



공개특허 10-2021-0143926



(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, 뤼 드 라 크로아 재리  
8
- (72) 발명자  
갈레토, 로망  
프랑스, 에프-75014 파리, 12 뤼 어니스트 크레송  
구불, 아네스  
프랑스, 에프-75017 파리, 뤼 드 토크빌, 65  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인(유한) 대아

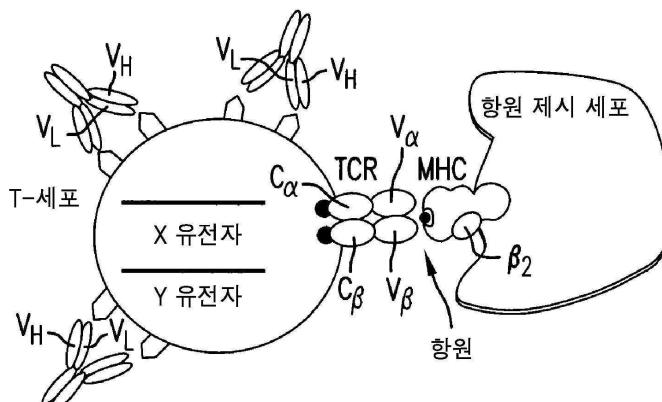
전체 청구항 수 : 총 28 항

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

### (57) 요 약

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 코드하는 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 코드하는 폴리뉴클레오타이드들 및 특이적 회귀 절단 엔도뉴클레아제들, 특히 TALE-뉴클레아제들 (TAL 이펙터(effector) 엔도뉴클레아제)의 사용을 포함한다. 본 발명은 바이러스 감염 및 암을 치료하기 위한 표준이며 입수가능한 입양 면역요법 전략들로의 길을 연다.

대 표 도 - 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, 뤼 드 모라스, 7

**쉬퍼-마니위, 세실**

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

**뽀아로, 로랑**

프랑스, 에프-75018 파리, 뤼 드 토르씨, 4

**샤렌버그, 앤드류**

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

**스미스, 월리안**

프랑스, 에프-92350 르 뿔레시스 로빈슨, 뤼 드 라페르메, 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 유전자  
를 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 코드되는 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 서브컬쳐(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 코드하는 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

[0001] 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

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(effectector) 엔도뉴클레아제(endonuclease)) 및 이러한 폴리펩타이드들을 코드하는 폴리뉴클레오타이드들의 용도를 포함한다. 본 발명은 또한 preTCR $\alpha$  ("pTalpha") 및 그것의 기능적 파생물들(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.

## 배경기술

[0003] 엑스 비보(ex vivo)에서 만들어지는 자가(autologous) 항원-특이적 T 세포들의 이동을 수반하는 입양(adoptive) 면역요법(immunotherapy)은 바이러스 감염들 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(moietiy)로 구성되는 합성(synthetic) 수용체들이다. 일반적으로 CAR의 결합(binding) 모이어티는, 플렉시블(flexible) 링커(linker)에 의하여 연결된(join) 단일클론 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 도메일들을 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 (Fc $\epsilon$ RI)를 위한 높은 친화력(affinity) 수용체인, 자연적인 수용체는 이러한 아키텍처를 제공할 것이다. 호염기성 세포들(basophils) 및 비만(mast) 세포들 상 존재하는 Fc $\epsilon$ RI는 높은 친화력으로 IgE에 결합한다. Fc $\epsilon$ RI는 리간드 결합 알파 서브유닛, 베타 서브유닛 및 두 개의 신호-전달(transducing) 감마 서브유닛들의 호모다이머(homodimer)로 구성되는 사합체(tetrameric) 수용체 복합체이다(Metzger, Alcaraz et al. 1986). Fc $\epsilon$ RI 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)을 이용하여 개별적으로 조작된 치료를 받는다. 자가(autologous) 치료들(therapies)은 응용까지 상당한 기술적 및 로지스틱(logistic) 장애들을 직면하는데, 그것들의 발생(generation)은 비싼 전용(dedicated) 설비들 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 장애들 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 속하거나 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 시토졸(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 알лем투주맙(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, 알лем투주맙(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 수용체 들이다. 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) 웨بت아이드 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) 면역은 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. 이를 억제 경로들을 끌어들이는(co-opt) 종양들의 능력을 면역 저항(resistance)의 중요한 메커니즘을 나타내고, 그리고 면역 요법의 성공을 제한한다. 치료적 T-세포 면역 반응을 활성화시키는 유망한 접근들 중 하나는 이를 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 길항적(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(effectector) 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 단백질은 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 짹을 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 공정인 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) 웨بت아이드 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 짹짓는 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 pT 알파-TCR베타 헤테로다이머들(heterodimers)이 연관되는 머리 내지 꼬리 다이머를 형성하는 것으로 나타나졌다(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, 억제를 완수하는 또 다른 방법은 이상적으로는 "기성품인(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 코드하는 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, DSB에 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 견뎌지는, 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 세포로이 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 손쉬운 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 코드하는 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 코드하는 폴리뉴클레오타이드들 및 특이적 회귀 절단 엔도뉴클레아제들, 특히 TALE-뉴클레아제들 (TAL 이펙터(effector) 엔도뉴클레아제)의 사용을 포함한다.

## 발명의 효과

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

## 도면의 간단한 설명

### 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 막판통 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  $\alpha\beta+$  세포들(첫 번째 칼럼), CD52-TCR  $\alpha\beta-$  세포들(두 번째 칼럼), CD52-TCR  $\alpha\beta+$  세포들(세 번째 칼럼) 및 CD52+TCR  $\alpha\beta-$  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 딥 시퀀싱 분석.

도 10: T7-엔도뉴클레아제 분석에 위한 PDCD1 및 CTLA-4 쟈놈 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,  $\triangle 18$ ,  $\triangle 48$  pT알파(pTalpha) 구조체들의 활성(% CD3 표면 발현) 및 형질도입(transduction) 효율(% BFP+ 세포들)의 유동세포분석 분석법

도 13: pT알파(pTalpha) 단백질(preTCR  $\alpha$ )을 코드하는 렌티바이러스(lentiviral) 구조체(construct)의 도식 표시.

도 14: A: 실험 프로토콜의 표시. B: 정제 전 및 후 대조군 BFP 렌티바이러스(lentiviral) 백터(KO/BFP) 또는 BFP-2A-pTalpha $\triangle 48$ (KO/ $\triangle 48$ )로 형질도입된(transduced) TCR알파 불활성화된 T 세포들(KO) 상 TCR 알파/베타, CD3 발현 및 BFP 발현의 유동세포분석법 분석. C. BFP-2A-pTalpha $\triangle 48$  렌티바이러스(lentiviral) 백터로 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 백터(BFP) 또는 BFP-2A-pT  $\alpha-\triangle 48$  렌티바이러스(lentiviral) 백터(pT  $\alpha-\triangle 48$ ), BFP-2A-pT  $\alpha-\triangle 48.41BB$  렌티바이러스(lentiviral) 백터(pT  $\alpha-\triangle 48.BB$ )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  $\alpha-\triangle 48$  막대그래프들은 pT  $\alpha-\triangle 48$  (BFP+ 세포들)를 발현시키는 TCR 불활성화된 세포들에서 검출되는 신호에 대응하는 반면, KO 막대그래프들은 pT  $\alpha-\triangle 48$  (BFP- 세포들)를 발현하지 않는 TCR 알파 불활성화된 세포들에 대응되고 pT  $\alpha-\triangle 48.BB$  막대그래프들은 pT  $\alpha-\triangle 48.41BB$  (BFP+ 세포들)를 발현시키는 TCR 불활성화된 세포들에서 검출되는 신호에 대응되고 반면 KO 막대그래프들은 pT  $\alpha-\triangle 48.41BB$  (BFP- 세포들)을 발현시키지 않는 TCR알파 불활성화된 세포들에 대응된다. NEP(비(non) 전기천공된(electroporated)) 막대그래프들은 조작되지 않은 세포들에서 검출되는 신호에 대응한다. C. 대조군 BFP 백터(BFP) 또는 BFP-2A-pT  $\alpha-\triangle 48$  렌티바이러스(lentiviral) 백터(pT  $\alpha-\triangle 48$ ), BFP-2A-pT  $\alpha-\triangle 48.41BB$  렌티바이러스(lentiviral) 백터(pT  $\alpha-\triangle 48.BB$ )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 백터(BFP) 또는 pTalpha- $\triangle 48$ (pTa $\triangle 48$ )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 전자 pTalpha-(pTa-FL) 및 pTalpha- $\triangle 48.41BB$ (pTa- $\triangle 48.BB$ )로 형질도입된 세포들에 대하여 결정되었다.

도 17: 다섯 개의 다른 사이토펄스(Cytopulse) 프로그램들로 전기천공된 PBMC들 상 GFP 양성 세포들의 유동세포분석법 분석. 윗선은 큐벳 당  $6 \times 10^6$  세포들의 형질감염(transfection)에 대응되고, 반면 아래쪽 선은 큐벳 당  $3 \times 10^6$  세포들의 형질감염(transfection)에 대응된다.

도 18: 대조군 pUC DNA 및 GFP mRNA, GFP DNA으로 전기천공 후 살아있는 개체군 중 GFP 양성 세포들 및 생존능력(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 mRNA 의 표시. B. 다사슬(multi-chain) CAR를 코드하는 포리시스트론 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: 폴리시스트론 mRNA들의 전기천공법 후 인간 T 세포들 내 다(multi)-사슬 CAR들 발현.

도 23: 멀티서브유닛(multi-subunit) CAR들의 발현은 세 개 사슬들:  $\alpha$ ,  $\beta$  및  $\gamma$ 의 발현에 의하여 컨디셔닝(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 $\gamma$  방출. C: IL5 방출.

도 26: 다사슬(multi-chain) CAR들 (csm1 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 CTLA4을 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 T03 로 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-뉴클레아제를 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 립프구들 내 내생(endogenous) TALE-뉴클레아제 타겟 위치(sites)들에서 타겟된 돌연변이생성(mutagenesis)의 퍼센트.

표 6: 인간 대응하는 유전자들에서 TALE-뉴클레아제를 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(pTalpha) 구조체들의 서브셋(subset)의 기재.

표 13: 주르카트(Jurkat) TCR 알파 불활성화된 세포 내 다른 pT알파(pTalpha) 구조체들의 활성. 활성은 다른 프리T알파(preTalpha) 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 사이토펄스(cytopulse) 프로그램들.

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

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### [0039] 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 Fc ε RI로부터 유래된 다-사슬 CAR를 모든 관련 있는 신호전달 도메인들의 정상적인 가까운막(juxtamembrane) 위치를 가능하게 하도록 디자인한다. Fc ε RI 알파 사슬의 높은 친화력 IgE 결합 도메인은 세포 타겟들에 대한 T-세포 특이성을 전용(redirect)하기 위하여 scFv와 같은 세포외 리간드-결합 도메인에 의하여 대체되고 그리고 Fc ε RI 베타(beta) 사슬(chain)의 N 및/또는 C-말단 꼬리들은 정상적인 가까운막(juxtamembrane) 위치들에 공자극 신호들을 위치시키는데 사용된다.

[0042] 또 다른 측면에서, TCR알파가 불활성화되는 T 세포들의 활성화(activation) 또는 자극을 촉진하기 위하여, pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체(variant)가 조작된 T-세포들 내로 도입된다. pT알파(pTalpha) 또는 사용되는 그것의 기능적 변이체(variant)는 전장(full-length) pT알파(pTalpha), 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(preTalpha) 버전들이 증식을 촉진하기 위하여 다른 분자들(CD28, CD137, CD8, TCR알파(alpha) 등)로부터 신호전달 모이어터들을 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(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체(variant)의 세포외 도메인에 융합(fuse)될 수 있고, 그런 식으로 타겟 항원들에 대한 특이성을 preTCR의 증식 활성과 직접 연결한다.

[0044] 또 다른 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, 희귀-절단 엔도뉴클레아제들을 코드하는, 폴리펩타이드들 및 폴리뉴클레오타이드들에 대한 것이다. 본 발명은 더욱 특히 그들 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] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 방법들에 의하여 수득가능한 조작된 T-세포를 투여함으로써 환자에서 암 또는 감염들을 예방 또는 치료하는 방법에 대한 것이다.

#### 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 그들과 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, 특히 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, 유전자이식 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 고활성인 T 세포들

특정 측면에서, 본 발명은 T-세포들의 조작 방법, 특히 면역요법에 대한 것이다.

특정 예에서, 발명은 하기를 포함한다:

(a) T 세포를 제공하는 단계,

(b) 상기 T 세포 내로 DNA 절단(cleavage)에 의하여 면역 체크포인트 유전자를 선택적으로 불활성화시킬 수 있는 히카-절단 엔도뉴클레아제를 도입하는 단계; 및

(c) 상기 세포들을 확장시키는(expanding) 단계.

특히, 이 방법은 하기를 포함한다:

(a) 적어도 하기를 불활성화시킴으로써 T-세포들을 변형시키는 단계:

- 면역 체크포인트 단백질을 코드하는 첫 번째 유전자, 및

- T-세포 수용체 (TCR)의 요소(component)를 코드하는 두 번째 유전자

(b) 상기 세포들을 확장시키는(expanding) 단계.

[0074] T 세포-매개 면역은 항원 특이적 세포들의 클론적(clonal) 선택, 이차(secondary) 림프(lymphoid) 조직에서 그 것들의 활성화 및 증식, 염증 및 항원의 위치들(sites)로의 그것들의 수송(trafficking), 직접적인 이펙터(effectector) 기능의 수행 및 많은 이펙터(effectector) 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 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(effectector) 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. 또 다른 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. 또 다른 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 체크포인트를 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 <sup>th</sup> , 2014
공-억제(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
	CD244 (2B4))	51744
세포사	TNFRSF10B (CD262)	8795
	TNFRSF10A (CD261)	8797
	CASP3	836
	CASP6	839
	CASP7	840
	CASP8	841
	CASP10	843
	Arhgap5 (GFI2)	394
	Akap8i	10270
	FADD (GIG3)	8772
	FAS (RP11)	355
	Stk17b (DRAK2)	9262
사이토카인 신호전달	TGFBR II (AAT3)	7048
	TGFBR I	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
	Mdfic (HIC)	29969
	F11r (CD321)	50848
	유도된 Treg	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

[0081]

저산소증 매개 내성	GUCY1A2	2977
	GUCY1A3	2982
	GUCY1B2	2974
	GUCY1B3	2983

[0082]

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

[0084]

유전자를 불활성화시킴으로써, 관심있는 유전자가 기능적 단백질 형태로 발현되지 않도록 의도된다. 특정 예에서, 본 방법의 유전적 변형은 조작할 제공된 세포들에서, 하나의 희귀-절단 엔도뉴클레아제의 발현에 의존하며, 그리하여 상기 희귀-절단 엔도뉴클레아제는 특이적으로 하나의 타겟된 유전자 내에서 절단(cleavage)을 촉매화하고, 이로써 상기 타겟된 유전자를 불활성화시킨다. 희귀-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 네아웃들(knockouts)의 창조에 이용될 수 있다. 상기 변형은 적어도 하나의 뉴클레오파이드의 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 희귀-절단 엔도뉴클레아제를 상기 T-세포 내로 도입하는 단계;

[0091] - 면역 체크포인트 단백질을 코드하는 상기 유전자, 및

[0092] - T-세포 수용체 (TCR)의 요소(component)를 코드하는 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 희귀-절단 엔도뉴클레아제를 코드하는 핵산으로 상기 T 세포를 형질전환(transform)시키는 단계:

[0098] - 면역 체크포인트 단백질을 코드하는 상기 유전자 및

[0099] - T-세포 수용체 (TCR)의 요소(component)를 코드하는 적어도 하나의 유전자

[0100] (c) 상기 T-세포들 내로 상기 희귀-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 희귀-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 희귀-절단 엔도뉴클레아제들의 발현에 의존하여, 두 개의 희귀-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 희귀-절단 엔도뉴클레아제들이 둘 보다 많은 유전자들을 불활성화시키고 그리고/또는 타겟으로 하도록 조작(engineer)하기 위하여 세포들에서 발현될 수 있다.

[0106] 또다른 예에서, 상기 희귀-절단 엔도뉴클레아제는 메가뉴클레아제(meganuclease), 징크(Zinc) 팅거(finger) 뉴클레아제(nuclease) 또는 TALE-뉴클레아제(nuclease)일 수 있다. 바람직한 예에서, 상기 희귀-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 면역요법 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 희귀-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 돌연변이 생성(mutagenesis)을 증강시키기 위하여 상기 희귀-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 (EXO1\_HUMAN), 효모(Yeast) ExoI (EXO1 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 웹타이드 링커(linker)에 의하여 선택적으로 본 발명에 따른 뉴클레아제 융합(fusion) 단백질 또는 키메라(chimeric) 단백질에 융합될 수 있다.

[0114] 엔도뉴클레오리티c(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(exogeneous) 핵산 사이에서 발생하는, 외인성(exogeneous) 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) 매트릭스matrix) 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 희귀-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 넘아웃(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 계놈 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. 또 다른 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 계놈 변형 단계에 의하여, 면역 체크포인트 유전자들, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 또 다른 유전자의 불활성화가 또한 의도될 수 있다. 전술한 바와 같이, 상기 추가의 계놈 변형 단계는 하기를 포함하는 불활성화 단계일 수 있다:

[0119] (a) 상기 세포들 내로 적어도 하나의 희귀-절단 엔도뉴클레아제를 도입하여, 상기 희귀-절단 엔도뉴클레아제가 상기 세포의 계놈의 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 계놈 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 코드하는 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 계놈 변형 단계를 더 포함한다. 추가의 계놈 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 코드하는 유전자를 DNA 절단(cleavage)에 의하여 선택적으로 불활성화시킬 수 있는 희귀-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 유전자를 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 희귀-절단 엔도뉴클레아제들을 코드하는 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, 그들 유전자들은 바람직하게는 적어도 하나의 희귀-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 코드하고, 바람직하게는 첫 번째 TALE-뉴클레아제는 TCR을 코드하는 유전자에 직접 향하고 그리고 두 번째는 PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA,

BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4 와 같은, 면역 체크포인트 단백질을 코드하는 유전자에 직접 향한다. 또 다른 예에서, 상기 분리된 세포는 하나의 추가적인 계놈 변형을 더 포함한다. 또 다른 예에서, 상기 추가적인 계놈 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 코드하는 두 번째 유전자

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

[0154] 면역억제제은 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, 라파미신(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 면역 억제제의 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. 또 다른 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. 또 다른 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 희귀-절단 엔도뉴클레아제의 발현에 의존하여, 상기 희귀-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 희귀-절단 엔도뉴클레아제를 각각 상기 T-세포에 도입하는 단계:

[0162] - 상기 면역억제제를 위한 타겟을 코드하는 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 희귀-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 희귀-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 희귀-절단 엔도뉴클레아제는 CD52, GR, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 유전자를 특이적으로 타겟으로 한다. 또 다른 예에서, 본 방법의 유전적 변형은 가공하기 위하여 제공된 세포들에서, 두 희귀-절단 엔도뉴클레아제들의 발현에 의존하여, 두 희귀-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. 또 다른 예에서, 둘보다 많은 희귀-절단 엔도뉴클레아제들은 둘보다 많은 유전자들을 불활성화시키고 그리고/또는 타겟으로 하기 위하여 조작하기 위하여 세포들에서 발현될 수 있다.
- [0178] 또 다른 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] 또 다른 예에서, 면역억제 처리에 특이적인 단계 (b)의 상기 유전자는 글루코코르티코이드(glucocorticoid) 수용체 (GR)이고 그리고 단계 d) 또는 (e)의 면역억제 처리는 텍사메타손(dexamethasone)과 같은 코르티코스테로이드(corticosteroid)를 포함한다.
- [0182] 또 다른 예에서, 면역억제 처리에 특이적인 단계(step) (b)의 상기 target 유전자는 FKBP 패밀리 유전자 멤버 또는 그것의 변이체이고, 그리고 단계(step) (d) 또는 (e)의 면역억제 처리는 타크롤리무스(Tacrolimus) 또는 후지마이신(fujimycin)으로도 알려진 FK506 를 포함한다. 또 다른 예에서, 상기 FKBP 패밀리 유전자 멤버는 FKBP12 또는 그 변이체이다.
- [0184] 또 다른 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] 또 다른 예에서, 상기 희귀-절단 엔도뉴클레아제는 메가뉴클레아제(megานuclelease), 징크 핑거 뉴클레아제 또는

TALE-뉴클레아제일 수 있다. 바람직한 예에서, 상기 희귀-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: 48로부터 선택되는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0194] 또 다른 예에서, 추가의 촉매 도메인은 타겟된 유전자들을 불활성화시키는 그것들의 능력을 증강시키기 위하여 돌연변이생성(mutagenesis)을 증가시키기 위하여 상기 희귀-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(phosphatase), 하이드롤라제들(hydrolases) 및 주형(template)-독립적 DNA 폴리메라제들(polymerases)를 포함한다. 이러한 촉매 도메인의 제한되지 않는 예들은 hExoI (EXO1\_HUMAN), 효모(Yeast) ExoI (EXO1 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 (WO2012/058458). 또 다른 바람직한 예에서, 상기 촉매(catalytic) 도메인은 단일 사슬 TREX 폴리펩타이드에 의하여 코드된다. 상기 추가의 촉매 도메인은 웹타이드 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 또 다른 예에서, 본 방법의 유전적 변형 단계는 타겟 핵산 서열의 부분에 적어도 상동성인 서열을 포함하는 외인성(exogeneous) 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(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 폴리뉴클레오티드 도입 단계는 상기 희귀-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 네아웃(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 폴리뉴클레오타이드들 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 코드하는 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 단계를 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 파생되는 계놈 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 특히 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 희귀-절단 엔도뉴클레아제들을 코드하는 벡터들, 폴리뉴클레오타이드들이 포함된다.

[0224] 본 발명의 범위 내에, CD52, GR, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자 가 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, 그들 유전자들은 바람직하게는 적어도 하나의 희귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 불활성화된다. 본 발명자들에 의하여 TALE-뉴클레아제들의 사용이 T-세포들에서 이중 불활성화를 달성하는데 특히 유리하다는 것이 보여졌다. 본 발명은 바람직하게는 TCR을 코드하는 유전자에 대하여(against) 향하는 첫 번째 TALE-뉴클레아제 및 CD52 또는 GR과 같은, 면역억제제를 위한, 수용체를 코드하는 유전자에 대하여 향하는 두 번째인, 적어도 첫 번째 그리고 두 번째 TALE-뉴클레아제들을 코드하는 상기 폴리뉴클레오타이드들, 적어도 두 폴리뉴클레오타이드들을 포함하는 분리된 T-세포를 포함한다.

