcaat cgcctccaac ggcgaggga agcaggctct ggagaccgtg | 1380 |
| cagagactgc tccccgtctt gtgccaggcc caggactca cacctgaaca ggtcgtcgcc | 1440 |
| attgcctctc acgatggggg caaacaagcc ctggagacag tgcagcggt gtgacctgtg | 1500 |
| ttgtgccaag ccacggctt gactcctcaa caagtggctg ccatcgctc aaatggcggc | 1560 |
| ggaaaacaag ctctggagac agtgcagggt ttctgtcccg tcctctgcca agcccacggc | 1620 |
| ctgactcccc aacaggctgt cgccattgcc agcaacaacg gaggaagca ggctctcgaa | 1680 |
| actgtgcagc ggctgcttcc tgtgtgtgt caggctcatg ggctgacccc cgagcaagtg | 1740 |
| gtggctattg cctctaattg aggcaagcaa gcccttgaga cagtccagag gctgttgcca | 1800 |
| gtgtgtgtcc agggccacgg gctcacaccc cagcagggtg tcgccatcgc cagtaacaac | 1860 |
| gggggcaaac aggcattgga aaccgtccag cgctgtctc cagtgtctg ccaggcacac | 1920 |
| ggactgacac ccgaacaggt ggtggccatt gcatcccatg atgggggcaa gcaggccctg | 1980 |
| gagaccgtgc agagactcct gccagtgttg tgccaagctc acggcctcac cctcagcaa | 2040 |
| gtcgtggcca tcgcctcaaa cggggggggc cggcctgcac tggagagcat tgttgcccag | 2100 |
| ttatctcgcc ctgatacggc gttggccggt ttgaccaacg accacctcgt cgccttggcc | 2160 |
| tgctcggcg ggctgtctgc gctggatgca gtgaaaaagg gattggggga tcctatcagc | 2220 |
| cgttcccagc tggatgaagtc cgagctggag gagaagaaat ccgagttgag gcacaagctg | 2280 |
| aagtacgtgc ccacagagta catcgagctg atcgagatcg cccggaacag caccagagac | 2340 |
| cgtatcctgg agatgaaggt gatggagtgc ttcatgaagg tgtacggcta caggggcaag | 2400 |
| cacctgggctg gctccaggaa gcccagggc gccatctaca ccgtgggctc ccccatcgac | 2460 |
| tacggcgtga tcgtggacac caaggcctac tccggcggct acaacctgcc catcggccag | 2520 |
| gccgacgaaa tgcagaggta cgtggaggag aaccagacca ggaacaagca catcaacccc | 2580 |
| aacgagtggg ggaagggtga cccctccagc gtgaccgagt tcaagttcct gttcgtgtcc | 2640 |
| ggccacttca agggcaacta caaggcccag ctgaccaggc tgaaccacat caccaactgc | 2700 |
| aacggcgccg tctgtccgt ggaggagctc ctgatcggcg gcgagatgat caaggccggc | 2760 |
| acctgaccc tggaggagggt gaggaggaag ttcaacaacg gcgagatcaa cttcgcggcc | 2820 |
| gactgataa | 2829 |
| <210> 99 | |
| <211> 60 | |

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer CTLA4_T01

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(40)

<223> n is a or c or t or g

<400> 99

ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn ctctacttcc tgaagacctg 60

60

<210> 100

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer CTLA4_T03/T04

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(40)

<223> n is a or c or t or g

<400> 100

ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn acagttgaga gatggagggg 60

60

<210> 101

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer PDCD1_T01

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(40)

<223> n is a or c or t or g

<400> 101

ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn ccacagaggt aggtgccgc 59

<210> 102

<211> 60

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer PDCD1_T03

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(40)

<223> n is a or c or t or g

<400> 102

ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn gacagagatg ccggtcacca 60

60

<210> 103

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer CTLA4_T01

<400> 103

cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag tggaatacag agccagccaa 50

<210> 104

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer CTLA4_T03/04

<400> 104

cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag ggtgcccggtg cagatggaat 50

<210> 105

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer PDCD1_T01

<400> 105

cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag ggctctgcag tggaggccag 50

<210> 106

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer PDCD1_T03

<400> 106

cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag ggacaacgcc accttcacct

50

<210> 107

<211> 281

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTalpha-FL

<400> 107

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro

20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu

35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser

50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro

65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser

85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly

100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu

115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro

130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu

145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala

165 170 175

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

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

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser Leu Gly Ala Phe Phe Arg Gly Asp Leu
 260 265 270
 Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala Ala
 275 280