[0228] 또 다른 예에서, 상기 분리된 세포는 하나의 추가의 계놈 변형을 더 포함한다. 또 다른 예에서, 상기 추가의 계놈 변형은 적어도 하나의 외인성(exogenous) 폴리뉴클레오타이드 서열의 통합이다. 또 다른 예에서, 상기 외인성(exogenous) 서열은 CD52, GR, TCR 알파 및 TCR 베타로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 유전자 내로 통합된다.

#### 프리T알파(preTalpha)

[0231] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 T-세포 pT알파(pTalpha) (preTCR α 으로도 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 코드하는 핵산으로 상기 세포들을 형질 전환(transform)시키는 단계

[0233] b) 상기 세포를 새로 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. 웨타이드의 "기능적 변이체"는 전체 웨타이드 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 웨타이드를 나타낸다. 선호되는 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, 웨타이드의 아미노산 서열 변이체들(variants)은 웨타이드를 코드하는 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) 법전들에 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 CLUSTALW을 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] 또 다른 예에서, 상기 pT알파(pTalpha) 버전들(versions)들은 세포외 리간드-결합 도메인에 융합되고 그리고 더욱 바람직하게는 pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체는 플렉시블 링커에 의하여 연결(join)된 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: 124로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0244] 몇몇 가변성은 이들 폴리웨타이드들이 유래하는 계놈 데이터로부터 생기기 때문에, 그리고 또한 활성의 중요한 손실 없이 이들 폴리웨타이드들 내 존재하는 아미노산들의 일부를 치환하는 능력을 고려할 때(기능적 변이체들), 본 발명은 이 특허 출원에서 제공되는 서열들과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90% 그리고 훨씬 더 바람직하게는 적어도 95% 동일성(identity)을 공유하는 상기 폴리웨타이드들의 폴리웨타이드들 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 밟영느 T-세포 수용체(TCR)의 하나의 요소(component)를 코드하는 하나의 유전자의 DNA 절단(cleavage)에 의하여 선택적으로 불활성화시킬 수 있는 희귀-절단 엔도뉴클레아제들을 상기 T 세포들 내로 도입하는 단계를 포함한다. 특정 예에서, 상기 희귀-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 게놈 변형 단계를 포함한다. 추가의 게놈 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 서열 번호: 125를 포함하는 다사슬(multi-chain) CAR, 이중특이성 항체, CTLA-4 또는 PDCD1를 타겟으로 하는, 특히 핵산 서열 서열번호: 74 내지 서열번호: 78을 타겟으로 하는, 희귀-절단 엔도뉴클레아제들, 또는 본 공개에서 기재된 대로 면역억제제를 위한 타겟을 타겟으로 하는 희귀-절단 엔도뉴클레아제일 수 있다.
- [0254] 본 발명에는 또한 pT알파(pTalpha), 특히 전술한 기능적 변이체들을 코드하는 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 코드하는 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 희귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 불활성화되고 있다. 선호되는 예에서, 상기 희귀-절단 엔도뉴클레아제는 TALE-뉴클레아제이다.

#### 다(multi)-사슬 키메라(Chimeric) 항원(Antigen) 수용체(Receptor) (CAR)

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 웨პ타이드인 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 초기변(hypervariable) 루프들(loops) 또는 CDR들, 인테그린(integrin)-결합 웨პ타이드, 헤레굴린(heregulin), IL-13 뮤테인(mutein) 또는 혈관 내피 성장 인자 폴리펩타이드와 같은 수용체 리간드들, 또는 낙타파(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)를 포함한다. TRAF 단백질들은 수용체 삼합체화(trimmerization)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. 또 다른 바람직한 예에서 Fc ε RI 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] 또 다른 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 희귀-절단 엔도뉴클레아제로 상기 T 세포들 내로 도입하는 단계를 더 포함한다. 더 바람직한 예에서 상기 희귀-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 희귀-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 코드하는 외인성(exogenous) 폴리뉴클레오타이드 서열들을 포함한다.

#### 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, 희귀 절단 엔도뉴클레아제, TALE-뉴클레아제, CAR 또는 다사슬(multi-chain) CAR 를 도입하는 단계를 포함한다.

[0295] 제한되지 않은 예로서, 상기 pT알파(pTalpha) 또는 그것의 기능적 변이체, 희귀 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 코드되는 이식유전자들(transgenes)로서 도입될 수 있다. 다른 이식유전자들(transgenes)은 2A 웨პ타이드를 코드하는 서열과 같은 리보좀(ribosomal) 스kip(skip) 서열을 코드하는 핵산 서열을 포함하는 하나의 벡터 내에 포함될 수 있다. 피코로나바이러스들(picornaviruses)의 아프토바이러스(Aphthovirus) 서브그룹(subgroup)에서 확인된, 2A 웨პ타이드들은 코돈들에 의하여 코드되는 두 아미노산들 사이의 웨პ타이드 결합(bond)의 형성 없이 한 코돈으로부터 옆의 것으로 라이보좀 "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 리보좀(ribosome)에 의하여 번역되는 mRNA 상 (또는 DNA 분자의 센스 가닥 상) 세 개 뉴클레오타이드들이 의미된다. 그러므로 두 개의 폴리웨პ타이드들은 폴리웨პ타이드들이 프레임(in frame) 2A 올리고웨პ타이드 서열에 의하여 분리될 때 mRNA 내 단일의, 인접한(contiguous) 오픈 리딩 프레임으로부터 합성될 수 있다. 이러한 리보좀 스kip 메커니즘들은 당업계에 잘 알려져 있고, 단일 메신저(messenger) RNA에 의하여 코드되는 몇몇의 단백질들의 발현을 위한 몇몇의 벡터들에 의하여 사용되는 것으로 알려져 있다. 제한되지 않는 예로서, 본 발명에서 2A 웨პ타이드들은 세포 내로 희귀-절단 엔도뉴클레아제 및 DNA 말단-가공 효소 또는 다사슬(multi-chain) CAR의 다른 폴리웨პ타이드들을 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] 폴리웨პ타이드들은 세포 내로 상기 폴리웨პ타이드들 코드하는 폴리뉴클레오타이드들의 도입의 결과로서 세포 내에서 인 시츄(in situ)로 합성될 수 있다. 대체하여, 상기 폴리웨პ타이드들은 세포 밖에서 생산되고 그리고나서 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)), 리포좀(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 폴리웨პ타이드들을 코드하는 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 사이토펄스(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). 이를 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 달성을 위한 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) 시퀀스(sequence)에 적용하는 단계를 포함한다;

[0310] (a) 센티미터 당 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 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, 2400, 2450, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 또는 3000V의, 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(electroporation) 배지는 당업계에 알려진 임의의 적당한 배지일 수 있다. 바람직하게는 전기천공 배지는 0.01 내지 1.0 밀리지멘스(milliSiemens)에 걸치는(spanning) 범위의 전도성을 갖는다.

[0316] 특정 예들에서, 제한되지 않는 예들로서, 상기 RNA는 희귀-절단 엔도뉴클레이제(endonuclease), Half-TALE-뉴클레이제와 같은 희귀-절단 엔도뉴클레이제의 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 촉매 도메인을 코드한다.

#### 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. 20060121005에 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 항체화의 접촉에 의하여, 또는 칼슘 이온운반체(ionophore)와 함께 단백질 키나제(kinase) C 액티베이터(activator)(예컨대, 브리오스타틴(bryostatin))과의 접촉에 의하여, 인 비트로(*in vitro*)로 자극될 수 있다. T 세포들의 표면 상 악세서릴 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 일상적인 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. 또 다른 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-g, 1L-4, 1L-7, GM-CSF, -10, -2, 1L-15, TGFp, 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, 플라스마네이트(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, A1M-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 1, 및 X-Vivo 20, Optimizer를 포함할 수 있다. 항생물질들, 예컨대, 페니실린 및 스트렙토マイ신은 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% CO<sub>2</sub>)인, 성장을 지지하기에 필요한 조건들 하 유지된다. 다양한 자극 시간들에 노출된 T 세포들은 다른 특성들을 보일 수 있다.

[0325] 또 다른 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. 또 다른 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 수득될 수 있다. T 세포들은 말포혈액 잔핵 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 수득될 수 있다. 본 발명의 특정 예들에서, 당업계에 알려지고 이용 가능한 임의의 수의 T 세포주들이 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 상기 세포는 건강한 도너로부터, 암으로 진단받은 환자로부터, 또는 감염으로 진단받은 환자로부터 유래될 수 있다. 또 다른 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 수득된 세포주가 포함된다. 면역억제 처리에 저항성이고 전의 방법에 의하여 수득되는 것을 허용하는 변형된 세포들은 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0330] 또 다른 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. 또 다른 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] 또 다른 예에서, TCR은 TCR 알파 유전자 및/또는 TCR 베타 유전자(들)을 불활성화시킴으로써 본 발명에 따른 세포들에서 기능적이 아니게 만들어진다(rendered). 상기 전략들은 더욱 특히 GvHD를 피하기 위하여 사용된다. 본 발명의 특정 관점에서, 개인으로부터 유래된 변형된 세포를 수득하는 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 수득되는 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 대항하여; 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 투여함으로서 상기 환자를 치료하는 단계를 포함하는, 숙주편대이식(Host versus Graft)(HvG) 거부(rejection) 및 이식편대숙주(Graft versus Host) 질환(Disease) (GvHD)에 대항하여 그것을 필요로 하는 환자들의 치료 방법이다.

[0339] 치료적 적용들

- [0340] 또 다른 예에서, 다른 방법들에 의하여 수득되는 분리된 세포 또는 전술한 바와 같이 상기 분리된 세포로부터 유래되는 세포주는 의약(medicament)으로서 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 상기 의약은 그것을 필요로 하는 환자에게서 감염 또는 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 또 다른 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] 또 다른 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 환자들에 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, 밸혈병들(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 코드하는 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 애어로졸(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(intralymphatic) 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. 또 다른 예에서, 세포들의 상기 유효한 양은 단일 용량으로 투여된다. 또 다른 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] 또 다른 예에서, 이들 세포들을 포함하는 조성물 또는 세포들의 상기 효과적인 양은 비경구적으로 투여된다. 상기 투여는 정맥내(intravenous) 투여일 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 나탈리지맙(natalizumab) 치료 또는 건선(psoriasis) 환자들을 위한 에팔리즈티맙(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), 마이코泼勒레이트(mycophenolate), 및 FK506 과 같은 면역억제제들, 항체들, 또는 CAM PATH와 같은 다른 면역에의한(immunoablative) 제제들, 항-CD3 항체들 또는 다른 항체 요법들, 사이톡신(cytotoxin), 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., Citrr. 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(bean) 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. 또 다른 예에서, 본 발명의 세포 조성물들은 CD20, 예컨대 리툭산(Rituxan)과 반응하는 제제들과 같은 B-세포에 의한(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 단계를 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 짹을 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) 백터로 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 Fc ε RI로부터 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 TCR에 의하여 외래의 것으로 숙주 조직을 인식하는 것을 방지하여 이로써 GvHD를 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 코드하는 하나의 유전자를 불활성화시키는 것 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 코드하는 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 환자에의 투여 후 인 비보에서 또는 환자에의 투여 전에 조작된 T-세포들의 인 비트로(in vitro)에서의 확장(expansion). 투여 단계 전, 환자들은 CAMPATH1-H, 인간화된 단일클론 항체 항-CD52과 같은, 면역억제 처리가 될 수 있다.

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

#### 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 D는 Asp 또는 아스파르트산(Aspartic acid)을 의미한다.

[0390] - 아미노산 치환(substitution)은 하나의 아미노산 잔기의 또 다른 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, m은 a 또는 c를 나타내고, y는 t 또는 c (피리미딘(pyrimidine) 뉴클레오타이드들)를 나타내고, d는 g, a 또는 t를 나타내고, v는 g, a 또는 c를 나타내고, b는 g, t 또는 c를 나타내고, h는 a, t 또는 c를 나타내고, 그리고 n은 g, a, t 또는 c를 나타낸다.

[0394] - "여기에서 사용된 대로, "핵산(nucleic acid)" 또는 "폴리뉴클레오타이드들"은 디옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid) (DNA) 또는 리보핵산(ribonucleic acid) (RNA), 오리고뉴클레오타이드들(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, 폴리뉴클레오타이드들 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 할로겐들, 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 혜태로사이클릭(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 계놈 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 계놈과 이 매트릭스 사이에서 자극되고, 이때 DNA 타겟을 포함하는 계놈 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 타겟 서열", "타겟 서열" 또는 "가공(processing) 위치(site)"에 의하여, 본 발명에 따른 희귀-절단 엔도뉴클레아제에 의하여 타겟되고 가공될 수 있는 폴리뉴클레오타이드 서열이 의도된다. 이들 용어들은 특이적 DNA 위치(location), 바람직하게는 세포에서 계놈 위치를 가리키나, 그러나 또한, 제한되지 않는 예로서, 미토콘드리아와 같은 세포소기관들에서, 또는 트랜스포존들(transposons), 바이러스, 에피솜(episomes), 플라스미드들과 같은 유전적 물질의 본체에 독립적으로 존재할 수 있는 유전 물질의 부분을 가리킨다. TALE-뉴클레아제 타겟들의 제한되지 않는 예들로서, 타겟이 된 계놈 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, 플라스미드를 내 코드되는, 제한되지 않는 예들로서, 표 2, 6, 7 및 11에 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-활성화(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) 백터" 또는 "전달 백터들"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 백터가 의도된다. 그것은 리포좀의(liposomal) 전달 백터들, 바이러스 전달 백터들, 약물 전달 백터들, 화학적(chemical) 담체들(carriers), 폴리머(polymeric) 담체들(carriers), 리포플렉스들(lipoplexes), 폴리플렉스들(polyplexes), 덴드라이머들(dendrimers), 마이크로버블들(microbubbles) (초음파조영제들(ultrasound contrast agent)), 나노입자들, 에멀젼들 또는 다른 적합한 이동(transfer) 백터들을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 전달 백터들은 분자들, 케미컬들(chemicals), 마크로분자들(유전자들, 단백질들), 또는 Diatos에 의하여 개발된 웹타이드들, 플라스미드들와 같은 다른 백터들의 전달을 가능하게 한다. 이들 케이스들에서, 전달 백터들은 분자 담체들(carriers)이다. "전달 백터" 또는 "전달 백터들"에 의하여, 형질감염(transfection)을 수행하기 위한 전달 방법들이 의도된다.

[0404]

- 용어 "백터" 또는 "백터들"은 그것이 연결(link)된 또다른 핵산을 수송하는(transport) 것이 가능한 핵산 분자를 가리킨다. 본 발명에서 "백터"는 바이러스 백터, 플라스미드, RNA 백터 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 백터들은 자동(altruistic) 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 이용 가능하다.

[0406] 바이러스 벡터들은 레트로바이러스, 아데노바이러스 파보바이러스(예컨대, 아데노관련(adenoassociated) 바이러스들), 코로나바이러스, 오르소믹소바이러스(orthomyxovirus)와 같은 음성 가닥 RNA 바이러스들(예컨대 인플루엔자 바이러스), 랩도바이러스(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, 앱스타인(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, 노르워(Norwalk) 바이러스, 토가바이러스(togavirus), 플라비바이러스(flavivirus), 레오바이러스들(reoviruses), 파포바바이러스(papovavirus), 헤파드나바이러스(hepatnavirus), 및 간염(hepatitis) 바이러스를 포함한다. 레트로바이러스들의 예들은 하기와 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, 껌질(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 계놈에 통합될 수 있는 이러한 벡터들이 의도된다. "비(non) 통합되는(integrative) 렌티바이러스(lentiviral) 벡터들 (또는 NILV)"에 의하여 대조적으로, 바이러스 인테그라제(integrase)의 작용을 통하여 타겟 세포의 계놈으로 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] 이를 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 코드되는 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 희귀-절단 엔도뉴클레아제 타겟 서열의 특이적 물리적 위치를 가리킬 수 있다. 이러한 위치(locus)는 본 발명에 따른 희귀-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, 에피좀들(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)을 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, 희귀-절단 엔도뉴클레아제들로서 분류될 수 있다. 희귀-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 콘쥬게이트(cleaver)는 특이적 타겟 서열을 인식하는 또 다른 DNA에 또는 핵산들의 폴리머에 콘쥬게이트(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 콘쥬게이트들과 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 Bogdanove 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al.). FokI-기반의 TALE-뉴클레아제 (TALE-nuclease)의 기능적 레이아웃은 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 LAGLIDADG 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) (MBBD)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. 또 다른 예에서, 중요한 아미노산들 12 및 13은 뉴클레오타이드들 A, T, C 및 G에 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) 백분(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) 또는 흔들거리는(staggered) 말단들의 생산을 야기할 수 있다.

[0440]

- "융합 단백질"에 의하여 분리된 단백질들 또는 그것들의 부분을 원래 코드하는 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)을 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 코드하는 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 서열쌍들 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 이를 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)을 가질 수 있다. 이러한 기능적 변이체를 코드하는 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, 웨타이드가 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(lymphotxin) 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-IBB, 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]

여기서 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 "polydoma" techniques (See U.S. Pat. No. 4,474,893 참조)에 의하여, "폴리도마(polydoma)" 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 중량 항원에 특이적으로 결합한다.

[0454]

- 여기서 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]

여기서 사용된 용어 "대상(subject)" 또는 "환자"는 비-인간 영장류들 및 인간들을 포함하는 동물 계(kingdom)의 모든 멤버들을 포함한다.

[0458]

본 발명의 상기 전술한 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 따른 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, 그 각각은 15-bp 스페이서(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
<b>GReX2</b>	TATTCACTGATGGACTC caaagaatcattaac TCCTGGTAGAGAAGAAA (서열번호: 1)	Repeat GReX2-LPT9-L1 (서열번호: 7) Repeat -GReX2-LPT9-R1 (서열번호: 8)	GReX2-L TALEN (서열번호: 19) GReX2-R TALEN (서열번호: 20)
	TGCCTGGTGTGCTCTGA tgaagcttcaggatg TCATTATGGAGTCTAA (서열번호: 2)	Repeat -GReX3T2-L1 (서열번호: 9) Repeat -GReX3T2-R1 (서열번호: 10)	GReX3T2-L TALEN (서열번호: 21) GReX3T2-R TALEN (서열번호: 22)
<b>GReX3T4</b>	TGCTCTGATGAAGCTTC aggatgtcattatgg AGTCTTAACTTGTGGAA (서열번호: 3)	Repeat -GReX3T4-L1 (서열번호: 11) Repeat -GReX3T4-R1 (서열번호: 12)	GReX3T4-L TALEN (서열번호: 23) GReX3T4-R TALEN (서열번호: 24)
	TGGTGTCACTGTTGGAG gttattgaacctgaa GTGTTATATGCAGGATA (서열번호: 4)	Repeat -GReX5T1-LPT8-L1 (서열번호: 13) Repeat -GReX5T1-LPT8-R1 (서열번호: 14)	GReX5T1-L TALEN (서열번호: 25) GReX5T1-R TALEN (서열번호: 26)
<b>GReX5T2</b>	TATGATAGCTGTTCC agactcaacttggag GATCATGACTACGCTCA (서열번호: 5)	Repeat -GReX5T2-L1 (서열번호: 15) Repeat GReX5T2-R1 (서열번호: 16)	GReX5T2-L TALEN (서열번호: 27) GReX5T2-R TALEN (서열번호: 28)
	TTATATGCAGGATATGA tagctctgttcaga CTCAACTTGGAGGATCA (서열번호: 6)	Repeat -GReX5T3-L1 (서열번호: 17) Repeat -GReX5T3-R1 (서열번호: 18)	GReX5T3-L TALEN (서열번호: 29) GReX5T3-R TALEN (서열번호: 30)

[0470]

[0471] 표 2: 인간 GR 유전자 내 TALE-뉴클레아제를 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 WO2013/017950). 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 SfaNI를 받기 위하여 타입 IIS 제한 효소들 BsmBI를 이용하여 효모(yeast) 발현 TALE 백터에서 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.

#### 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 μL의 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 μg으로 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 코드하는 두 개의 플라스미드들 중 각각의 2.5 μg으로 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'-CCATCTCATCCCTGGGTGTCCTCGACTCAG-3' (포워드(forward) 어댑터(adapter) 서열)- 10N (TAG)- 위치(locus) 특이적 포워드(forward) 서열 GR 엑손 2를 위하여: 5'-GGTCATTAAACAAGCTGCC-3' (서열번호: 31), GR 엑손 3를 위하여: 5'-GCATTCTGACTATGAAGTGA-3' (서열번호: 32) 및 GR 엑손 5를 위하여: 5'-TCAGCAGGCCACTACAGGAGTCTCACAG-3' (서열번호: 33) 및 역(reverse) 프라이머 5'-CCTATCCCTGTGCGCTTGGCAGTCTCAG-3' (역(reverse) 어댑터(adapter) 서열)- 위치(locus) 특이적 리버스(reverse) 서열 GR 엑손 2를 위하여: 5'-AGCCAGTGAGGGTGAAGACG-3' (서열번호: 34), GR 엑손 3를 위하여: 5'-GGGCTTGCATATAATGGAA-3' (서열번호: 35) 및 GR 엑손 5를 위하여: 5'-CTGACTCTCCCTCATAGCCCCAGAAC-3' (서열번호: 36).

[0489]

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. 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 램프구들 내 GR TALE-뉴클레아제들의 활성:

[0497] 각각의 TALE-뉴클레아제 구조체는 T7 프로모터의 통제 하 발현 벡터에서 제한 효소 소화를 이용하여 서브클로닝되었다.

[0499] GR 계놈 서열들을 절단하는(cleaving) TALE-뉴클레아제들을 코딩하는 mRNA가 T7 프로모터로부터 다운스트림 코딩 서열들을 운반하는 각각의 플라스미드로부터 합성되었다. 말초 혈액으로부터 분리된 T 램프구들이 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 코드하는 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, 계놈 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 램프구들의 내생(endogenous) TALE-뉴클레아제 타겟 위치(sites)들에서 타겟된 돌연변

이 생성(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 헤테로다이머인 (heterodimeric) TALE-뉴클레아제들이 디자인되었고 생산되었다. 타겟된 게놈 서열들은 11 또는 15-bp 스페이서 (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 립프구들의 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	TTGTCCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg 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	TGTGTTGAGCCATCAG aagcagagatctcc 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	TTCCCACCCGAGGTCGC tgttttgagccatca GAAGCAGAGATCTCCA (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	TTCCCTCCTACTCACCAT cagcctccgttat 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	TTTAGAAAGTCCCTGTG atgtcaagctggctg AGAAAAGCTTGAAACA (서열번호: 57)
TRAC_T03	TCCAGTGACAAGTCTGT ctgcctattcacgga TTTGATTCTCAAACAA (서열번호: 58)
TRAC_T04	TATATCACAGACAAAC tgtgttagacatgg GTCTATGGACTTCAGA (서열번호: 59)
TRAC_T05	TGAGGTCTATGGACTTC aagagaacacgtgc GTGGCCTGGAGCAACAA (서열번호: 60)
CD52_T01	TTCCCTCTTCCTCCTAC caccatcagccctt TTACCTGTACCATAAC (서열번호: 61)
CD52_T04	TTCCTCTACTCACCA cagcctccgg TCTTACCTGTACCAT (서열번호: 62)
CD52_T05	TCCTACTCACCATCAG tcctggttat TTGCTCTTACCTGTAC (서열번호: 63)
CD52_T06	TTATCCCCACTTCTCCT ctacagatacaaact TTTGCTCCTGAGAGTC (서열번호: 64)
CD52_T07	TGGACTCTCAGGACAA acgacaccaggccaa TGCTGAGGGGCTGCTG (서열번호: 65)

[0515]

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

[0516]

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 μl의 리포펙타민(lipofectamine) (Invitrogen)을 이용하여 5 μg의 콘트롤(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 코드하는 두 개의 플라스미드들의 각각의 2.5 μg으로 공-형질감염(co-transfект)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, CD52를 위하여: 5'-CAGATCTGCAGAACAGAAGC-3' (서열번호: 66), TRAC을 위하여: 5'-ATCACTGGCATCTGGACTCCA-3' (서열번호: 67), TRBC1를 위하여: 5'-AGAGCCCCTACCAGAACCAAGAC-3' (서열번호: 68), 또는 TRBC2를 위하여: 5'-

GGACCTAGTAACATAATTGTGC-3' (서열번호: 69), 그리고 역(reverse) 프라이머 5'-CCTATCCCTGTGCGCTTGGCAGTCAG (역(reverse) 어댑터(adaptor) 서열)- 내생(endogenous) 위치(locus) 특이적 리버스(reverse) 서열로, CD52을 위하여: 5'-CCTGTTGGAGTCCATCTGCTG-3' (서열번호: 70), TRAC을 위하여: 5'-CCTCATGTCTAGCACAGTT-3' (서열번호: 71), TRBC1 및 TRBC2를 위하여: 5'- ACCAGCTCAGCTCCACGTGGT-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 활성

[0525] TALE-뉴클레아제 구조체(construct) 각각이 T7 프로모터의 통제 하 포유류 발현 벡터에서 제한 효소 소화를 이용하여 서브클로닝되었다.

[0527] CD52 TRAC 및 TRBC 계놈 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 코드하는 2 mRNA들 (또는 대조군들로서 코드하지 않는 RNA)의 각각의 10  $\mu$ g으로 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 활성의 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]

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]

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 코드하는 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-콘쥬게이트된 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 코드하는 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-콘쥬게이트된 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

게놈 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 코드하는 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(탈파립(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 탈파립시키는 동일한 능력을 갖는다는 것을 보여준다. CD107 상향조절은 CD19+의 존재에 의존적이다. 이들 데이터들은 게놈 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 게놈 안전성

우리의 구조체들이 뉴클레아제 서브유닛들을 포함하므로, 중요한 질문은 복수의 TALE-뉴클레아제 형질감염(transfection)이 반(half)-TALE-뉴클레아제들의 짹짓기오류(mispairing)에 의하여 또는 타겟 서열들의 '근접(close) 매치(match)'에서 오프(off)-타겟 절단(cleavage) 및 유전독성(genotoxicity)을 이끌 수 있는지 g는 것이다. 세포 게놈들의 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 게놈에서 서열들을 리스트화하였다. 이 리스트를 만들기 위하여, 우리는 원래의 반(half) 타겟들에 비교하여 4 까지의 치환들로 게놈 내 모든 서열들을 확인하였고 그 때 서로로부터 9 내지 30 bp의 스페이서(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 헤테로다이머들 또는 하나의 반(half)-TALE-뉴클레아제 분자의 호모다이머들에 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 데이터를 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  $7 \times 10^{-4}$ 이다. 이들 결과들은 의도된 타겟들보다 적어도 600 배 돌연변이 덜 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

실시예 1에서 기재한 바와 같이, 각각 PDCD1 및 CTLA4 유전자들을 타겟팅하는 헤테로다이머인(heterodimeric) TALE-뉴클레아제들이 디자인되고 생산되었다. 타겟된 게놈 서열들은 11 또는 15-bp 스페이서(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 gtttttcttcctt CATCCCTGCTTCTGCA (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	TTTTCATGCTAGCAAT gcacgtggcccaagcc 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 cgtggcccaaggcctgc 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	TTCTCCCCAGGCCCTGCT cgtggtgaccgaagg GGACAAACGCCACCTCA (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 ctccctggcccaa GGCGCAGATCAAAGAGA (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-뉴클레아제를 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 μl 의 리포펙타민(lipofectamine) (Invitrogen)을 이용하여 5 μg 의 콘트롤(control) pUC 벡터 (pCLS0003) 또는 EF1-알파 프로모터의 통제 하 PDCD1 및 CTLA-4 유전자에서 관심있는 계놈 서열 내 두 개의 반(half) 타겟들을 인식하는 TALE-뉴클레아제들을 코드하는 두 개의 플라스미드를 각각의 2.5 μg으로 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) 페커니즘이다. 살아있는 세포들 내 TALE-뉴클레아제들의 활성은 타겟된 계놈 위치(locus)에서 삽입들 또는 결실들의 빈도에 의하여 측정된다. 형질감염(transfection) 48 시간 후, 계놈 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'-CTCTACTCCTGAAGACCTG-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'-CCTATCCCTGTGTGCCCTGGCAGTCTCAG (역(reverse) 어댑터(adaptor) 서열)- 내생(endogenous) 위치(locus) 특이적 리버스(reverse) 서열 for CTLA4\_T01: 5'-TGGAAATACAGAGGCCAGCAA-3' (서열번호: 103), CTLA4\_T03/T04를 위하여: 5'-GGTCCCCGTGCAGATGGAAT-3' (서열번호: 104), PDCD1\_T01를 위하여: 5'-GGCTCTGCAAGTGGAGGCCAG-3' (서열번호: 105) 또는 PDCD1\_T03를 위하여: 5'-GGACAACGCCACCTCACCT-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 활성에 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,  $5 \times 10^6$  세포들이 대조군으로서 RNA 없이 또는 CTLA4 유전자에 대하여 디자인된 세 TALENTM (T1, T2 및 T3) 중 하나를 코드하는 RNA 20  $\mu\text{g}$  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 TALEN<sup>TM</sup> 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  $5 \times 10^6$  세포들이 대조군으로서 RNA 없이, 또는 인간 PD1 유전자에 특이적인 두 개의 TALEN들 중 하나를 코드하는 RNA 20  $\mu\text{g}$  으로 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  $5 \times 10^6$  세포들이 대조군인 RNA 없이 또는 인간 PD1 유전자에 특이적인 TALEN를 코드하는 RNA 20  $\mu\text{g}$  으로 전기천공되었다. 일주일 후, 세포들은 음성 대조군으로서 RNA 없는, 또는 인간 CD19에 특이적인 키메라 항원 수용체를 코드하는 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 다이아그램들에 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 발현를 가능하게 한다:

[0577] 다른 프리T알파(preTalpha) 버전들에서의 기재:

[0578] 인간 pT알파(pTalpha) 유전자는 세포외 Ig-유사(like) 도메인, 소수성(hydrophobic) 막관통 도메인 및 큰 C-말단 세포질내 꼬리를 포함하는 막관통 당단백질을 코드한다. 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 세포외 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]

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 △48 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(△114)에 융합된다(서열번호: 121). 두 번째 구조체(construct) 또한 TCR α로부터의 IC 도메인들 및 막관통 (TM)에 pT알파(pTalpha) 세포외 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 pTalpha△48 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 활성:

[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 ( $\text{TCR}_{\alpha/\beta}^{\text{NEG}}$ ;  $\text{CD3}^{\text{NEG}}$ ) 및 CytoPulse 전기천공법(electroporation)을 이용하여 TRAC를 절단하는 TALEN을 코드하는 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 코드하는 플라스미드

15  $\mu$ g으로 백만의 JKT\_K0x3 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\_K0x3 세포들의 FL,  $\Delta$ 18 및  $\Delta$ 48 pT알파(pTalpha) 구조체들의 활성 및 형질감염(transfection) 효율들(BFP+ 세포들의 %)의 대표적 예이다. 다른 구조체들로부터의 결과들은 표 13에 그림으로 되어 있다.

표 13

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

[0599]

[0600] 표 13: Jurkat TCR 알파 불활성화된 세포들에서 다른 pT알파(pTalpha) 구조체들의 활성.

[0601] 다른 프리T알파(preTalpha) 구조체들로 형질감염된 주르카트(jurkat) TCR 알파 불활성화된 세포들에서의 CD3 발현의 유동세포분석법(flow cytometry) 분석에 의하여 활성이 측정되었다.

[0603] TCR 알파 불활성화된 일차(primary) T 림프구들에서 pTalpha-FL 및 pTalpha- $\Delta$ 48의 활성:

[0604] TCR 알파 불활성화된 T 림프구에서 CD3 표면 발현을 유도하는 pTalpha-FL 및 pTalpha- $\Delta$ 48 버전들의 활성을 테스트하기 위하여, pTalpha-FL 및 pTalpha- $\Delta$ 48 코딩 서열들이, SFFV 프로모터 뒤이어 자가 절단 T2A 웨타이드 하 푸른(Blue) 형광(Fluorescent) 단백질 (BFP)를 코드하는, 자가(self)-불활성화(inactivating)인 pLV-SFFV-BFP-2A-PCTRA 렌티바이러스(lentiviral) 벡터 내로 클로닝되었다(도 13).

[0606] 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 코드하는 mRNA 10  $\mu$ g으로 전기천공법(electroporation)에 의하여 형질감염(transfect)되었다. 전기천공법(electroporation) 2 일 후, T 세포들이 LV-SFFV-BFP-2A- pTalpha- $\Delta$ 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)을 이용하여 정제되었다. 이 실험 프로토콜은 도 14A에 나와 있다.

[0608] 도 14B는 CD3 비드들로 정제 전 및 후에 대조군 BFP 렌티바이러스(lentiviral) 벡터 (KO/BFP) 또는 BFP-2A-pTalpha $\Delta$ 48 (KO/ $\Delta$ 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- $\Delta$ 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 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-△48으로 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 3일 후 항-CD3/CD28-코팅된 비드들을 이용하여 재활성화되었다(도 14A). 세포들은 플루오로크롬-콘쥬게이트된 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 나타낸 바와 같이, pTalpha-△48 (KO/pT $\alpha$ -△48) 또는 pTalpha-△48.41BB (KO/pT $\alpha$ -△48.41BB)를 발현하는 TCR 알파 불활성화된 세포들은 TCR알파/베타 expressing 세포들에서 관찰된 그들과 유사한 레벨들로, 활성화 마커들의 상향조절을 보였다(NEP: 비(non) 전공천공된(electroporated) 세포들).

[0616] T 세포 활성화(activation)의 또 다른 지표는 가끔 "블래스팅(blasting)"이라 가리키지는 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-△48.41BB을 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 $\alpha$ -△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: 사이토펄스(Cytopulse) 기술을 이용한 T 세포들에서의 mRNA 형질감염(transfection)의 최적화.

[0622] 최적화된 사이톤펄스(cytopulse) 프로그램의 결정

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

표 14

<u>사이토- 펄스 프로그램</u>	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]

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

[0626]

3 또는 6 백만개의 세포들이 다른 사이토펄스(Cytopulse) 프로그램들을 이용하여 대조군 플라스미드를 pUC 및 GFP를 코드하는 플라스미드를 20  $\mu$ g으로 0.4 cm 갭(gap) 큐벳(cuvette) (30 또는  $15 \times 10^6$  세포들/ml)에서 전기천공되었다. 전기천공법(electroporation) 24 시간 후, GFP 발현이 형질감염(transfection)의 효율을 결정하기 위하여 유동세포분석법(flow cytometry)에 의하여 전기천공된 세포들에서 분석되었다. 도 17에 보여지는 데이터들은 PBMC 유래된 T 세포들에서 플라스미드 전기천공법(electroporation)에 요구되는 최소 전압을 가리킨다. 이들 결과들은 사이토펄스(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 사이토펄스(cytopulse) 프로그램을 결정한 후, 우리는 이 방법이 mRNA 전기천공법에도 적용가능한지 여부를 테스트하였다.

[0632]

[0633] PHA/IL2로 6 일 미리활성화된(preactivated)  $5 \times 10^6$  정제된 T 세포들이 사이토포레이션(cytoporation) 버퍼 T (BTX-Harvard apparatus)에서 재현탁(resuspend)되었고, 이전 부분에서 결정된 대로 선호되는 사이토펄스(cytopulse) 프로그램을 이용하여 pUC 또는 GFP를 코드하는 플라스미드를 20  $\mu$ g 또는 GFP를 코드하는 mRNA 10  $\mu$ g으로 0.4 cm 큐벳(cuvettes)에서 전기천공되었다(표 15).

표 15

<u>사이토- 펄스 프로그램</u>	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 사이토펄스(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 데이터셋(dataset)는 T-세포들이 DNA 또는 RNA로 효율적으로 형질감염될 수 있다는 것을 보여준다. 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 달성을 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(effectuator) 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. 이를 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 α β 복합체(complex)의 상실 및 유전자 불활성화를 야기할 것으로 기대된다. 대조군으로서 코드하지 않는(non coding) RNA 또는 TRAC TALE-뉴클레아제 RNA가 사이토펄스(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 α β의 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 사이토펄스(cytopulse) 기술을 이용한 mRNA의 전기천공이 TRAC TALE-뉴클레아제의 기능적 발현을 야기한다는 것을 가리킨다.
- [0656] 항-CD19 단일 사슬 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코드하는 모노시스트론(monocistronic) mRNA으로 T 세포들의 전기천공:
- [0657] IL2 및 항-CD3/CD28 코팅된 비드들로 며칠(3-5) 미리활성화된(preactivated)  $5 \times 10^6$  T 세포들이 사이토포레이션(cytoporation) 버퍼 T에서 재현탁되었고(resuspended), 표 15에서 기재한 프로그램을 이용하여 단일 사슬 CAR(서열번호: 73)를 코드하는 mRNA 10  $\mu\text{g}$  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-콘쥬게이트(conjugated)된 염소 항 마우스 IgG F(ab')2 단편 및 고정가능한 생존능력(viability) 염료 eFluor-780로 염색되었다. 데이터들은 도 20에 보여진다. A는 전에 기재된 모노시스트론(monocitronic) 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 코드하는 폴리시스트론(polycistronic) mRNA로 T 세포들의 전기천공:
- [0664] IL2 및 항 CD3/CD28 코팅된 비드들로 며칠 (3-5) 미리활성화된(preactivated)  $5 \times 10^6$  T 세포들이 사이토포레이션(cytoporation) 버퍼 T에서 전기천공되었고, 표 15에 기재된 대로 프로그램을 이용하여 (서열번호: 125, 서열번호: 126에 의하여 코드됨, 도 21A 및 도 4B (csm4)), 다사슬(multi-chain) CAR를 코드하는 mRNA 45  $\mu\text{g}$  또는 mRNA 없이 0.4cm 큐벳(cuvettes)에서 전기천공되었다.
- [0666] 전기천공 24 시간 후, 세포들은 살아있는(live) 세포들 상 CAR의 세포 표면 발현을 평가하는데 특이적인, PE-콘쥬게이트된(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.

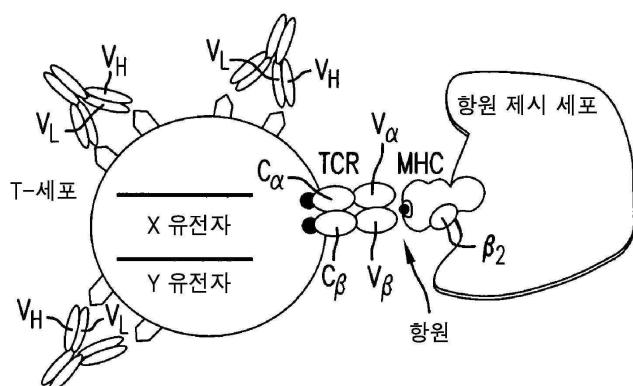
[0690] Howard, F. D., H. R. Rodewald, et al. (1990). "CD3 zeta subunit can substitute for the gamma subunit of Fc epsilon receptor type I in assembly and functional expression of the high-affinity IgE receptor: evidence for interreceptor complementation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(18): 7015-9.

- [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 PthXo1 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.

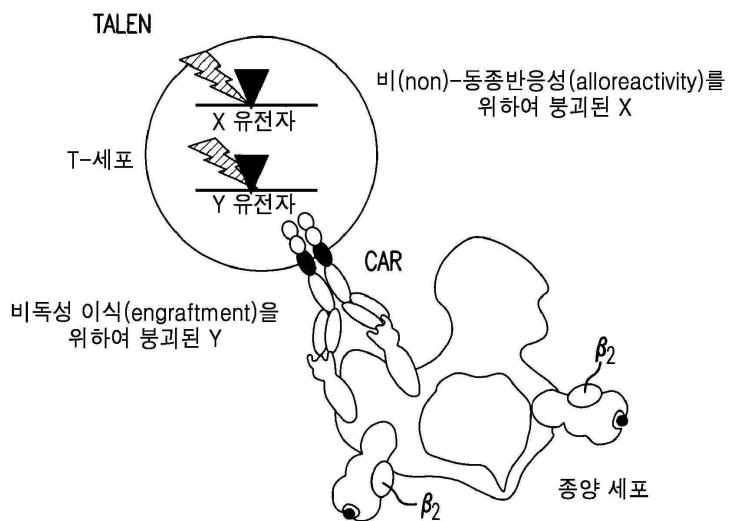
## 도면

### 도면1



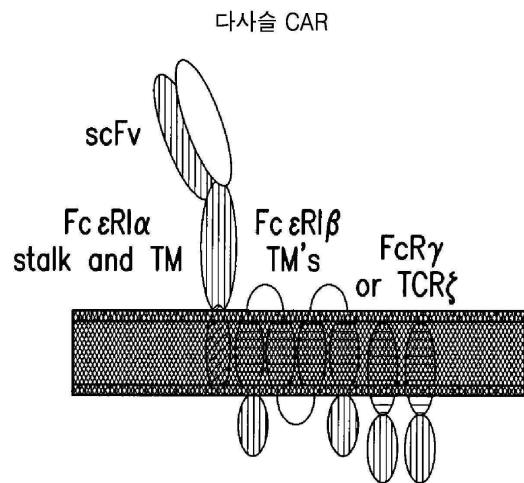
**Fig.1**

도면2



*Fig.2*

## 도면3



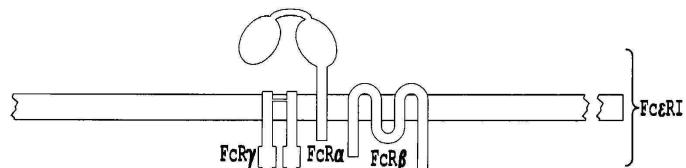
활성화시키는 신호절달 도메인들

-베타 사슬은 모든 신호전달  
도메인들이 가까운막  
위치에 있게 한다.