<210> 108
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pTalpha-Delta18
 <400> 108

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro

20 25 30
 Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45
 Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60
 Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80
 Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser

85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly

100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu

115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro

130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu

145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala

165 170 175

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

180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr

195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro

210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu

225 230 235 240

Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Arg

245 250 255

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser

260

<210> 109

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTalpha-Delta48

<400> 109

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro

[illegible]

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | |
| Ala | Glu | Gly | His | Ser | Arg | Ser | Thr | Gln | Pro | Met | His | Leu | Ser | Gly | Glu |
| 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | |
| Ala | Ser | Thr | Ala | Arg | Thr | Cys | Pro | Gln | Glu | Pro | Leu | Arg | Gly | Thr | Pro |
| 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| Gly | Gly | Ala | Leu | Trp | Leu | Gly | Val | Leu | Arg | Leu | Leu | Leu | Phe | Lys | Leu |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Leu | Leu | Phe | Asp | Leu | Leu | Leu | Thr | Cys | Ser | Cys | Leu | Cys | Asp | Pro | Ala |
| 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | |

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val

225

 $\langle 210 \rangle$ 110

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 \angle

220><223> pTalpha-Delta62

<400> 110

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro

20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu

35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser

50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro

65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser

85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly

100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu

115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro

130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu

145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala

165 170 175

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

180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr

195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg

210 215

<210> 111

<211> 203

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTalpha-Delta78

<400> 111

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro

20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu

35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser

50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro

65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser

85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly

100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu

115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro

130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu

145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala

165 170 175

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

180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly

195 200

<210> 112

<211> 189

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTalpha-Delta92

<400> 112

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro

20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu

35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser

50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro

65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser

85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly

100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu

115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro

130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu

145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala

165 170 175

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

180 185

<210> 113

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTalpha-Delta110

<400> 113

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro

20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu

35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser

50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro

65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser

85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly

100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu

115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro

130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu

145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys

165 170

<210> 114

<211> 167

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTalpha-Delta114

<400> 114

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30
 Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45
 Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80
 Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
 85 90 95
 Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100 105 110
 Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115 120 125
 Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro

130 135 140
 Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu
 165

<210> 115
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pTalpha-FL-CD28
 <400> 115

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro

20 25 30
 Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu
225 230 235 240

Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Arg
245 250 255

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser Leu Gly Ala Phe Phe Arg Gly Asp Leu
260 265 270

Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Gly Gly Val Leu Ala
275 280 285

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

Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro

305 310 315 320

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro

325 330 335

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

340

<210> 116

<211> 311

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTalpha-FL-CD8

<400> 116

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro

20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu

35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser

50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro

65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser

85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly

100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu

115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro

130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu

145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala

165 170 175

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

180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr

195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro

210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu

225 230 235 240

Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Arg

245 250 255

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser Leu Gly Ala Phe Phe Arg Gly Asp Leu

260 265 270

Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser His Arg Asn Arg Arg

275 280 285

Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser Gly Asp Lys Pro

290 295 300

Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val

305 310

<210> 117

<211> 325

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTalpha-FL-41BB

<400> 117

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro

20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu

35 40 45
 Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60
 Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80
 Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
 85 90 95
 Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100 105 110
 Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115 120 125
 Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
 130 135 140
 Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
 145 150 155 160
 Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
 165 170 175
 Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
 180 185 190
 Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
 195 200 205
 Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
 210 215 220
 Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu
 225 230 235 240
 Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Arg
 245 250 255
 Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser Leu Gly Ala Phe Phe Arg Gly Asp Leu
 260 265 270
 Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala Ala Gly Ser Lys Arg Gly Arg Lys
 275 280 285

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
290 295 300

Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu
305 310 315 320

Gly Gly Cys Glu Leu
325

<210> 118
<211> 296
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> pTalpha-Delta48-CD28
<400> 118

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
 165 170 175
 Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
 180 185 190
 Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
 195 200 205
 Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
 210 215 220
 Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Ala Ser Gly Gly Val Leu Ala
 225 230 235 240
 Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
 245 250 255
 Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
 260 265 270
 Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
 275 280 285
 Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 290 295
 <210> 119
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pTalpha-Delta48-CD8
 <400> 119
 Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30
 Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45
 Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65 70 75 80
Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85 90 95
Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly

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

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

245 250 255
Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
260

<210> 120

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTalpha-Delta48-41BB

<400> 120

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1 5 10 15
Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20 25 30
Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35 40 45
Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50 55 60
Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65 70 75 80
Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85 90 95
Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100 105 110
Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115 120 125
Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130 135 140
Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145 150 155 160
Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
165 170 175
Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
180 185 190
Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
195 200 205
Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
210 215 220
Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Gly Ser Lys Arg Gly Arg Lys
225 230 235 240
Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|-----|-----|-----|-----|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|-----|
| | | | | | 245 | | | | | | 250 | | | | | | | | 255 |
| Thr | Gln | Glu | Glu | Asp | Gly | Cys | Ser | Cys | Arg | Phe | Pro | Glu | Glu | Glu | Glu | | | | |
| | | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | |
| Gly | Gly | Cys | Glu | Leu | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | 275 | | | | | | | | | | | | | | |
| <210> | | | | | 121 | | | | | | | | | | | | | | |
| <211> | | | | | 172 | | | | | | | | | | | | | | |
| <212> | | | | | PRT | | | | | | | | | | | | | | |
| <213> | | | | | Artificial Sequence | | | | | | | | | | | | | | |
| <220><223> | | | | | pTalpha-Delta114-TCRalpha.IC | | | | | | | | | | | | | | |
| <400> | | | | | 121 | | | | | | | | | | | | | | |
| Met | Ala | Gly | Thr | Trp | Leu | Leu | Leu | Leu | Leu | Ala | Leu | Gly | Cys | Pro | Ala | | | | |
| 1 | | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | | | |
| Leu | Pro | Thr | Gly | Val | Gly | Gly | Thr | Pro | Phe | Pro | Ser | Leu | Ala | Pro | Pro | | | | |
| | | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ile | Met | Leu | Leu | Val | Asp | Gly | Lys | Gln | Gln | Met | Val | Val | Val | Cys | Leu | | | | |
| | | | | | 35 | | | | | 40 | | | | 45 | | | | | |
| Val | Leu | Asp | Val | Ala | Pro | Pro | Gly | Leu | Asp | Ser | Pro | Ile | Trp | Phe | Ser | | | | |
| | | | | | 50 | | | | | 55 | | | | 60 | | | | | |
| Ala | Gly | Asn | Gly | Ser | Ala | Leu | Asp | Ala | Phe | Thr | Tyr | Gly | Pro | Ser | Pro | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | | | | | |
| Ala | Thr | Asp | Gly | Thr | Trp | Thr | Asn | Leu | Ala | His | Leu | Ser | Leu | Pro | Ser | | | | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | 95 | | | | | |
| Glu | Glu | Leu | Ala | Ser | Trp | Glu | Pro | Leu | Val | Cys | His | Thr | Gly | Pro | Gly | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | 100 | | | | | 105 | | | | 110 | | | | | |
| Ala | Glu | Gly | His | Ser | Arg | Ser | Thr | Gln | Pro | Met | His | Leu | Ser | Gly | Glu | | | | |
| | | | | | 115 | | | | | 120 | | | | 125 | | | | | |
| Ala | Ser | Thr | Ala | Arg | Thr | Cys | Pro | Gln | Glu | Pro | Leu | Arg | Gly | Thr | Pro | | | | |
| | | | | | 130 | | | | | 135 | | | | 140 | | | | | |
| Gly | Gly | Ala | Leu | Trp | Leu | Gly | Val | Leu | Arg | Leu | Leu | Leu | Phe | Lys | Leu | | | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | 160 | | | | | |
| Leu | Leu | Phe | Asp | Leu | Leu | Leu | Arg | Leu | Trp | Ser | Ser | | | | | | | | |

165

170

<210> 122

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTalpha.EC-TCRalpha. TM. IC

<400> 122

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro

20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu

35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser

50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro

65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser

85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly

100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu

115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro

130 135 140

Gly Gly Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala

145 150 155 160

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

165

170

<210> 123

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTalpha.EC-Delta48-1xMUT

<400> 123

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala

1 5 10 15
Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro

20 25 30
Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu

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

50 55 60
Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro

65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu

145 150 155 160
Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala

165 170 175
Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly

180 185 190
Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr

195 200 205
Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro

210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val

225 230

<210> 124

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTalpha.EC-Delta48-4xMUT

<400> 124

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro

20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Ala Gly Ala Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu

35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser

50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro

65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser

85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ser Thr Ala Ala Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro

130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu

145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala

165 170 175

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

180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val
225 230

<210> 125
<211> 848
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Multi-chain CAR
<400> 125

Met Ala Pro Ala Met Glu Ser Pro Thr Leu Leu Cys Val Ala Leu Leu

1 5 10 15
Phe Phe Ala Pro Asp Gly Val Leu Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser
20 25 30
Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
35 40 45
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln
50 55 60
Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn
65 70 75 80

Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
85 90 95
Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr
100 105 110
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr
115 120 125
Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
130 135 140
Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro
165 170 175

Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn
180 185 190

Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln
195 200 205

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
210 215 220

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg
225 230 235 240

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
245 250 255

His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
260 265 270

Lys Arg Ala Asp Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320

Asp Phe Phe Ile Pro Leu Leu Val Val Ile Leu Phe Ala Val Asp Thr
325 330 335

Gly Leu Phe Ile Ser Thr Gln Gln Gln Val Thr Phe Leu Leu Lys Ile
340 345 350

Lys Arg Thr Arg Lys Gly Phe Arg Leu Leu Asn Pro His Pro Lys Pro
355 360 365

Asn Pro Lys Asn Asn Arg Ala Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys
370 375 380

Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Asp Thr Glu Ser Asn Arg
385 390 395 400

Arg Ala Asn Leu Ala Leu Pro Gln Glu Pro Ser Ser Val Pro Ala Phe
405 410 415

Glu Val Leu Glu Ile Ser Pro Gln Glu Val Ser Ser Gly Arg Leu Leu

420

425

430

Lys Ser Ala Ser Ser Pro Pro Leu His Thr Trp Leu Thr Val Leu Lys

435

440

445

Lys Glu Gln Glu Phe Leu Gly Val Thr Gln Ile Leu Thr Ala Met Ile

450

455

460

Cys Leu Cys Phe Gly Thr Val Val Cys Ser Val Leu Asp Ile Ser His

465

470

475

480

Ile Glu Gly Asp Ile Phe Ser Ser Phe Lys Ala Gly Tyr Pro Phe Trp

485

490

495

Gly Ala Ile Phe Phe Ser Ile Ser Gly Met Leu Ser Ile Ile Ser Glu

500

505

510

Arg Arg Asn Ala Thr Tyr Leu Val Arg Gly Ser Leu Gly Ala Asn Thr

515

520

525

Ala Ser Ser Ile Ala Gly Gly Thr Gly Ile Thr Ile Leu Ile Ile Asn

530

535

540

Leu Lys Lys Ser Leu Ala Tyr Ile His Ile His Ser Cys Gln Lys Phe

545

550

555

560

Phe Glu Thr Lys Cys Phe Met Ala Ser Phe Ser Thr Glu Ile Val Val

565

570

575

Met Met Leu Phe Leu Thr Ile Leu Gly Leu Gly Ser Ala Val Ser Leu

580

585

590

Thr Ile Cys Gly Ala Gly Glu Glu Leu Lys Gly Asn Lys Val Pro Glu

595

600

605

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

610

615

620

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

625

630

635

640

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Ser Gly Val Lys Gln

645

650

655

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

660 665 670
 Pro Gly Pro Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val
 675 680 685
 Glu Gln Ala Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp
 690 695 700
 Ala Ile Leu Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg
 705 710 715 720
 Leu Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser

 725 730 735
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 740 745 750
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 755 760 765
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 770 775 780
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 785 790 795 800

 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 805 810 815
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 820 825 830
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 835 840 845

 <210> 126
 <211> 2547
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Multi-chain CAR
 <400> 126
 atggctctcg ccatggaatc cctactcta ctgtgtgtag ccttactgtt cttcgtcca 60

 gatggcgtgt tagcagaggt gcagttgcag cagtcagggc cagagttgat taagcccgga 120
 gcctccgtca agatgtcctg caaggccagc gggtacactt tcaccagcta cgtcatgcat 180