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

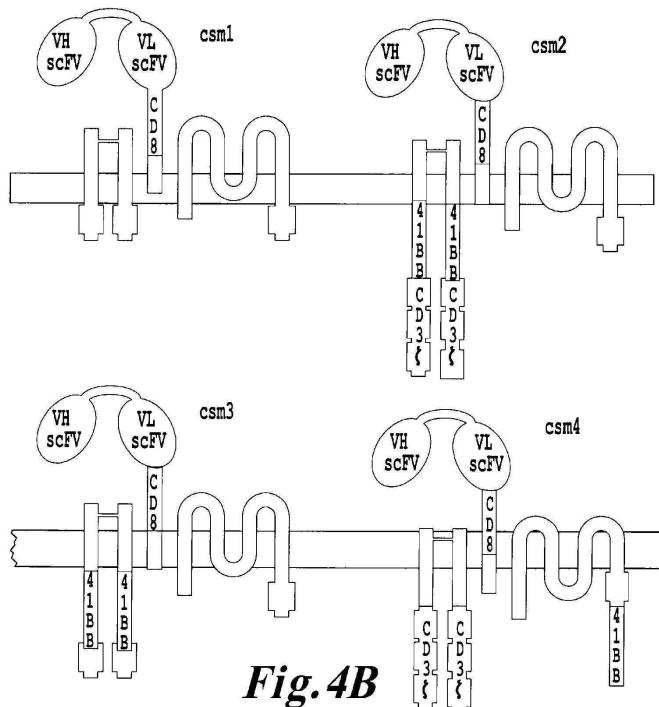
*Fig.3*

## 도면4a

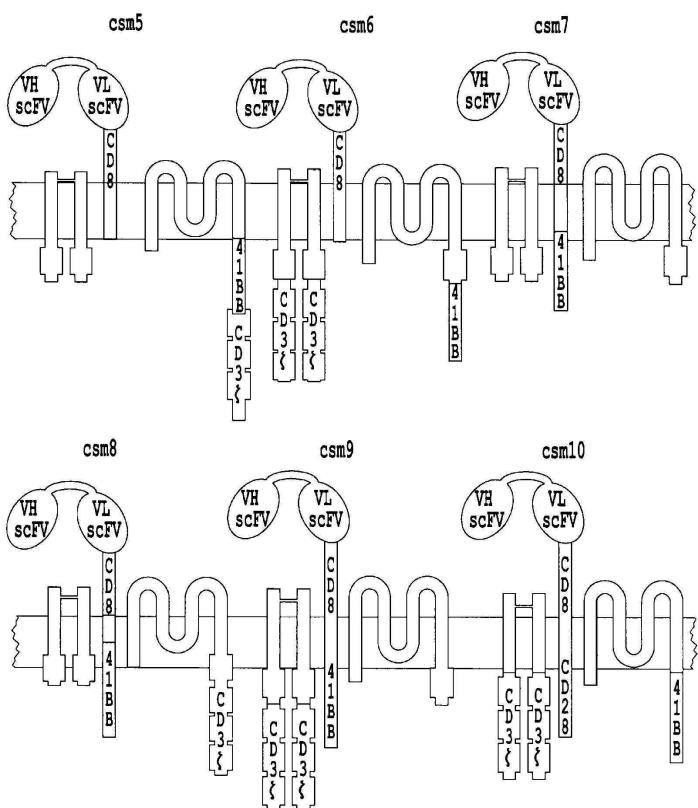


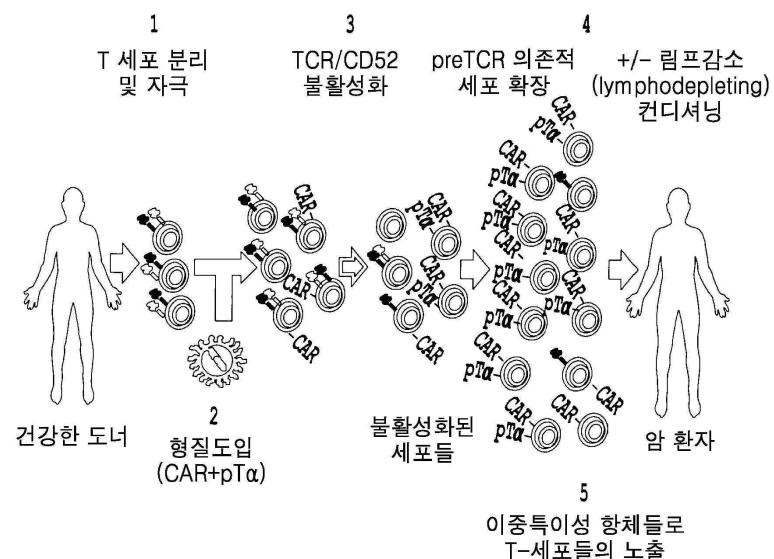
*Fig.4A*

## 도면4b

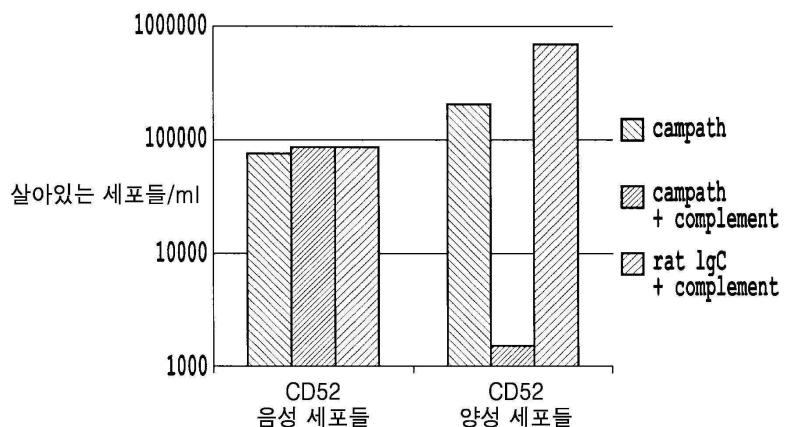
**Fig. 4B**

## 도면4c

**Fig. 4C**

**도면5**

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

**Fig.5****도면6****Fig.6**

도면7

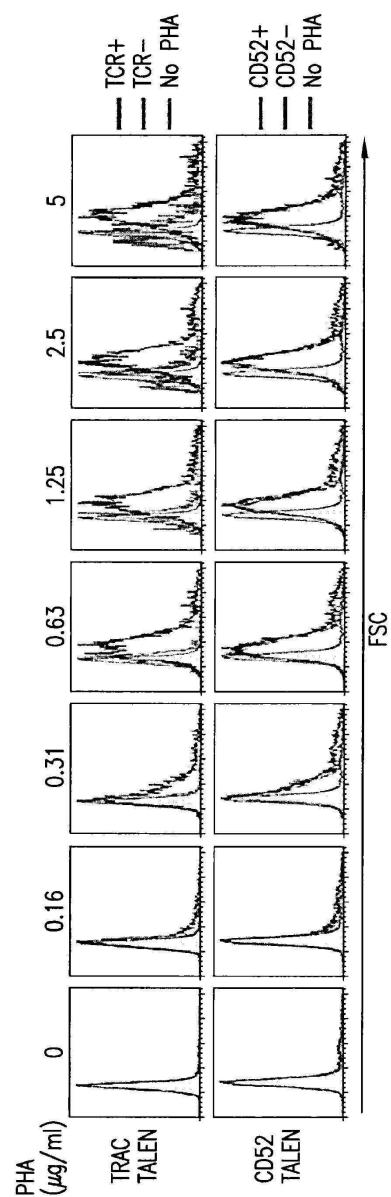


Fig. 7

도면8a

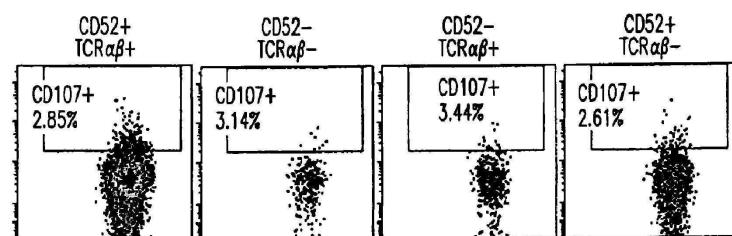
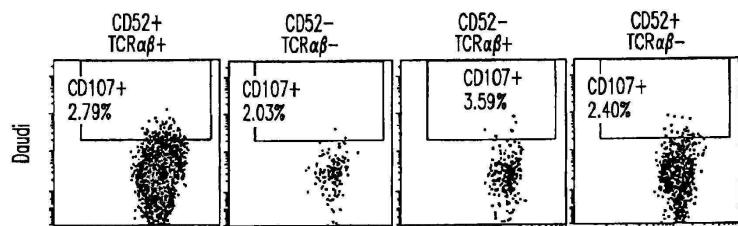
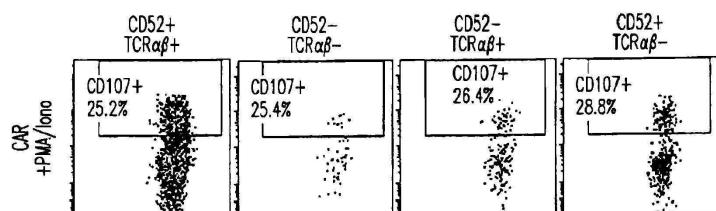


Fig. 8A

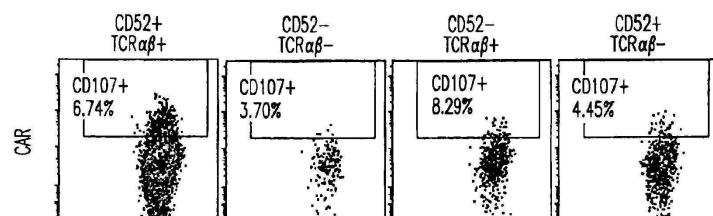
도면8b

**Fig.8B**

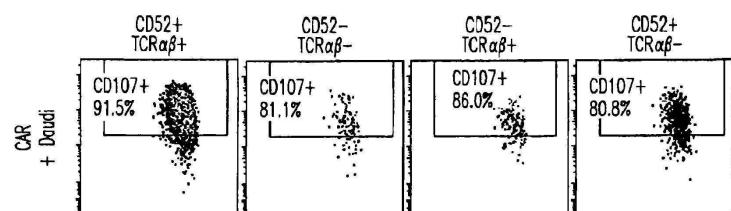
도면8c

**Fig.8C**

도면8d

**Fig.8D**

도면8e

**Fig.8E**

## 도면9a

	왼쪽 반 타겟	스페이서 크기 (bp)	오른쪽 반 타겟	
TRAC	TTGTCCCACAGATATCC	15	CCGTGTACCCAGCTGAGA	
CD52	TTCTCCTACTCACCAT	15	GGTACAGGTAAGAGCA A	
Potential offsite targets	Left matched sequence	Spacer size (bp)	Right matched sequence	Mis-matches
1	ttgtctCaccAgtaTA	25	TTtTcaggttaagTgcaa	8
2	tCActttacctgGacc	19	CCtacaggtaagGgcCa	7
3	tctcagAtgAtacacCC	24	AgtacaggCaTgagcCa	8
4	tGAtcccacagaAatAc	18	gCatTtctgtgggtaTCa	8
5	ttCctctAacctgttaTT	25	gAtCcaggtaagGTcaa	8
6	tAgtcccCcagatatGA	19	aAggtgTgGaTgaggaa	8
7	ttgtcAcacaTataCcG	21	TgGtatTtgtgTgacaa	8
8	tAActcttacacctgttaGT	16	AgatTtctCtgggGcaa	8
9	ttAActccAactAacTat	16	ccgtTtaccGgctTaga	7
10	tGgctcAtacacctgttaGT	14	aGgAtgagGTggaggaa	8
11	ttgctcAtacAtgtGcA	21	atgCtgTtgttaggTggTa	8
12	ttgtcccacagaCatTc	18	ccACgttaGcagctgGga	6
13	tcAcaCctggtaacaTAg	27	GtgTtTagtagggGggaa	8
14	ttgtcccacagCtaCcc	29	gAgtCtTtgtAggacaa	6
15	tctcaActgAAacaAgg	23	TgtatgtTCaagagcaa	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

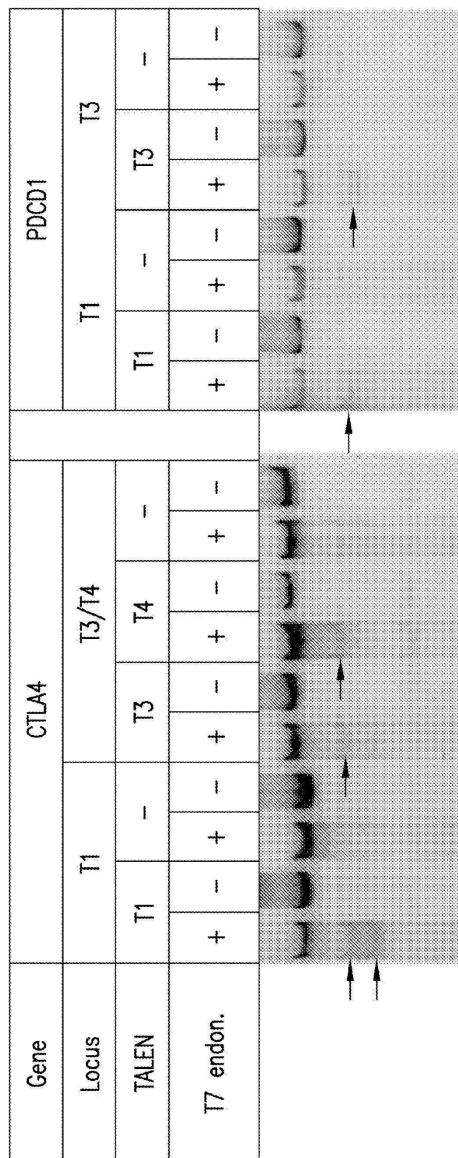


Fig.10

도면11

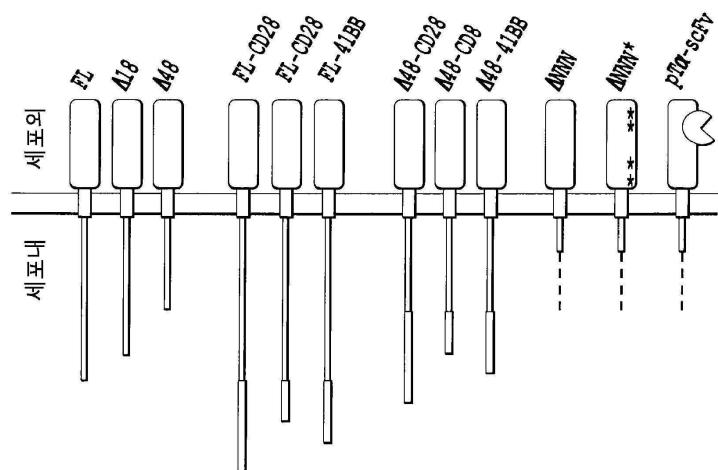


Fig. 11

도면12

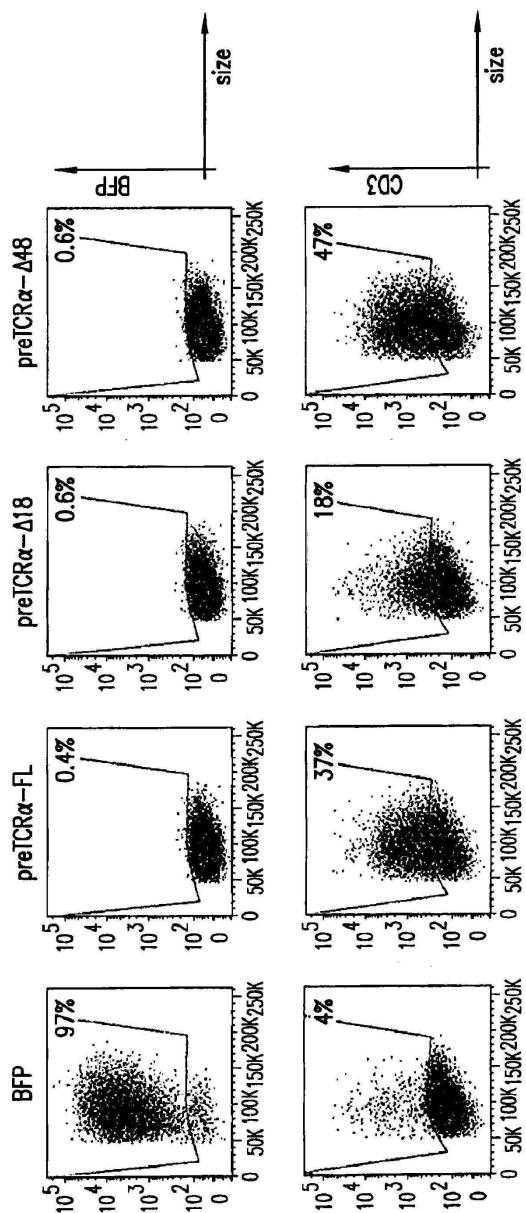


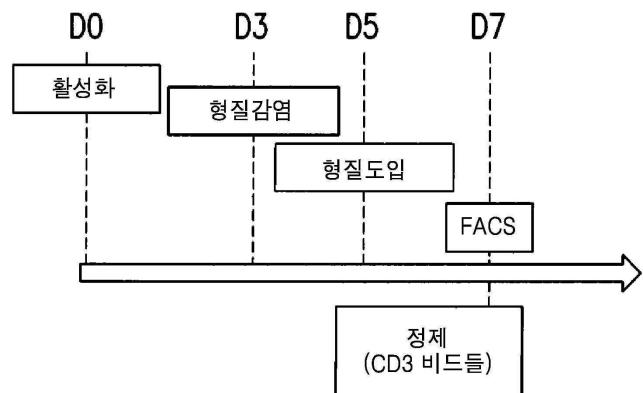
Fig. 12

도면13



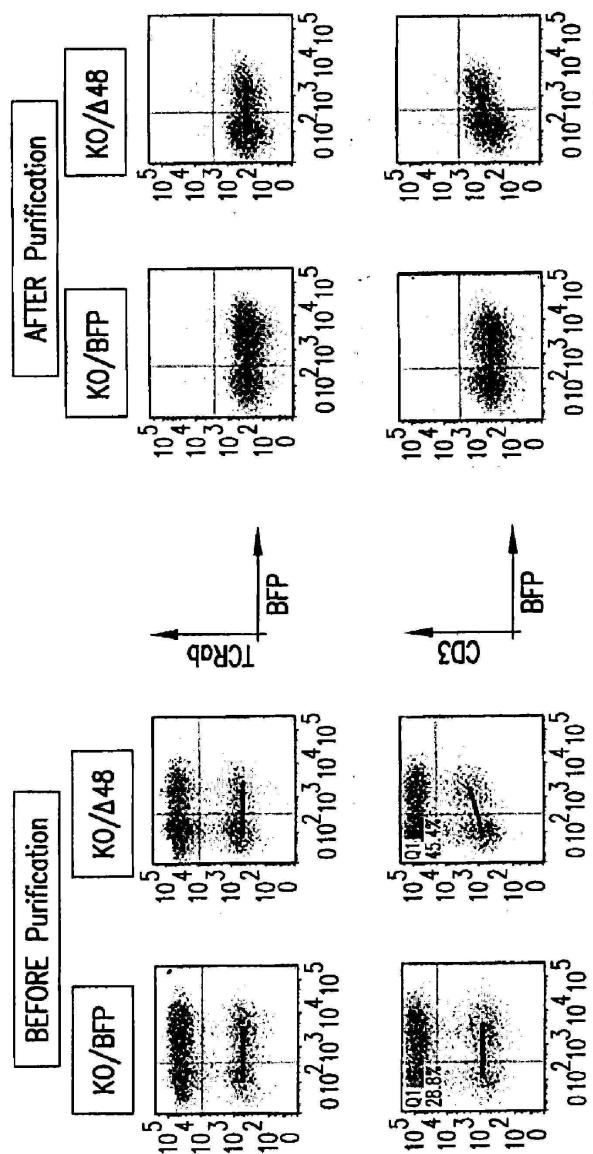
Fig. 13

도면14a



*Fig.14A*

도면 14b

**Fig. 14B**

도면14c

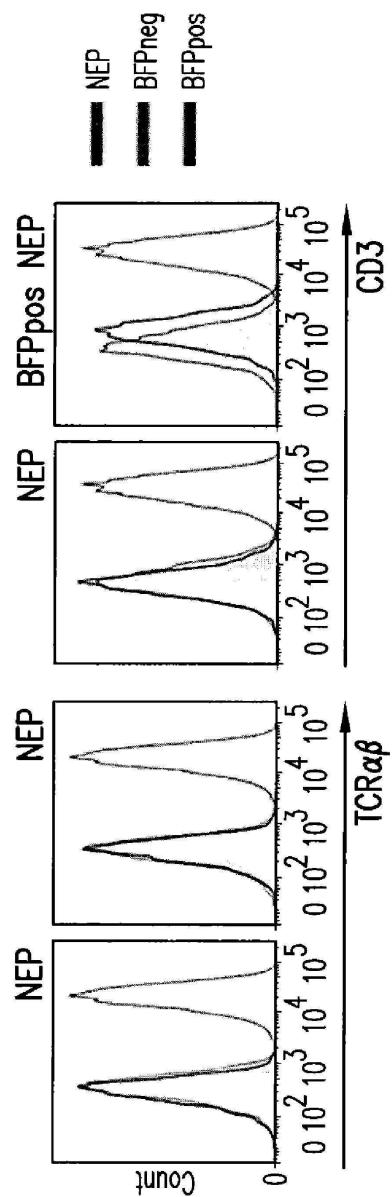


Fig. 14C

도면15a

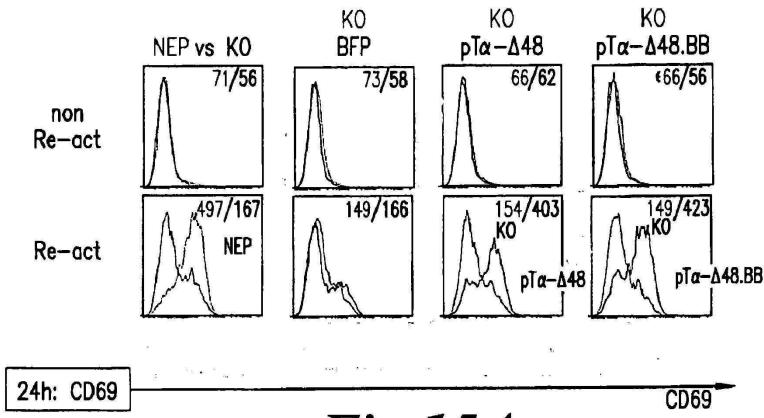
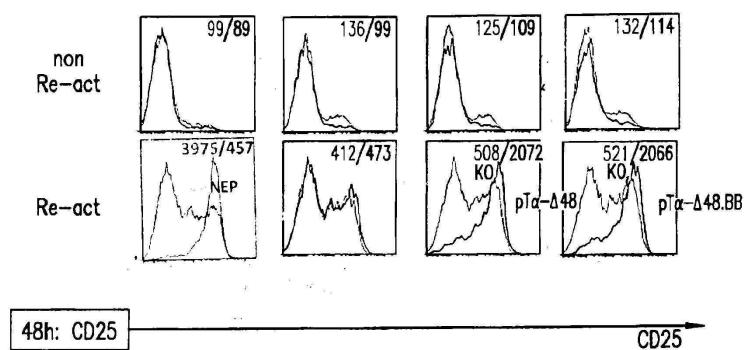
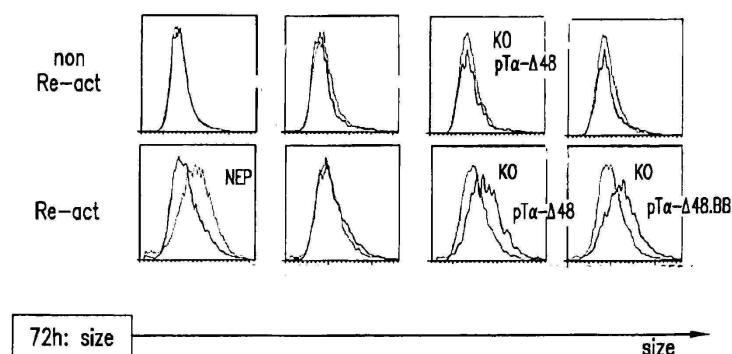


Fig. 15A

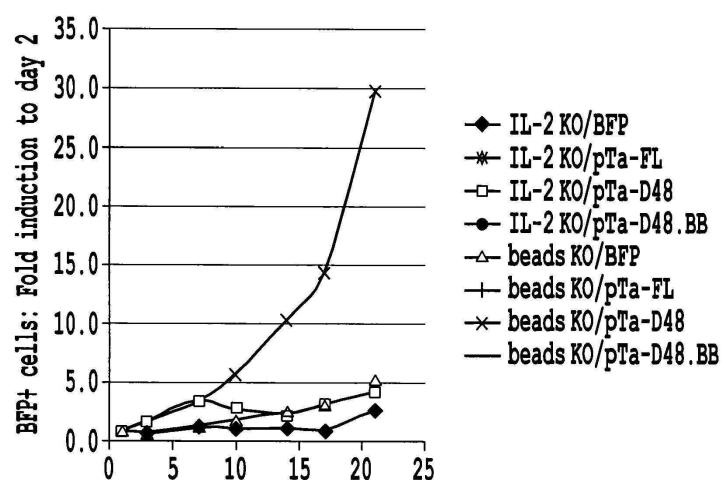
도면 15b

**Fig. 15B**

도면 15c

**Fig. 15C**

도면 16a

**Fig. 16A**

도면 16b

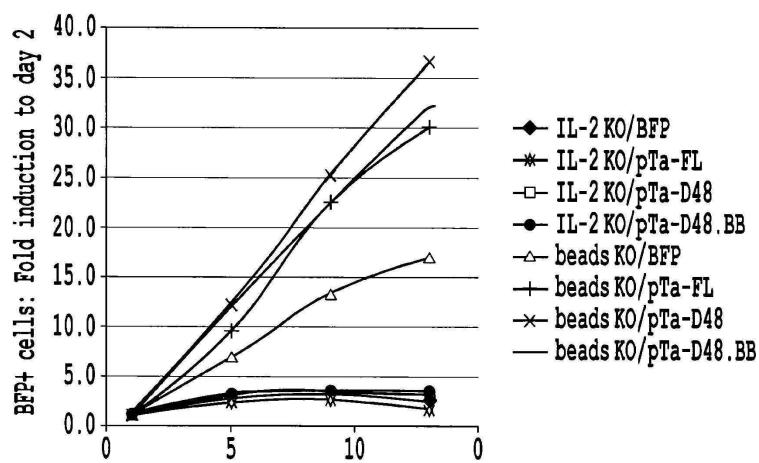


Fig. 16B

도면 17a

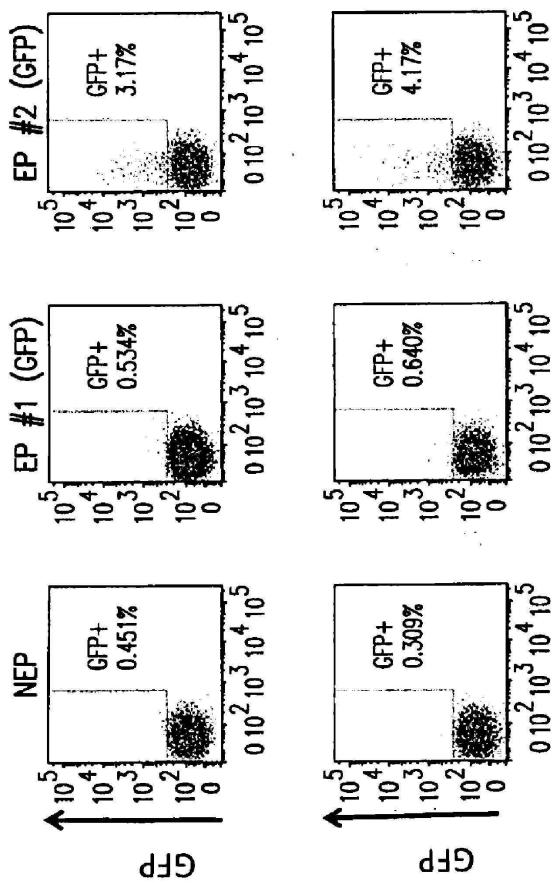
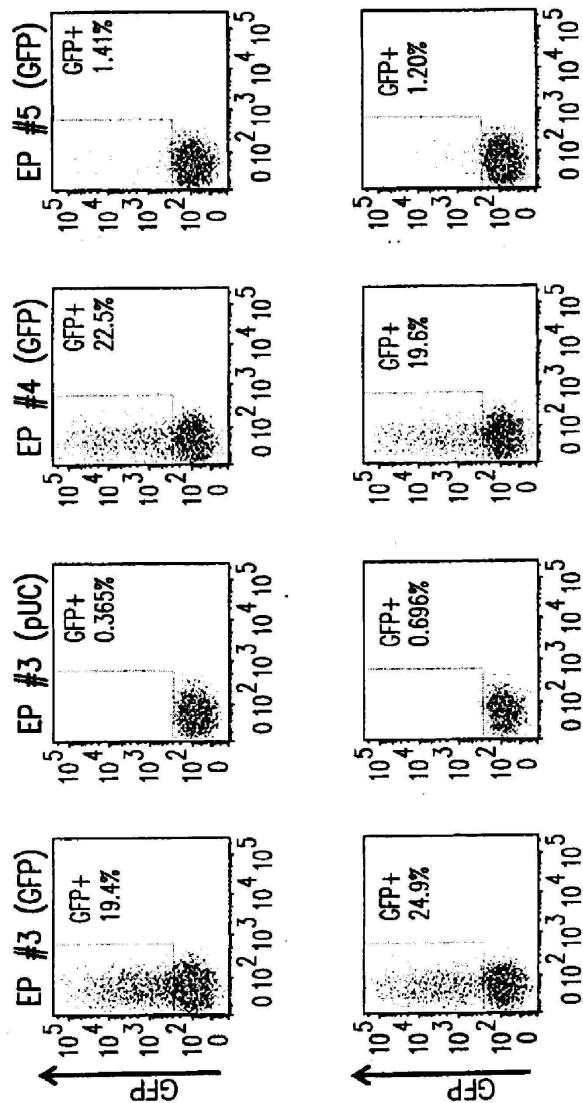


Fig. 17

도면17b

*Fig. 17-1*

도면 18a

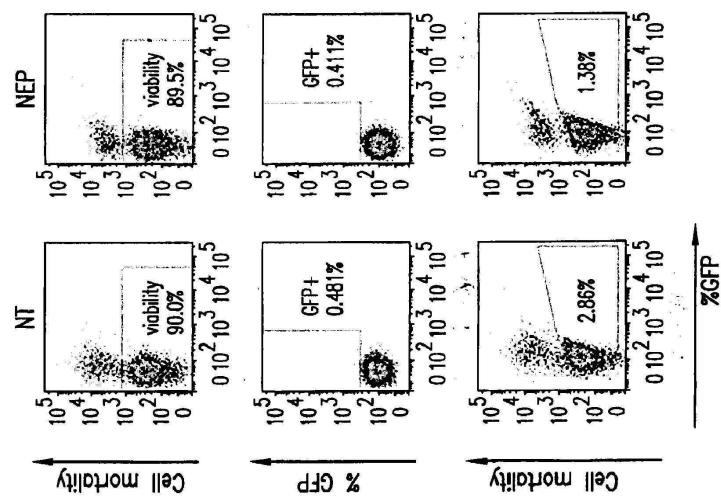


Fig. 18

도면18b

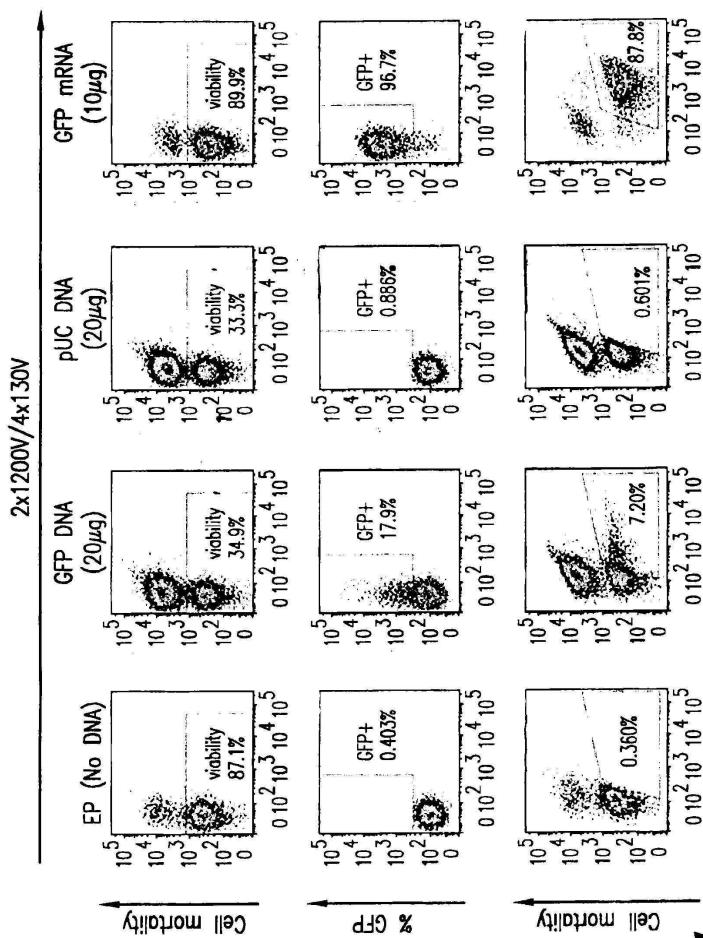


Fig. 18-1

## 도면19

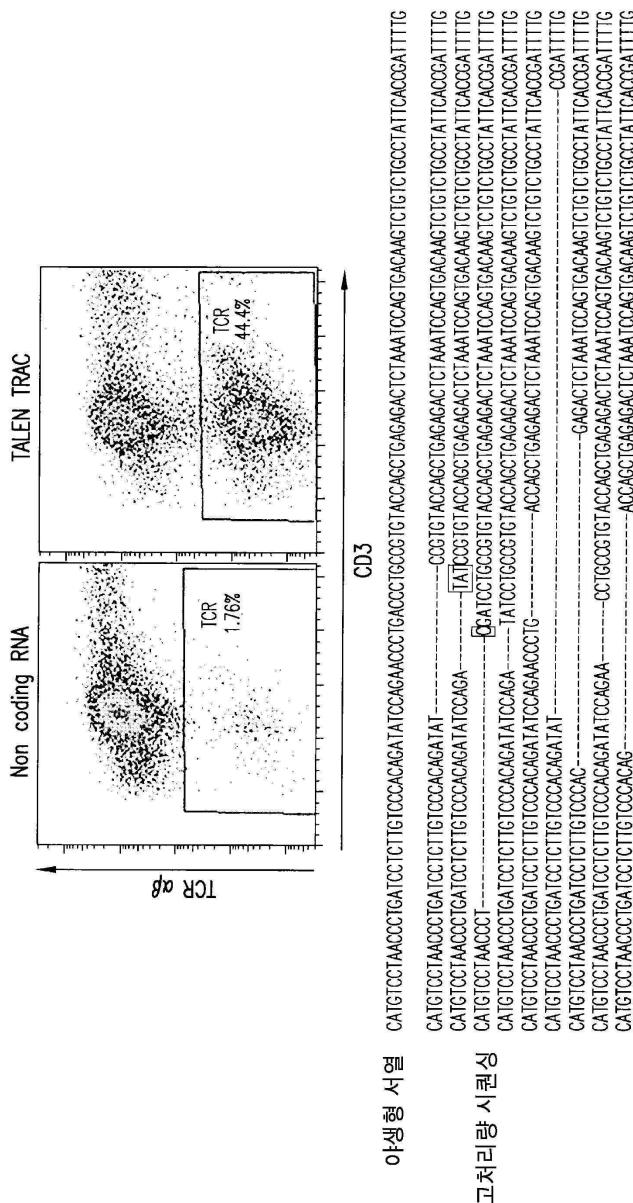
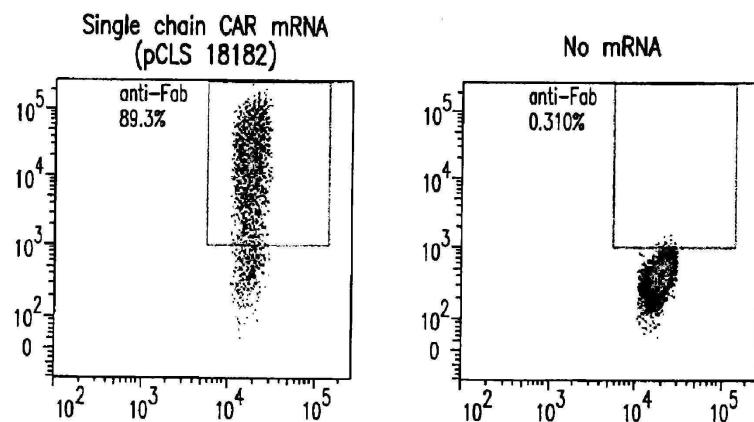
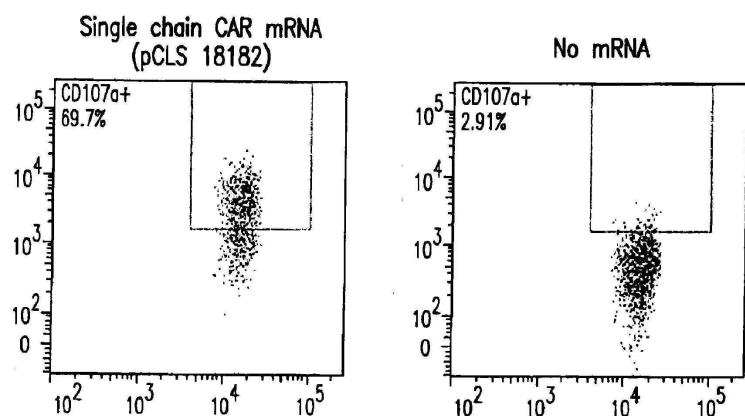