| | |
|--|------|
| tgggtgaagc agaagccagg ccaggggctt gattggattg ggtacatcaa cccctacaac | 240 |
| gacgggacca aatacaacga gaaattcaag ggcaaagcca cactcacctc cgataagtcc | 300 |
| tcctctaccg cctacatgga gctcagctcc ctgacctccg aggatagcgc tgtgtattac | 360 |
| tgcgcaaggg gcacatacta ctatggctct aggggtgttcg actactgggg gcagggcact | 420 |
| actctcacag tgagctcagg cggaggaggc agtggcggag ggggaagtgg gggcggcggc | 480 |
| agcgatattg tcatgacca ggcagccctt agtatccctg tgactccagg cgagagcgtg | 540 |
| agcatcagct gccggtccag caagagcctg ctgaacagta acggaaacac atacctctac | 600 |
| tggttttctgc agaggcccgg ccagagccct cagctgtctga ttaccgcat gtcaaatctt | 660 |
| gcctctgggg tgcccgatag atttagtggg agcggatccg gcacagcttt tacattgcgg | 720 |
| atctccagag tcgaggccga agacgtgggg gtctattact gtatgcaaca cctggaatac | 780 |
| ccctttacct tcggagccgg cacaaagctg gagctgaagc gggctgacac cacaaccccc | 840 |
| gtccaaggc cccctacccc cgcaccaact attgcctccc agccactctc actgcggcct | 900 |
| gaggcctgtc ggcccgtgc tggaggcgca gtgcatacaa ggggcctcga ttctgcctgc | 960 |
| gattttttta tccattgtt ggtggtgatt ctgtttctg tggacacagg attatttate | 1020 |
| tcaactcagc agcaggtcac atttctcttg aagattaaga gaaccaggaa aggccttcaga | 1080 |
| cttctgaacc cacatctaa gccaaacccc aaaaacaaca gagccgaggg cagaggcagc | 1140 |
| ctgctgacct gggcgacgt ggaggagaac ccaggcccca tggacacaga aagtaatagg | 1200 |
| agagcaaate ttgtctccc acaggagcct tccagtgtgc ctgcatttga agtcttggaa | 1260 |
| atatctccc aggaagtate ttcaggcaga ctattgaagt cggcctcacc cccaccactg | 1320 |
| catacatggc tgacagtttt gaaaaagag caggagtcc tgggggtaac acaaattctg | 1380 |
| actgctatga tatgccttg ttttgaaca gtgtctgct ctgtacttga tatttcacac | 1440 |
| attgagggag acattttttc atcattttaa gcaggttate cattctgggg agccatattt | 1500 |
| ttttctattt ctggaatgtt gtcaattata tctgaaagga gaaatgcaac atatctggtg | 1560 |
| agaggaagcc tgggagcaaa cactgccagc agcatagctg ggggaacggg aattaccatc | 1620 |
| ctgatcatca acctgaagaa gagcttggcc tatatccaca tccacagtgt ccagaaattt | 1680 |
| tttgagacca agtgctttat ggcttccttt tccactgaaa ttgtagtgat gatgctgttt | 1740 |
| ctcaccattc tgggacttgg tagtgctgtg tctctcaca tctgtggagc tggggaagaa | 1800 |
| ctcaaaggaa acaaggttcc agagaaacgg ggccggaaga agctcctcta catttttaag | 1860 |
| cagcctttca tgcggccagt gcagacaacc caagaggagg atgggtgttc ctgcagattc | 1920 |
| cctgaggaag aggaaggcgg gtgctgagctg ggttctggcg tgaaacagac ttgaaatttt | 1980 |
| gaccttctca agttggcggg agacgtggag tccaaccag ggcccatgat tccagcagtg | 2040 |

| | |
|---|------|
| gtcttgctct tactcctttt ggttgaacaa gcagcggccc tgggagagcc tcagctctgc | 2100 |
| tatatcctgg atgccatcct gtttctgtat ggaattgtcc tcaccctcct ctactgtcga | 2160 |
| | |
| ctgaagatcc aagtgcgaaa ggcagctata accagctatg agaaatcaag agtgaagttc | 2220 |
| tccaggagcg cagatgcccc cgcctatcaa cagggccaga accagctcta caacgagctt | 2280 |
| aacctcggga ggcgcgaaga atacgacgtg ttggataaga gaagggggcg ggaccccgag | 2340 |
| atgggaggaa agccccggag gaagaacctt caggagggcc tgtacaacga gctgcagaag | 2400 |
| gataagatgg ccgaggccta ctacagatc gggatgaagg gggagcggcg ccgcgggaag | 2460 |
| gggcacgatg ggctctacca ggggctgagc acagccacaa aggacacata cgacgccttg | 2520 |
| cacatgcagg cccttcacc ccggtga | 2547 |