Fig. 19

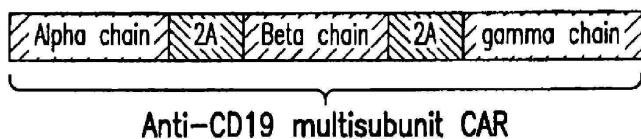
도면20a

**Fig.20A**

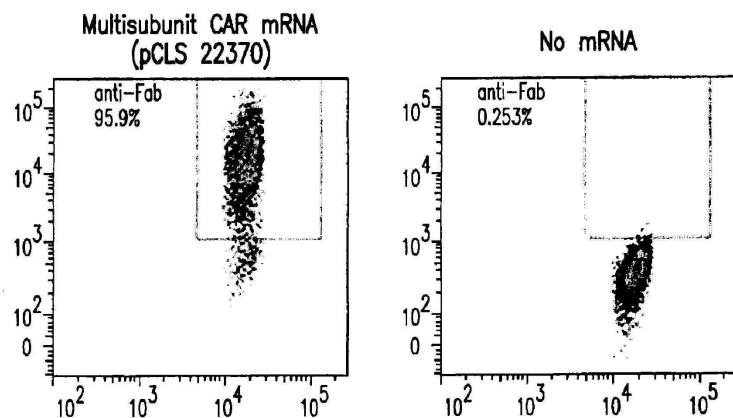
도면20b

**Fig.20B**

도면21a

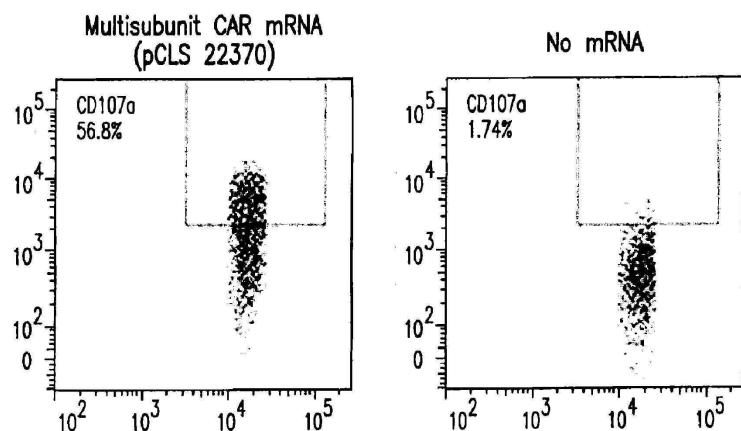
**Fig.21A**

도면21b



**Fig.21B**

도면21c



**Fig.21C**

## 도면22

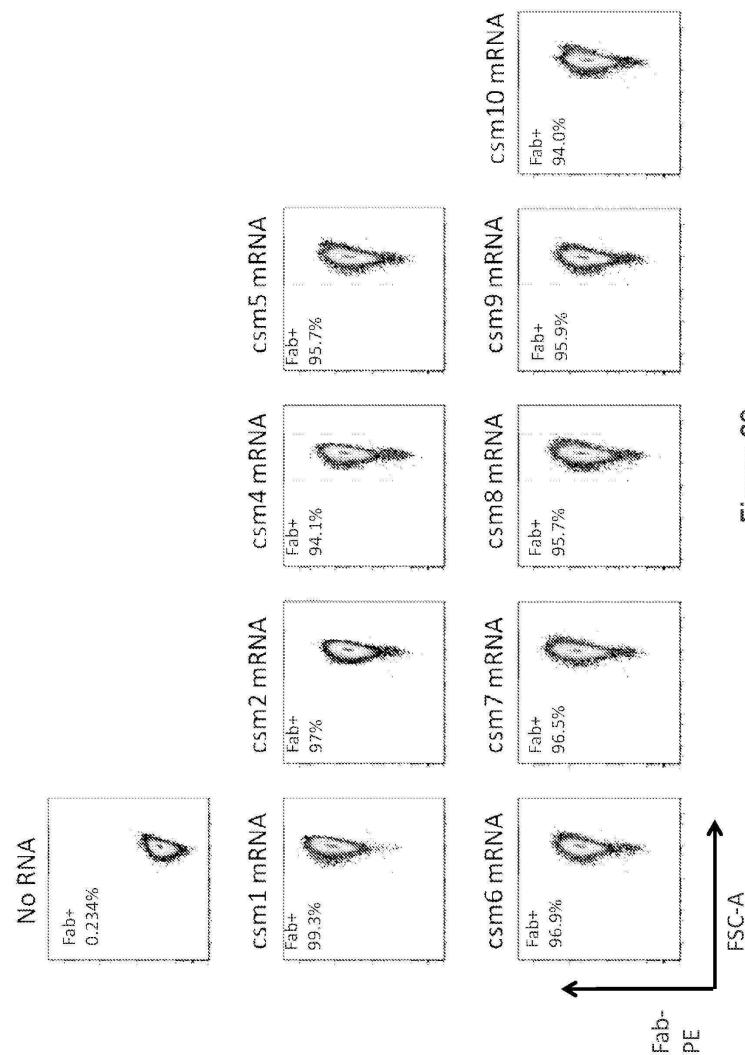


Figure 22

도면23

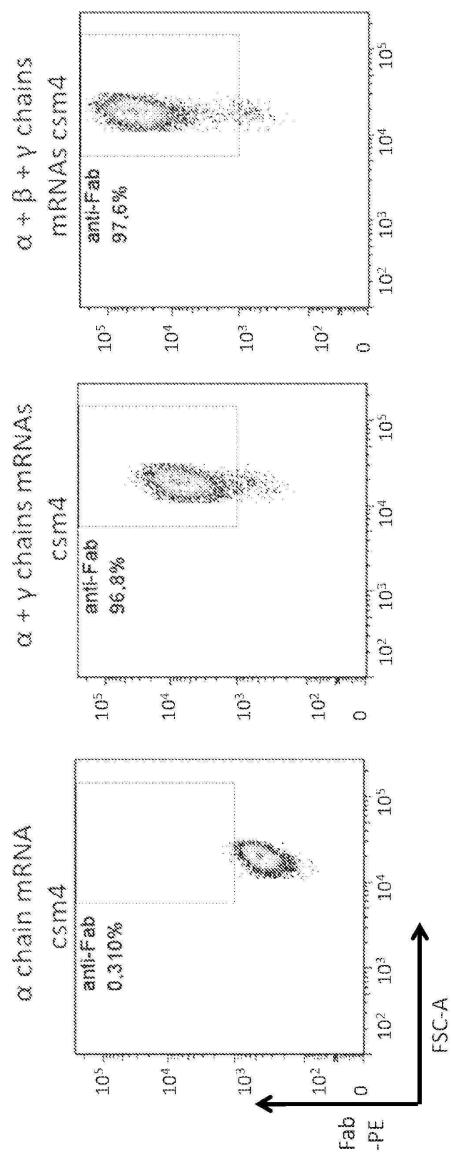


Figure 23

도면24a

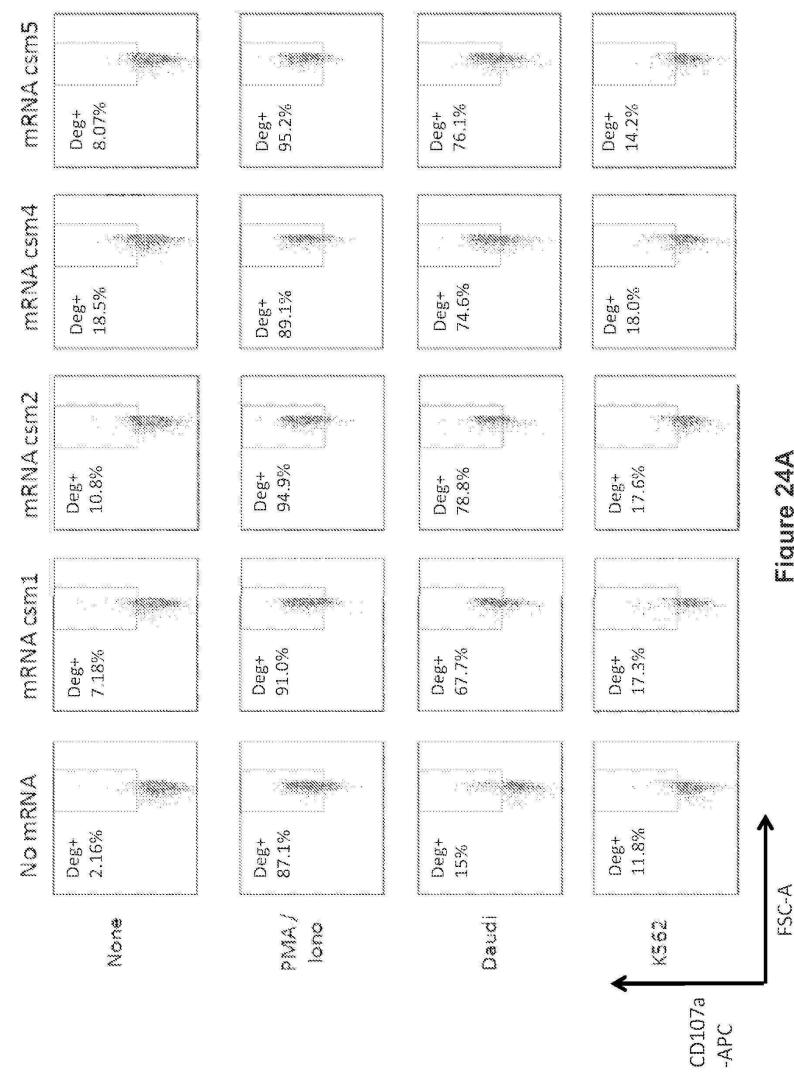


Figure 24A

## 도면24b

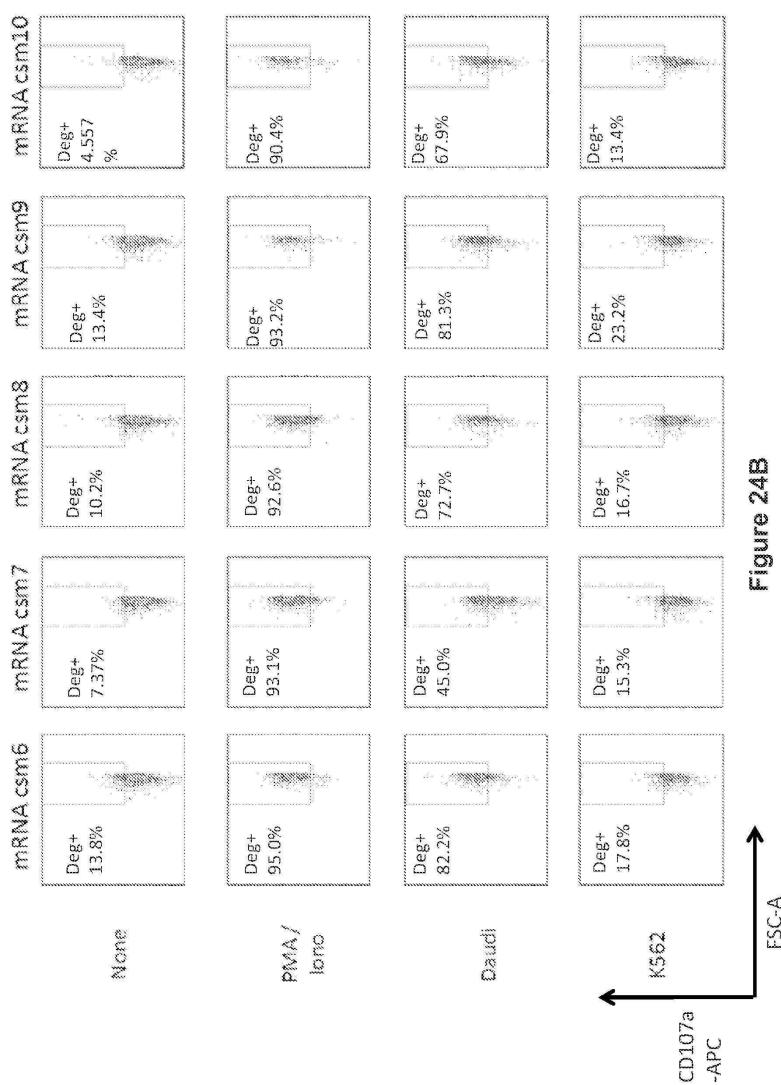


Figure 24B

도면25a

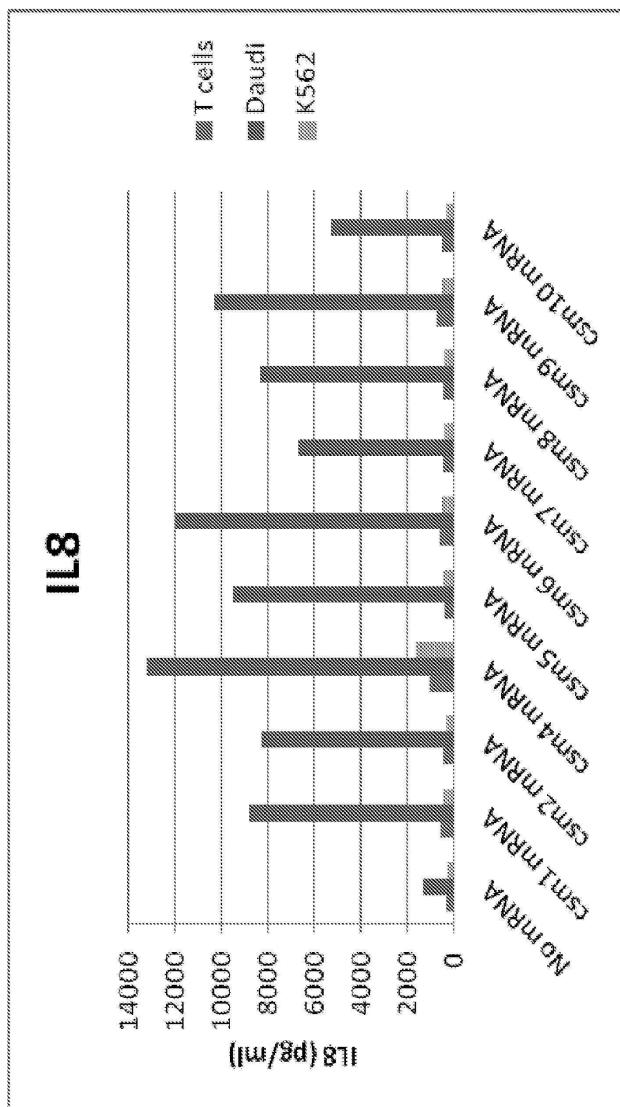


Figure 25A

## 도면25b

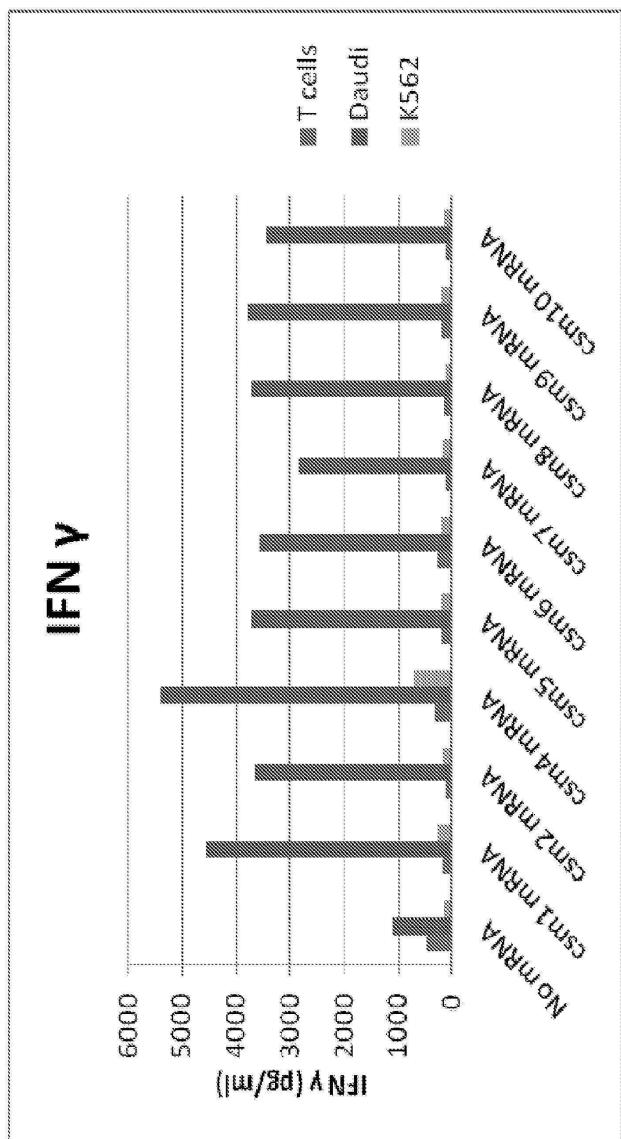


Figure 25B

도면25c

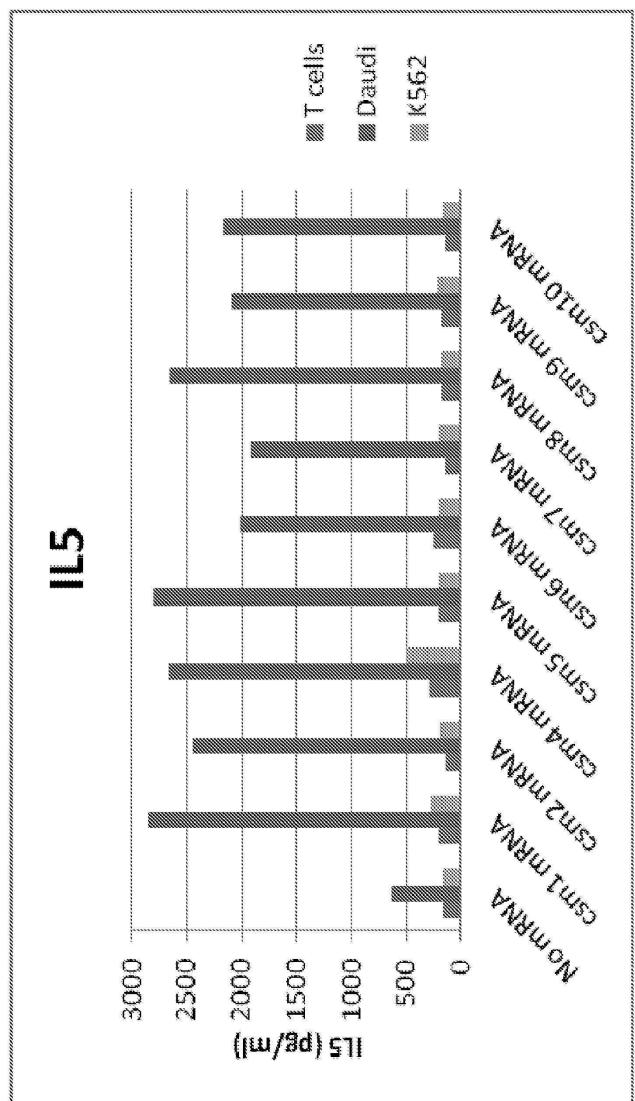


Figure 25C

## 도면26

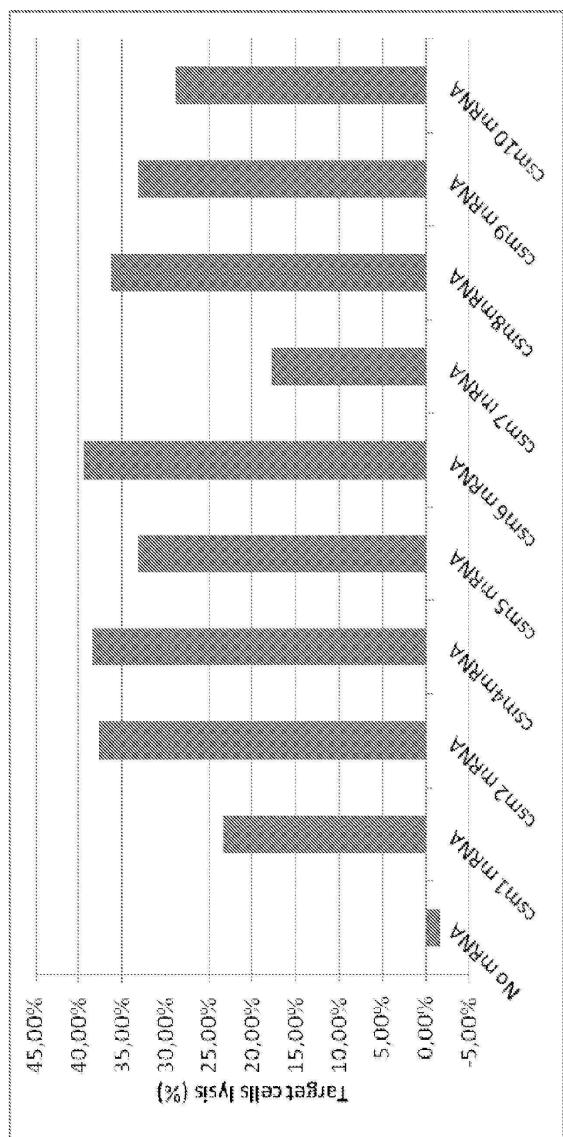
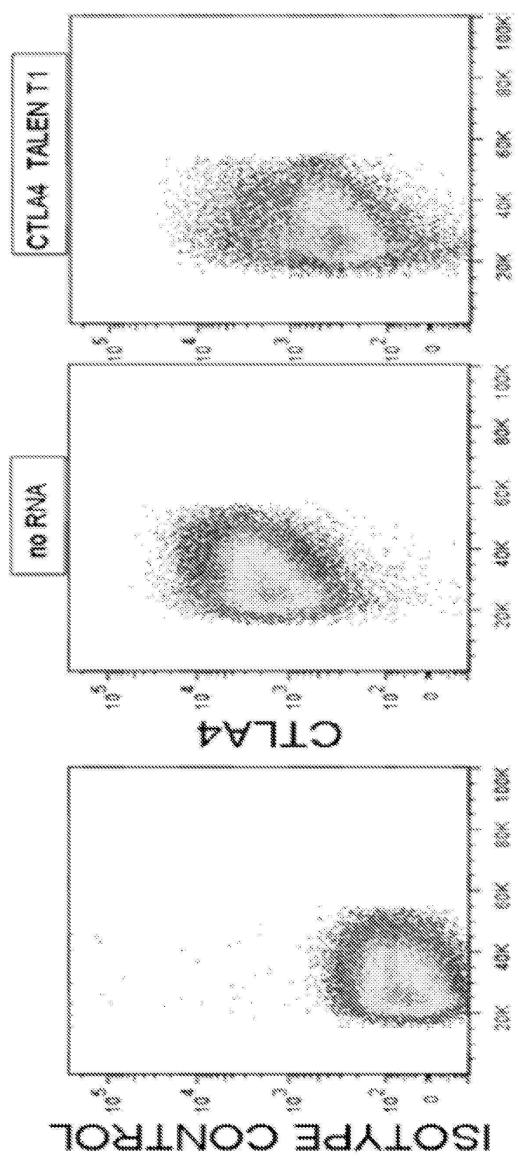


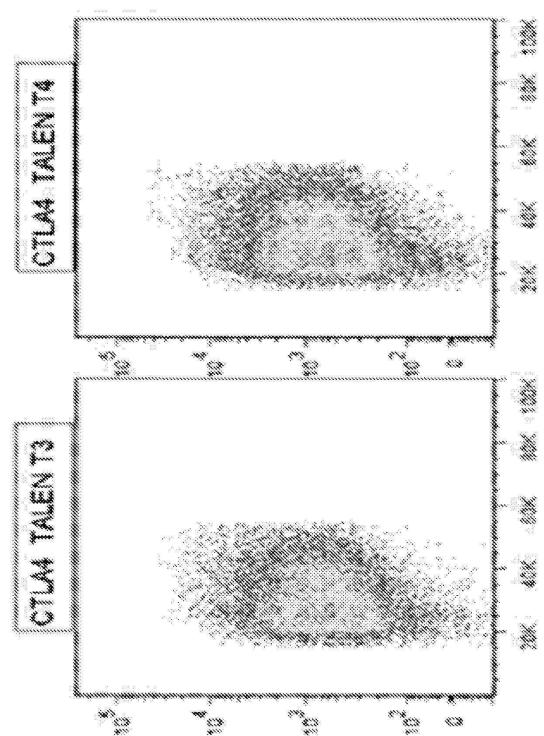
Figure 26

도면27a

Fig. 27



도면27b



도면28

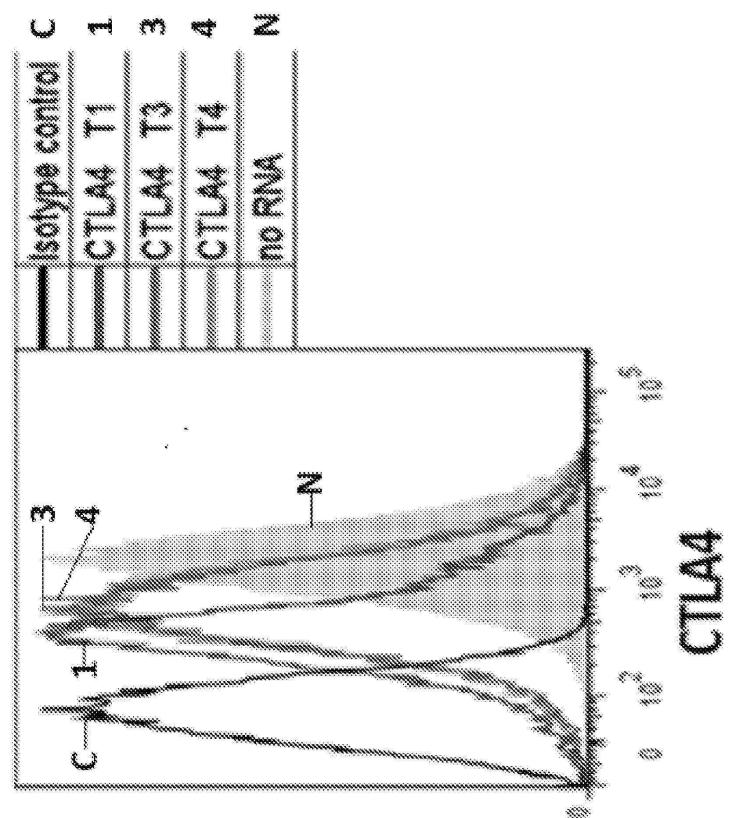


Fig. 28

도면29

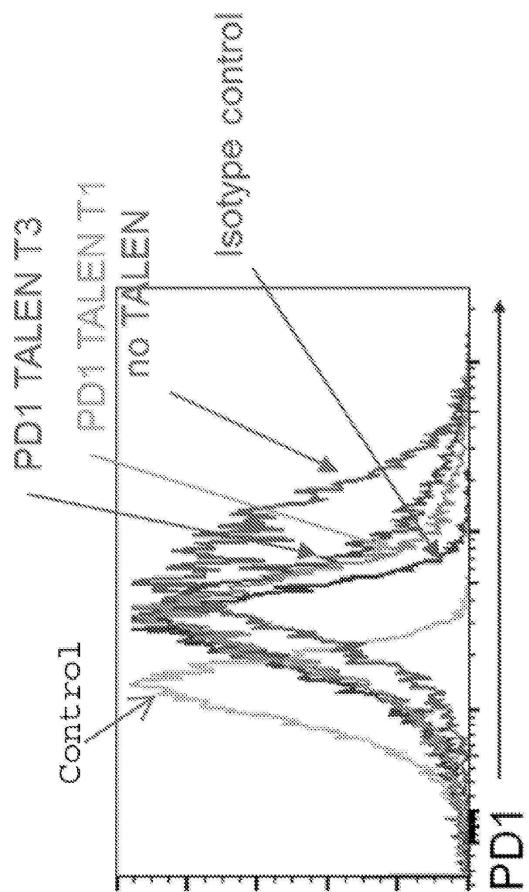


Fig. 29

도면30

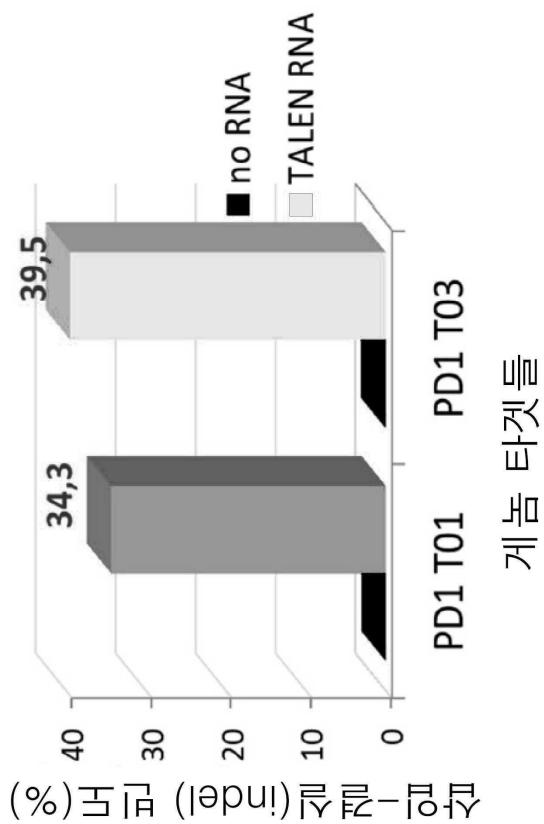


Fig. 30

도면31

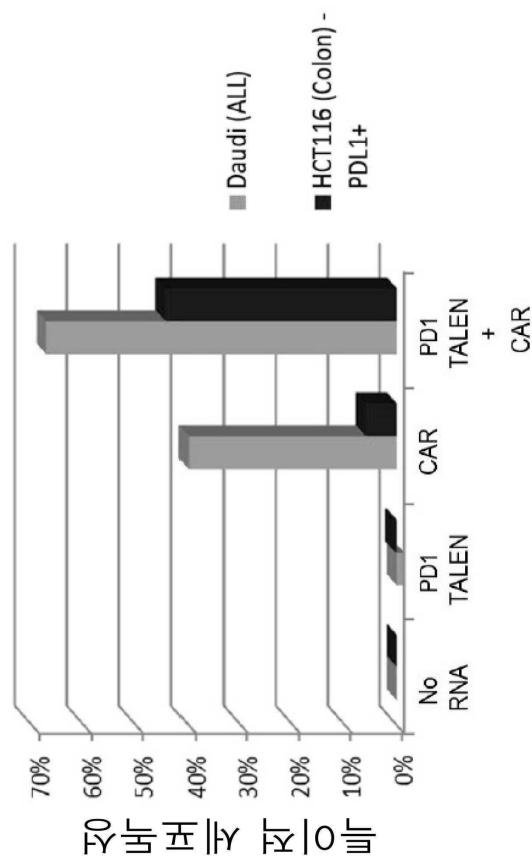


Fig. 31

## 서 열 목 록

<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> Patent In 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

tgcctggtgt gctctgatga agcttcagga tgtcattatg gagtcttaa	49
---	----

<210> 3

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GReX3T4

<400> 3

tgctctgatg aagttcagg atgtcattat ggagtcttaa cttgtggaa	49
<210> 4	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GReX5T1	
<400> 4	
tgggtcaact gttggaggtt attgaacctg aagtgttata tgcaggata	49
<210> 5	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GReX5T2	
<400> 5	
tatgatagct ctgttccaga ctcaacttgg aggatcatga ctacgctca	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 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
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
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
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser 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 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 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 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 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 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
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 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
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
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 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 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 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 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 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 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 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 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 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
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
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 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
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 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 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
Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser 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 Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly		
305	310	315
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
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 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
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser 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 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 Lys		
1	5	10
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
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 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 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 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 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
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 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 Gln Gln Val Val Ala		
405	410	415
Ile Ala Ser Asn Asn 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 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
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 Arg Pro Ala		
515	520	525
Leu Glu		

530  
<210> 14  
<211> 530  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Repeat-GRes5T1-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 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 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		

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> 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 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 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 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 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 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 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 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
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 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 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
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser 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 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 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 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
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
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 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 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 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 Arg Pro Ala  
 515                    520                    525  
 Leu Glu

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 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 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 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 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 acgttaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60

gctatcgata tcgcccgtct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120

aaaccgaagg ttcggtcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180

acacacgcgc acatcggtgc gttaagccaa cacccggcag cgtagggac cgtcgctgtc 240

aagtatcagg acatgatcgc agcggttgcga gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgcctgc gaggcctgc tcacggtggc gggagagtgg	360
agagggtccac cgttacagtt ggacacaggg caacttctca agattgcaaa acgtggcgcc	420
tgaccgcag tggaggcagt gcatgcattt gcataatgcac tgacgggtgc cccgcctaac	480
ttgaccgcgg agcaggggtt ggccatcgcc agcaatattt gtggcaagca ggcgcgtggag	540
acgggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcagggt	600
gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg	660
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat	720
ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtct gtgcaggcc	780
cacggcttga ccccgagca ggtgggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggtt gttggcggtt ctgtggcagg cccacggctt gaccggag	900
caggtgggttccatcgccag caatatttggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtgcaggcg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccgcgg agcaggggtt ggccatcgcc	1020
agccacgatg gggcaagca ggccgtggag acggccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc	1080
caggcccacg gcttgacccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag	1140
caggcgctgg agacggtcca gggctgttg cccggctgtgt gccaggccca cggcttgacc	1200
ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat aatggtgccca agcaggcgct ggagacggtc	1260
cagggctgt tgccgggtct gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtgtggcc	1320
atcgccagca atattgggtt caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttggcggtt	1380
ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag caggtgggtt ccacgcggc caatggcggt	1440
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcggtt ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgacccccc agcaggggtt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgtggag	1560
acggccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcagggt	1620
gtggccatcg ccagcaataa tggtgcccaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg	1680
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc cggcaggcagg tggtgccat cgccagcaat	1740
attggtgccca agcaggcgct ggagacgggtt caggcgctgt tgccgggtct gtgcaggcc	1800
cacggcttga ccccgagca ggtgggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtt gttggcggtt ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag	1920
caggtgggtt ccacgcggc caatggcggtt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcggt	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccttc acgaggggtt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc ggcgtggag acgttgttgc cccagttatc tggccctgat	2100

ccggcgttgg ccgcgttgac caacgaccac ctcgtgcct tggcctgcct cggcgccgt	2160
cctgcgtgg atgcagtgaa aaaggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280
gagtacatcg agctgatcgat gatcgcccg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aagggtatgg agttttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtcc	2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg cctactccgg cgctacaac ctgcccattcg gccaggccga cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaaag	2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttccctgttc tgccggcca cttcaaggc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tccgtggagg agtcctgat cggcgccgag atgatcaagg ccggcacccct gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814
<210> 20	
<211> 2832	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GReX2-R TALEN	
<400> 20	
atggcgtatc ctaaaaagaa acgttaaggatc atcgataagg agaccggccgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggtt cgttcgacag tggcgccagca ccacgaggca	180
ctggcgcc acgggtttac acacgcgcac atcgatcgat taagccaaaca cccggcagcg	240
tttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgacat cgttgcaga ggcgacacac	300
gaagcgtatcg ttggcgccg caaacagtgg tccggcgac ggcgtctgg ggccttgctc	360
acgggtggccg gagagtttag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaaac gtggcgccgt gaccgcgtg gaggcagtgc atgcgtggc caatgcactg	480
acgggtggcc cgcgtcaactt gaccccccag caggtggatccatcgccag caatggcggt	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcg ctgttgcgg tgctgtgcca ggcggccgc	600
ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag	660
acgggtccagg ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacgc gcttgacccc ggagcagggt	720
gtggccatcg ccagccacga tggcgccag caggcgtgg agacggtcca gggcgcttg	780

ccgggtgtgt gcccggccca cggcttgacc ccccaaggagg tggtgccat cgccagcaat	840
ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgtgct gtgcaggcc	900
cacggcttga cccccagca ggtggtgcc atgccagca atggcggtgt caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggct gttggcggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag	1020
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaaggagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc	1140
agcaatggcg gtggcaagca ggccgtggag acgggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc	1200
cagggccacg gcttgacccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagccacga tggccggcaag	1260
caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg cggctgtgt gcccaggccca cggcttggacc	1320
ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat ggccggccaa agcaggcgct ggagacggtc	1380
cagcggctgt tgccggctgt gtggccaggcc cacggcttga cccggagca ggtggtgcc	1440
atgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttggcggtg	1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccggag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	1560
ggcaaggagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1620
ttgacccgg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gggcaagca ggcgtggag	1680
acggttccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggeccacg gcttgacccc ggagcagggtg	1740
gtggccatcg ccagcaaatat tggtgccaa caggcgctgg agacggtgca ggcgtgttg	1800
ccgggtgtgt gcccggccca cggcttgacc ccccaaggagg tggtgccat cgccagcaat	1860
aatggtgca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggctgt gtggccaggcc	1920
cacggcttga cccccagca ggtggtgcc atgccagca ataattggtgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagcggct gttggcggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag	2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcgcc ggccaggccgg cgctggagag cattgttgcc	2100
cagtatctc gccctgatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgccctt	2160
gcctgcctcg gccccgtcc tgcgtggat gcagtggaaaa agggatgggg ggatccatc	2220
agccgttccc agctggtaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tggccacga gtacatcgag ctgatcgaga tgcggggaa cagcacccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgtatgggg ttcttcatga aggtgtacgg ctacagggc	2400
aagcacctgg gccccgtccag gaagcccgac ggcccatct acaccgtggg ctccccatc	2460
gactacggcg tgcgttgaa caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccattggc	2520

caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg	2640
tccggccact tcaaggcata ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg ccgtgctgta cgtggaggag ctccgtatcg gcccggagat gatcaaggcc	2760
ggcacccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttaaca acggcgagat caacttcgct	2820
gccgactgat aa	2832
<210> 21	
<211> 2814	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GReX3T2-L TALEN	
<400> 21	

atggcgcata ctaaaaagaa acgttaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgccccatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttcggtcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt	180
acacacgcgc acatcggtgc gtttagccaa caccggcag cgtagggac cgtcgctgtc	240
aagtatcagg acatgatcgac agcggtgcca gaggcgacac acgaagcgat cgtaggcgtc	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgcctcg gaggccttgc tcacggtgtc gggagagttt	360
agaggccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcgcc	420

gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcattgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgacccccc agcaggttgtt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgttggag	540
acgggtccagc ggctgttgcg ggtgtgtgc caggcccacg gcttacccggggagcggatgt	600
gtggccatcg ccagccacga tggcgcaag caggcgctgg agacggtcca gggcgctgttgc	660
ccgggtgtgttgc gccaggccca cggcttgacc cggaggcagg tggccatcgccac	720
gatggcgccca agcaggcgct ggagacggc acggcgctgt tgccgggtgtc gtcggccac	780
cacggcttgc ccccccagca ggtggtgcc atgcgcacca atggcggtgg caagcaggcg	840

ctggagacgg tccagcggct gttggcggtg ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag	900
cagggttgttgg ccatcgccag caataatgttgc ggcacggcagg cgctggagac ggtccagcg	960
ctgttgcgg tggccatcgcc gggccacggc ttgacccccc agcaggttgttgg ccatcgcc	1020
agcaataatg gttggcaagca ggcacggcagg acggcgttgc ggcacggcgttgc ggtccagcg	1080
caggcccacg gcttggccatcg ccagcagggtg gttggccatcg ccagcaatgg cggcgccac	1140

caggcgtgg agacggtcca gcggctgtt ccgggtctgt gccaggccca cggcttgacc	1200
ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat aatggtgca agcaggcgct ggagacggtc	1260
cagcggctgt tgccgggtct gtgccaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc	1320
atcgcgcagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtct gttggcggtg	1380
ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag caggtgggtt ccacgcgcag caataatgg	1440
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc	1500
ttgaccccg agcagggtgtt ggccatcgcc agccacgtt gggcaagca ggcgttggag	1560
acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgacccccc ccagcagggt	1620
gtggccatcg ccagcaatgg cggtgttcaag caggcgttgg agacggtcca ggcgttgg	1680
ccgggtctgtt gccaggccca cggcttgacc ccggaggcagg tggtgccat cgccagccac	1740
gatggcggca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccgggtct gtgccaggcc	1800
cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtct gttggcggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag	1920
caggtgggtt ccacgcgcag caataatggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg	1980
ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc ttgacccctc agcagggtgtt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc ggcgttggag agcattgtt cccagtatac tcggccatgt	2100
ccggcgttgg ccgcgttgc acacgaccac ctgcgtgcct tggctgcct cggcggcg	2160
cctgcgttgg atgcagtgtt aaaggattt gggatccta tcagccgttc ccagctgg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agtgaagta cgtccccac	2280
gagtagatcg agtgcgttgcgat gatcgcccg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aagggtgttgg agttttcat gaagggtgtac ggctacagg gcaaggacactt gggcggtcc	2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtt ggctcccca tcgactacgg cgtgtatgt	2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctggccatcg gccaggccga cggaaatgcag	2520
aggtaacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtgaaag	2580
gtgtacccctt ccagcgttgc acgttcaag ttccgttgc tgccggccca cttcaaggcc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgt	2700
tccgtggagg agtcttgcgtt cggcgccgag atgatcaagg ccggcacccctt gaccctggag	2760
gaggtggagga ggaagttcaa acacggcgag atcaacttgc cggccgactg ataa	2814
<210> 22	
<211> 2832	
<212> DNA	

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; GReX3T2-R TALEN

&lt;400&gt; 22

atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgacag ccacgaggca	180
ctggtcggcc acgggttac acacgcgcac atcggtcggt taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgac cgttgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcg caaacagtgg tccggcgcac gcgccttgaa ggccttgtc	360
acggtgtggcg gagagtttag aggtccaccg ttacagttag acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccccag cagggtgggg ccatcgccag caatggcggt	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgtgccgg tgctgtgcca gccccacggc	600
ttgaccccg agcaggtgtt ggccatcgcc agcaatattt gtggcaagca ggcgttgag	660
acggtgtcagg cgctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgcaccc ggagcagggt	720
gtggccatcg ccagcaatat tggggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgtgttg	780
ccggtgtgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggggccat cgccagcaat	840
aatggtgca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccgggtgt gtggcaggcc	900
cacggcttga ccccgagca ggtgggtggc atgcccagca atattgggtt caagcaggcg	960
ctggagacgg tgcaggcgct gttggccgtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag	1020
cagggtgggg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgtgccgg tgctgtgcca gccccacggc ttgacccccc agcaggtgtt ggccatcgcc	1140
agcaatggcg gtggcaagca ggccgtggag acggccacgc ggctgttgcc ggtgtgtgc	1200
caggcccacg gcttgcaccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagccacga tggggcaag	1260
caggcgctgg agacggtcca gcccggctgttgc cgggtgtgttgc cggccatcgcc	1320
ccggaggcagg tggggccat cgccagccac gatggcgca agcaggcgct ggagacggc	1380
caggcgctgt tgccgggtgt gtggccaggcc cacggcttga cccggagca ggtgggtggc	1440
atgcccagca atattgggtt caagcaggcg ctggagacgg tgccaggcgctt gttggccgt	1500
ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag cagggtgggg ccatcgccag caatggcggt	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca gccccacggc	1620

ttgaccccg agcaggttgt ggccatcgcc agcaatattt gtggcaagca ggcgcgtggag	1680
acgggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgcaccc ggagcagggtg	1740
gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgcgttttgc	1800
ccgggtgtgt gccaggcccc cggcttgacc ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat	1860
ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggctgt gtgccaggcc	1920
cacggcttga cccccccagca ggtggtggcc atgccagca ataatggtgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagcggct gttggccggct ctgtggcagg cccacggctt gaccctttag	2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcgcc ggcaggccgg cgctggagag catttttgcc	2100
cagtttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgcacca acgaccacct cgtgccttg	2160
gcctgcctcg gccccgtcc tgcgtggat gcagtgaaaa agggatggg ggatcctatc	2220
agccgttccc agctggtcaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgccccggaa cagcacccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgtatggg ttcttcatga aggtgtacgg ctacagggc	2400
aagcacctgg gccccgtccag gaagccccgac ggcgcctatct acaccgtggg ctccccatc	2460
gactacggcg tgcgtggca caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccattggc	2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaagggt gtaccccttc acgcgtgaccg agttcaagtt cctttcgatc	2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgcacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctccgtatcg gccccggat gatcaaggcc	2760
ggcacccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttaacaaca acggcgagat caacttcgatc	2820
gccgactgtaa	2832
<210> 23	
<211> 2814	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> GReX3T4-L TALEN

<400> 23

atgggcgtatc ctaaaaaagaa acgttaaggatc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgccccatct acgcacgatc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgccag caccacgagg cactggatcg ccacgggttt	180
acacacgcgc acatcgatgc gtttaagccaa caccacggccag cgtagggac cgtcgatgtc	240

aagtatcagg acatgatcgc agcggttgcga gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgtctg gaggcctgc tcacggtggc gggagagttg	360
agaggtccac ctttacagtt ggacacaggg caacttctca agattgcaaa acgtggcgac	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatttgcgcaatgcac tgacgggtgc cccgcgtcaac	480
tttgcacccccc agcagggttgttggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgttgag	540
acggtccagg ggctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgaccccc ggagcagggtg	600
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg	660
ccggtgttgtt gccaggccca cggcttgacc ccccaggcagg tggtgccat cgccagcaat	720
ggcggtgca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tggcggtgt gtgcaggccc	780
cacggcttga ccccgagca ggtggtgcc atcgccagcc acgtggcgac caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggtt gttggccagg ctgtggccagg cccacggctt gaccccccag	900
cagggttgttgg ccatcgccag caatggcggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccccc agcagggttgtt ggccatcgcc	1020
agcaataatg gtggcaagca ggccgtggag acggccaggc ggctgttgcc ggtgtgtgc	1080
caggcccacg gcttgaccccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtgcaag	1140
caggcgctgg agacggtgca ggccgtgtt ccgggtgtgtt ggccaggccc cggcttgacc	1200
cccccaggcagg tggtgccat cgccagcaat ggccgtggca agcaggcgct ggagacggtc	1260
cagcggtgt tgccgggtgt gtggccaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc	1320
atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttggccgtt	1380
ctgtggccagg cccacggctt gaccccgagg cagggttgttgg ccatcgccag caatattgt	1440
ggcaaggcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgaccccg agcagggttgtt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggccgtggag	1560
acggtgccagg cgctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgaccccc ccaggcagggt	1620
gtggccatcg ccagcaataa tggtgcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	1680
ccgggtgtgtt gccaggccca cggcttgacc cggaggcagg tggtgccat cgccagccac	1740
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtgt gtgcaggccc	1800
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtt gttggccgtt ctgtggccagg cccacggctt gaccccccag	1920
cagggttgttgg ccatcgccag caatggcggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg	1980

ctgttgcgg tgctgtgcc a gcccacggc ttgaccctc agcaggttgt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggctggag agcattgtg cccagtata tcgcctgat	2100
ccggcgttgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcgtgcct tggcctgcct cggccggcgt	2160
cctgcgtgg atgcagtgaa aaaggattt gggatccta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280
gagttacatcg agctgatcga gatcgccgg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aagggtatgg agttttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggccgtcc	2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggttacaac ctgcctatcg gccaggccga cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtgggttggaa	2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttccgttgc tggccggcca cttcaaggc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgt	2700
tccgtggagg agtcttcat cggccggcag atgatcaagg cggcacctt gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814
<210> 24	
<211> 2832	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> GReX3T4-R TALEN

<400> 24

atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgataagg agaccggcc tgccaaatcc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cggtcgacag tggcgacca ccacgaggca	180
ctggcgcc acgggtttac acacgcgcac atcggtcgat taagccaa cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgac cggtgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgctgg caaacagtgg tccggcgac ggcctctgga ggccttgctc	360

acgggtggcg gagagtttag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgc当地aaac gtggcgccgt gaccgcgtg gaggcgtgc atgcgtggcg caatgcactg	480
acgggtggcc cgctcaactt gaccccccac caggtggcgg ccacgcgtcc caatggcggt	540
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg gtttgcgg tgctgtgcca ggccacggc	600
ttgaccccg agcaggttgtt ggccatcgcc agccacgtg gggcaagca ggcgtggag	660

acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc cagggccacg gcttgacccc ggagcaggtg	720
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg	780
ccgggtctgt gccaggccca cggcttgacc cggaggcagg tggtgccat cgccagcaat	840
attggtgca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccgtgtc gtgccaggcc	900
cacggcttga ccccgagca ggtggtgcc atcgccagcc acatggcgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggtc ttggccgtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag	1020
caggtggtgg ccatcgccag caatattgtt ggcaaggcagg cgctggagac ggtgcaggcg	1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccgg agcaggtggt ggccatgccc	1140
agcaatattt gtttcaagca ggccgtggag acggtgagg cgctgttgcc ggtgcgttgc	1200
cagggccacg gcttgacccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagaataa tggtgcaag	1260
caggcgctgg agacggtcca gcggtgttgc cgggtctgt gccaggccca cggcttgacc	1320
ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat ggccgtggca agcaggcgct ggagacggtc	1380
cagggctgt tgccgtgtc gtgccaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc	1440
atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtc ttggccgtg	1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccggag caggtggtgg ccatcgccag caatattgtt	1560
ggcaaggcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1620
ttgacccgg agcaggtggt ggccatgccc agcaatattt gtttcaagca ggccgtggag	1680
acgggtcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc cagggccacg gcttgacccc ccagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagaataa tggtgcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	1800
ccgggtctgt gccaggccca cggcttgacc cggaggcagg tggtgccat cgccagcaat	1860
attggtgca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccgtgtc gtgccaggcc	1920
cacggcttga ccccgagca ggtggtgcc atcgccagcc acatggcgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagcggtc ttggccgtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag	2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc	2100
cagtatctc gcccgtatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtgccttc	2160
gcctgcctcg gggggcgtcc tgcgtggat gcagtggaaa agggatggg ggtatctatc	2220
agccgttccc agctggtaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tggccacga gtacatcgag ctgtcgaga tcgccccggaa cagcacccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacagggc	2400

aagcacctgg	gcccgtccag	gaagccccac	ggcgccatct	acaccgtgg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccatcgcc	2520
cagggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaagg	gtacccctcc	agcgtgaccc	agttaagtt	cctgttcgt	2640
tccggccact	tcaaggccaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gccccgagat	gatcaaggcc	2760
ggcacccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttaacaca	acggcgagat	caacttcgct	2820
gccgactgat	aa					2832
<210>	25					
<211>	2814					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	GReX5T1-L TALEN					
<400>	25					
atggcgcata	ctaaaaagaa	acgttaaggc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgcccata	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcggtcgac	agtggcgcag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggtt	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgtagggac	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	acgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgtc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgcctcg	gaggccttgc	tcacggtg	gggagagtt	360
agagggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcgcc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcattg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgctcaac	480
ttgacccccc	agcaggttgt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgcgtgc	caggccccac	gcttgacccc	ccagcagggt	600
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gccccgttt	660
ccggtgtgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	720
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggc	cagcggctgt	tgccgggt	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccccagca	ggtgtggcc	atcgccagca	ataatggtg	caaggcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgcgggt	ctgtgcagg	cccacggctt	gaccccccag	900
cagggttgtt	ccatcgccag	aatggcggt	ggcaaggcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgttgtgcca	ggcccacggc	ttgacccgg	agcagggtgt	ggccatcgcc	1020

agccacgatg gcgcaagca ggctggag acggccagc ggctgtgcc ggtgtgtgc	1080
caggcccacg gctgacccggagcaggatgttggccatcg ccagcaataatggtaaa	1140
caggcgctgg agacggtgca ggctgttg ccggctgtgt gccaggccca cgcttgacc	1200
ccggaggcagg tgggtggccat cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc	1260
cagcggtgt tgccggctgt gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtgcc	1320
atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcgct gttggcggtg	1380
ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc	1500
ttgacccccc agcaggtgtt ggccatcgcc agcaatggcg tggcaagca ggctggag	1560
acggccatcg ggctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gttgacccccc ccagcagggt	1620
gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	1680
ccggcgctgtt gccaggccca cggcttgacc ccccgagg tggtgccat cgccagcaat	1740
aatggtgca agcaggcgct ggagacggc cagcggtgt tgccggctgt gtgccaggcc	1800
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atcgccagca ataattgggtt caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcgctt gttggcggtg ctgttgccagg cccacggctt gacccggag	1920
cagggtggtgg ccatcgccag caatattggt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg	1980
ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc ttgaccccttc agcaggtgtt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc ggctggag agcattgttgc cccagtata tcggccatgtat	2100
ccggcgctgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcgtgcct tggctgcct cgggggggt	2160
cctgcgtgg atgcagtgaa aaaggatttggggatctta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280
gagtagatcg agctgatcg gatcgcccg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aaggtagatgg agttttcat gaagggtgtac ggctacaggg gcaagcacctt gggggctcc	2400
aggaagcccg acggccatctacaccgtggctccca tcgactacgg cgtgtatcg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcctatcg gccaggccga cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtgaaag	2580
gtgtacccctt ccagcggtac cgagttcaag ttccgttgc tgccggccatcgatcg	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cggcgctgt	2700
tccgtggagg agtcctgtat cggcggcgatgatcaagg ccggcacctt 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

atggcgcata ctaaaaagaa acgttaaggc atcgataagg agaccggc tgccaagt	60
gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctc gg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagg tt cggtcgacag tggcgacag ccacgaggca	180
ctggtcggcc acgggttac acacgcgeac atcggtcgat taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgac cgttgccaga ggcgacacac	300

gaagcgcata ttggcgtcgg caaacatgg tccggcgac ggcgcgttgc ggccttgc	360
acggtgtggc gagagtttag aggtccaccc ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcacaaac gtggcggcgt gaccgcgtg gaggcagtgc atgcattggc caatgcactg	480
acgggtggcc cgcgtcaactt gacccggag cagggtggcc ccatcgccag caatattgg	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcc ggcacggc	600
ttgacccccc agcagggtgtt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgttggag	660
acgggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgcaccc ggagcagg	720

gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	780
ccgggtgtgt gccaggcccc caaggcttgacc ccggaggcagg tggtgccat cgccagccac	840
gatggcggca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccgtgt tgccaggcc	900
cacggcttga ccccccagca ggtgtggcc atgcacca atggcgttgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggct gttggcgttgc ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag	1020
caggtggtgg ccatcgccag caataatgtt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg tgctgtgcc ggcacggc ttgacccgg agcagggtgtt ggccatcgcc	1140

agccacgatg gcccacgca ggccgtggag acgggtccacg ggctgttgcc ggtgtgtgc	1200
caggcccacg gtttgcaccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagcaat tggtgccag	1260
caggcgctgg agacggtgca ggccgtgttgc cgggtgtgt tgccaggccca cggcttgacc	1320
ccccacggcagg tggtgccat cgccagcaat ggccgtggca agcaggcgct ggagacggc	1380
caggcgctgt tgccgtgt tgccaggcc cacggcttga cccggagca ggtggtggcc	1440

atgcccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccgtg	1500
ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag caggtggtgg ccatgccag caatggcggt	1560
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1620
ttgaccccg agcaggtggt ggcacatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag	1680
acggtcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggccccacg gttgaccccg ggagcagggt	1740
gtggccatcg ccagcaatat tggtgtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg	1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cggagcagg ttgtggccat cgccagccac	1860
gatggcggca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccggtgct gtgcaggcc	1920
cacggctga cccggagca ggtggtggcc atgccagca atattggtgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tgcaggcgct ttggccgtg ctgtgccagg cccacggctt gaccctcag	2040
caggtggtgg ccatgccag caatggcgcc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc	2100
cagtatactc gcctgatcc ggcttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtgccttg	2160
gcctgcctcg gggcgctcc tgcgctggat gcagtaaaa agggattggg ggatcctatc	2220
agccgttccc agctggtaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgccccgaa cagcacccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacagggc	2400
aagcacctgg gggctccag gaagccgcac ggcgcacatct acaccgtgg ctccccatc	2460
gactacggcg tgcgttggca caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccacggc	2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaagggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgt	2640
tccggccact tcaaggccaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctccgtatcg gggcgagat gatcaaggcc	2760
ggcacccatcg ccctggagga ggtgaggagg aagtcaaca acggcgagat caacttcg	2820
gccgactgat aa	2832
<210> 27	
<211> 2814	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GReX5T2-L TALEN	
<400> 27	
atgggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttcgttgcac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggtt	180
acacacgcgc acatcggtgc gtttaagccaa cacccggcag cgtagggac cgtcgctgtc	240
aagtatcagg acatgatcgc agcggtgccaa gaggcgacac acgaagcgat cgttggcg	300
gcgaaacagt ggtccggcgc acgcgctgtc gaggccttc tcacgggtgc gggagagt	360
agagggtccac cgttacagtt ggacacagggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatttgc cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgaccccg agcaggttgtt ggccatcgcc agcaatattt gtggcaagca ggcgttgag	540
acgggtgcagg cgctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggt	600
gtggccatcg ccagcaatgg cggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	660
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtgccat cgccagcaat	720
aatggtgca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccgggtct gtgcgcaggcc	780
cacggcttga ccccgagca ggtggtgcc atgcgcagca atattggtg caagcaggcg	840
ctggagacgg tgcaggcgct gttggcggt ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag	900
caggtggtgtt ccatcgccag caatggcggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggttgtt ggccatcgcc	1020
agcaatattt gtggcaagca ggcgttgag acgggtgcagg cgctgttgcc ggtgtgtgc	1080
caggcccacg gcttgacccc ccagcagggt gttggccatcg ccagcaataa tggtgcaag	1140
caggcgctgg agacggtcca gggctgttg cgggtgtgt gcccggccca cggcttgacc	1200
ccggagcagg tggtgccat cggcagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggc	1260
cagcggctgt tgccgggtct gtggcaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc	1320
atgcgcagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagggct gttggcggt	1380
ctgttgccagg cccacggctt gaccccgag cagggtgggtt ccatcgccag ccacgatggc	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgacccccc agcaggttgtt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgttgag	1560
acgggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcagggt	1620
gtggccatcg ccagcaataa tggtgcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	1680
ccgggtgtgt gcccggccca cggcttgacc cccagcagg tggtgccat cggcagcaat	1740
ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccgggtct gtgcgcaggcc	1800
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atgcgcagca atggcggtgg caagcaggcg	1860

ctggagacgg tccagcggct gttgccggc ctgtgccagg cccacggctt gaccggag	1920
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1980
ctgtgccgg tgcgtgcca gccccacggc ttgaccctc agcaggttgt ggccatgcc	2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgtg cccagttatc tcgcccgtat	2100
ccggcgttgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcgtgcct tggcctgcct cggcggcgt	2160
cctgcgctgg atgcagtgaa aaaggattt ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280
gagtacatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aagggtgatgg agttttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtcc	2400
aggaagcccg acggccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgt	2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccattcg gccaggccga cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaa	2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttccctgtcg tgtccggcca cttcaaggc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgt	2700
tccgtggagg agtccctgat cggccggcag atgatcaagg ccggcacctt gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814
<210> 28	
<211> 2832	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GReX5T2-R TALEN	
<400> 28	
atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggta atcgataagg agaccggcc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca	180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtcgat taagccaaca cccggcagcg	240
tttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgacatcg cgttgccaga ggcgcacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcgaa caaacagtgg tccggcgcac ggcgtctgg ggccttgctc	360
acggtgtggcgg gagagtttag aggtccaccc ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcgtg gaggcgtgc atgcgtggcgt caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	540

ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg ctgtgccgg tgctgtgccca ggcccacggc	600
ttgaccggcgg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag	660
acgggtcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	720
gtggccatcg ccagcaataa tggtgtggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	780
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc cgggaggcagg tggtgccat cgccagccac	840
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc	900
cacggcttga cccccagca ggtggtgccat atcgccagca ataattgtgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggtc gttggccgtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag	1020
cagggtggtgg ccatcgccag caatggcggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg	1080
ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc ttgaccggcgg agcaggtggt ggccatcgcc	1140
agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag acgggtcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc	1200
caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tggtgtggcaag	1260
caggcgctgg agacggtcca cgggctgttg cgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc	1320
ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat ggccggccaa agcaggcgct ggagacggtc	1380
cagcggtgt tgccgggtc gtggccaggcc cacggcttga cccggagca ggtggtgcc	1440
atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcgg ctggagacgg tccagcggtc gttggccgtg	1500
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgagg cagggtggc ccatcgccag caatattgtt	1560
ggcaaggcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc	1620
ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag	1680
acgggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagcaataa tggtgtggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	1800
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc cgggaggcagg tggtgccat cgccagcaat	1860
attggtgccca agcaggcgct ggagacggcgt caggcgctgt tgccgggtc gtggccaggcc	1920
cacggcttga cccccagca ggtggtgccat atgcccagca atggcggtgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagcggtc gttggccgtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag	2040
cagggtggc ccatcgccag caatggcgcc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc	2100
cagtatctc gcccgtatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcccttgc	2160
gcctgcctcg gggggcggtcc tgcgtggat gcagtggaaaa agggattggg ggatccatc	2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280

ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcacccag	2340
gaccgttatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacagggc	2400
aagcacctgg gcccgtccag gaagccgcac ggcccatct acaccgtgg ctccccatc	2460
gactacggcg ttagtcttggca caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gccatcgcc	2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggttggaaagggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgt	2640
tccggccact tcaaggccaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctccgtatcg gcggcgagat gatcaaggcc	2760
ggcacccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttaacaaca acggcgagat caacttcg	2820
gccgactgat aa	2832
<210> 29	
<211> 2814	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GReX5T3-L TALEN	
<400> 29	
atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgcccgtatc acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttcttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggcgg ccacgggtt	180
acacacgcgc acatcggtgc gttaagccaa cacccggcag cgtagggac cgtcgtgtc	240
aagtagatcagg acatgatcgac agcggtgcca gagggcgcac acgaagcgat cggtggcgtc	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgtctg gaggccttgc tacgggtggc gggagagtt	360
agaggccac cgttacagtt ggacacaggg caacttctca agattgcaaa acgtggcggc	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgacccccc agcaggttgtt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag	540
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtc cagggccacg gttgacccccc ggagcaggtg	600
gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgtgtt	660
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc ccccgagg tggtgccat cgccagcaat	720
ggcggtggca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccgtgtc gtgcaggcc	780
cacggcttga ccccgaggca ggtgggtggcc atcgccagca atattggtg caagcaggcg	840
ctggagacgg tgcaggcgct gttggcggtc ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag	900

caggtggcgg ccatcgccag caatggcggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg	960
ctgttgccgg tgcgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatgcc	1020
agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag acggccagc ggctgtgcc ggtgtgtgc	1080
caggccccacg gcttgcaccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggccggcaag	1140
caggcgctgg agacggtcca gcggctgtt ccggctgtgt gccaggccca cgccgttacc	1200
ccggagcagg tggtgccat cgccagcaat attggtgca agcagggcgt ggagacggtg	1260
caggcgctgt tgccgggtct gtgcaggcc cacggctta ccccccagca ggtggtgcc	1320
atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagggcgt gttggccgtg	1380
ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	1440
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc	1500
ttgacccccgg agcaggtggt ggccatgccca agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag	1560
acgggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggccccacg gcttgcaccc ccagcaggtg	1620
gtggccatcg ccagcaatgg cggtgcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg	1680
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc ccggaggcagg tggtgccat cgccagcaat	1740
attggtgca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccgggtct gtgcaggcc	1800
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atcgccagca atggcgggtgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagggcgt ttggccgtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag	1920
caggtggcgg ccatcgccag caataatggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc ttgacccttc agcaggtggt ggccatgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc ggcgctggag agcattgtt cccagttatc tcggccgtat	2100
ccggcggtgg ccccggttac caacgaccac ctgtcgctt tggccgtcc cggccggcg	2160
cctgcgtgg atgcagtcaa aaaggattt gggatccta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280
gagtagacatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aagggtatgg agttttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaaggcacct gggccggctcc	2400
aggaagcccg acggccat ctacaccgtg ggctccccc tgcgtacgg cgtgtatcg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccattcg gccaggccga cgaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaa	2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttccctgttc tgccggcca cttcaaggc	2640

aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tccgtggagg agtcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccc gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagtcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814
<210> 30	
<211> 2832	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GReX5T3-R TALEN	
<400> 30	
atggcgcata ctaaaaagaa acgttaaggta atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca	180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtcgta taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgtgtcaa gtatcaggac atgatcgacg cggtgcaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgccttgaa ggccttgctc	360
acggtgtggcg gagagtttag aggtccaccc ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgc当地ac gtggcggcgt gaccgcgtg gaggcagtgc atgc当地ggc caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccccag caggtggtagg ccatcgccag caataatgg	540
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggc当地acggc	600
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggc当地ctggag	660
acgggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggccccacg gcttgacccccc ccagcagggtg	720
gtggccatcg ccagcaatgg cggtagcaag caggcgtcgg agacggtcca gggctgttg	780
ccgggtgtgt gccaggccccca cggcttgacc cggaggcagg tggtagccat cgccaggcac	840
gatggcggca agcaggcgt ggagacggcgt cagcggctgt tgccggctgt gtggcaggcc	900
cacggcttga ccccgagca ggtggtagcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcgg	960
ctggagacgg tccagcggct gttggccgtg ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag	1020
caggtggtagg ccatcgccag caatggcggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggc当地acggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc	1140
agccacgatg gccc当地acggca agcggctggag acgggtccacg ggctgttgcc ggtgctgtgc	1200
caggccccacg gcttgaccccg ggagcaggtagt gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag	1260
caggcgtgg agacggtcca gccc当地acggc ttgctgtgcca cggcttgacc	1320

ccggaggcagg tggtgccat cgccagcaat attggggca agcaggcgct ggagacggtg	1380
caggcgctgt tgccgggtgt gtgccaggcc cacggcttga cccggagca ggtggggcc	1440
atcgccagca atattgggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttggcggtg	1500
ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag caggtgggtgg ccatcgccag caataatgg	1560
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg ctgtggccgg tgctgtgccca ggccacggc	1620
ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag	1680
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagcaatgg cggtgtggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	1800
ccggtgtgtgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtgccat cgccagcaat	1860
aatggtgca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtgt gtgccaggcc	1920
cacggcttga cccggagca ggtgggtggcc atcgccagca atattgggtgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tcgaggcgct ttggccggtg ctgtggcagg cccacggctt gacccctcag	2040
caggtgggtgg ccatcgccag caatggcgcc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc	2100
cagttatctc gcccgtatcc ggcgttgcc gcgttgacca acgaccacct cgtgccttg	2160
gcctgcctcg gccccgtcc tgcgtggat gcagtgaaaa agggattggg ggatcctatc	2220
agccgttccc agctggtaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tgcggggaa cagcacccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacagggc	2400
aagcacctgg gccccgtccag gaagccgcac ggcgcacatc acaccgtgg ctccccatc	2460
gactacggcg tgcgtggat caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccgtggc	2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaagggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgt	2640
tccggccact tcaaggcaaa ctacaaggcc cagcttgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg ccgtgtgtc cgtggaggag ctccgtatcg gccccggat gatcaaggcc	2760
ggcacccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttaaca acggcgagat caacttcg	2820
ggcgactgtaa	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  
ccatctcatc cctgcgtgta tccgactcg nnnnnnnnnn ggttcatat 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  
ccatctcatc cctgcgtgta tccgactcg 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  
ccatctcatc cctgcgtgta tccgactcg nnnnnnnnnn tcagcaggcc actacaggag 60  
tctcacaag 69  
<210> 34  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Reverse primer GR exon 2

<400>	34					
cctatccct	gtgtgccttg	gcagtctcag	agccagttag	ggtaagacg	50	
<210>	35					
<211>	50					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Reverse primer GR exon 3					
<400>	35					
cctatccct	gtgtgccttg	gcagtctcag	ggccttgca	tataatggaa	50	
<210>	36					
<211>	59					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Reverse primer GR exon 5					
<400>	36					
cctatccct	gtgtgccttg	gcagtctcag	ctgactctcc	cttcatagt	ccccagaac	59
<210>	37					
<211>	49					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	TRAC_T01					
<400>	37					
ttgtccaca	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

ttcccacccg aggtcgctgt gttttagcca tcagaaggcag agatctccca 50

<210> 40

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD52\_T02

<400> 40

tccctctac tcaccatcg ctcctgggt atggcacagg 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 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
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
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
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 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 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
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
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 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
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 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 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 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 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 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 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
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 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
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
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
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 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
Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser 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 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 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 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 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
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
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
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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser 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 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 Lys		
1	5	10
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
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 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
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 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
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
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 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 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
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 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
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 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 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
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 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 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

atggcgcataaaaaagaa acgttaaggta atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgcccatacgtac ggcgtacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttcttcgac agtggcgac caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt	180
acacacgcgc acatcggtgc gttaagccaa caccggcag cgtagggac cgctcgctgc	240
aagtatcagg acatgatcgac agcggtgcga gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgtctg gaggccttgc tcacggtgtc gggagagttt	360
agaggtccac cgttacagtt ggacacaggg caacttctca agattgcaaa acgtggcgcc	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcattt cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
tttgcacccccc agcaggttggtt ggcattcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgttggag	540
acggttccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggeccacg gtttgcaccc ccagcagggtt	600
gtggccatcg ccagcaataa tggggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	660
ccgggtgtgt gccaggcccc cggcttgacc ccccagcagg tggggccat cgccagcaat	720
ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtc tgccaggcc	780
cacggcttga ccccgaggca ggtggggcc atgcggccac acgtggcgga caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagggct gttggccgtc ctgtggccagg cccacggctt gacccggag	900
cagggtggcc ccatcgccag ccacgtggc ggcaaggagg cgctggagac ggtccaggcg	960
ctgttgccgg tgcgtgtccca ggccccacggc ttgacccgg agcaggttggtt ggccatcgcc	1020
agccacgatg gggcaagca ggccgtggag acggccacg ggctgttgcc ggtgtgtgc	1080
caggccccacg gtttgcaccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagcaat tggggcaag	1140
caggcgctgg agacgggtca ggccgtgtt ccggctgtgt gccaggcccc cggcttgacc	1200
ccggaggcagg tggggccat cgccaggcac gatggggca agcaggcgct ggagacggtc	1260
caggcgctgt tgccgggtc tgccaggcc cacggcttga cccggaggca ggtggggcc	1320
atgcggccac atattgggtt caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttggccgtt	1380
ctgtggccagg cccacggctt gacccggctt cagggtggcc ccatcgccag caataatggt	1440
ggcaaggagg cgctggagac ggtccaggcg ctgtggccgg tgctgtgcc ggcggccacggc	1500

ttgaccccg	agcaggttgtt	ggccatcgcc	agcaatattt	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acgggtgcagg	cgcgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacc	ccagcagg	1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtgttgc	caggcgctgg	agacggtcca	gcggctgtt	1680
ccgggtgtgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1740
atttgtggca	agcaggcgct	ggagacggtg	caggcgctgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggt	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg	tgcgtgtcca	ggcccacggc	ttgacccttc	agcaggttgtt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gccccaggcc	ggcgctggag	agcattgttgc	ccagttatc	tcggccgtat	2100
ccggcggttgg	cccggttgac	caacgaccac	ctcgctcgct	tggcctgcct	cgccggcggt	2160
cctgcgctgg	atgcagtgaa	aaaggattt	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtccccac	2280
gagtagatcg	agctgatcg	gatcgcccg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aagggtatgg	agtcttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	ggcgccgtcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccca	tcgactacgg	cgtgatcg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggttacaac	ctgcccattcg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaa	2580
gtgtaccctt	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttgc	tgtccggcca	cttcaaggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgt	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cgccggcgag	atgatcaagg	ccggcacccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttgc	cgcccgactg	ataa	2814
<210>	50					
<211>	2832					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	TRAC_T01-R TALEN					
<400>	50					
atggcgtatc	ctaaaaagaa	acgttaagg	atcgataagg	agaccggccgc	tgcggat	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatc	gccgatctac	gcacgctcg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagg	cgttcgacag	tggcgcagca	ccacgaggca	180

ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtcgta taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggacc tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgacg cggtgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcgaa caaacagtgg tccggcgcac gcgccttgaa ggccttgctc	360
acggtggcg gagagttag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcattggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	600
ttgacccccc agcaggttgt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgtggag	660
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg	720
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgttgg agacggtcca gggctgttg	780
ccggtgttgtt gcaaggccca cggcttgacc cgggagcagg tggtgccat cgccagcaat	840
attggtgca agcaggcgct ggagacggtg caggcgttgt tgccgtgtc gtgcaggcc	900
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggct gttggcggtg ctgtgcccagg cccacggctt gaccccgag	1020
caggtggtgtt ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcg	1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggccacggc ttgacccccc agcaggttgtt ggccatcgcc	1140
agcaatggcg gtggcaagca ggctgtggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc	1200
caggcccacg gcttgacccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaataa tggtgcaag	1260
caggcgttgtt agacggtcca ggctgttgtt ccggcgttgtt gccaggccca cggcttgacc	1320
ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat aatggtgca agcaggcgct ggagacggc	1380
cagcggctgt tgccgggtct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc	1440
atcgccagca atggcggtgtt caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttggcggtg	1500
ctgttgccagg cccacggctt gaccccgag cagggttgtt ccatcgccag caatatttgtt	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1620
ttgacccccc agcaggttgtt ggccatcgcc agccacgatg gggcaagca ggcgtggag	1680
acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg	1740
gtggccatcg ccagcaatat tggtgcaag caggcgttgtt agacggtgca ggcgttgtt	1800
ccgggtgtgtt gccaggccca cggcttgacc cgggaggcagg tggtgccat cgccagccac	1860
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtct gtgcaggcc	1920
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagcggct gttggcggtg ctgtgcccagg cccacggctt gacccctcag	2040

caggtggc	ccatcgccag	aatggcggc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattttgc	2100
cagtatctc	gccctgatcc	ggcggtggcc	gcgttgacca	acgaccac	cgtcgcc	2160
gcctgcctcg	gccccgtcc	tgcgctggat	gcagtgaaaa	aggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtac	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgccccgaa	cagcacccag	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacagggc	2400
aagcacctgg	gccccgtccag	gaagccgcac	ggcgcacatct	acaccgtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccatcg	2520
cagggcgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgt	2640
tccggccact	tcaaggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctg	cgtggaggag	ctcctgatcg	gccccgagat	gatcaaggcc	2760
ggcacccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagtcaaca	acggcgagat	caacttcg	2820
gccgactgat	aa					2832
<210>	51					
<211>	2814					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	TRBC_T01-L TALEN					
<400>	51					
atggcgcata	ctaaaaagaa	acgttaaggc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcggcgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcggtcgac	agtggcgac	caccacgagg	cactggcg	ccacgggtt	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgttagggac	cgtcgctg	240
aagtatcagg	acatgatcg	acgttgtcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcg	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgtctg	gaggcctgc	tcacggtg	gggagagtt	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcg	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatt	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgctcaac	480
ttgacccccc	agcaggtgg	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctgg	540
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccac	gcttgacccc	ccagcagg	600
gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gccccgttt	660

ccgggtgtgt gcccggccca cggcttgacc ccccaaggagg tggggccat cgccagcaat	720
aatggggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggctgt gtgcaggcc	780
cacggcttga cccccagca ggtggtgcc atgccagca atggcggtgg caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggtc ttggccggc ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag	900
cagggtgggg ccatcgccag caatggcggt ggcaaggagg cgctggagac ggtccagcg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc	1020
agcaatggcg gtggcaagca ggccgtggag acgggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc	1080
caggcccacg gcttgacccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaataa tggggcaag	1140
caggcgctgg agacggtcca ggccgtgttg ccgggtgtgt gcccggccca cggctigacc	1200
ccggagcagg tggggccat cgccagcaat attggggca agcaggcgct ggagacggtg	1260
caggcgctgt tgccgggtgt gtggccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtgcc	1320
atcggccagca ataatgggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtc gttggccgg	1380
ctgtggcagg cccacggctt gaccccgag cagggtgggg ccatcgccag ccacgtggc	1440
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg ggcttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgaccccgag acgaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gggcaagca ggcgtggag	1560
acgggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggeccacg gttgacccc ggagcagggtg	1620
gtggccatcg ccagcaatat tggggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgtgttg	1680
ccgggtgtgt gcccggccca cggcttgacc ccccaaggagg tggggccat cgccagcaat	1740
ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggctgt gtgcaggcc	1800
cacggcttga cccccggagca ggtggtgcc atcgccagcc acgtggcgca agcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtc ttggccggc ctgtggcagg cccacggctt gaccccgag	1920
cagggtgggg ccatcgccag caatattggt ggcaaggagg cgctggagac ggtggaggcg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc ggcgtggag agcattgttg ccagttatc tcggccat	2100
ccggcggtgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcgtcgct tggcctgcct cggcggcg	2160
cctgcgtgg atcagtggaa aaagggttg ggggatccat ttagccgttc ccagctgggt	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280
gagtcacatcg agtcgtatcgat gatcgccgg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aagggtatgg agttttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaaggcacct gggcggtcc	2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgtatcg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggttacaac ctggccatcg gccaggccga cgaaatgcag	2520

aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	acccaacgaa	gtggtgaa	2580
gtgtaccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaaggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcggcgag	atgatcaagg	ccggcaccc	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					
atggcgate	ctaaaaagaa	acgttaaggc	atcgataagg	agaccggcc	tgccaagt	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatc	gccgatctac	gcacgctcg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagg	ttcgacag	tggcgcagca	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggtcg	taagccaaca	cccggcagcg	240
tttagggaccg	tgcgtgtcaa	gtatcaggac	atgatcgac	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcg	caaacagtgg	tccggcgcac	gcgccttgaa	ggccttgctc	360
acggtggcgg	gagagttag	aggtaaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgc当地	gtggcggcgt	gaccgcgt	gaggcagtgc	atgcattggc	aatgcactg	480
acgggtgccc	cgtcaactt	gacccccc	cagggtgg	ccatcgcc	caataatgg	540
ggcaaggcagg	cgtggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccacggc	600
ttgacccccc	agcaggttgt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgttgag	660
acggtccagc	ggcgttgcc	ggtctgtgc	caggcccacg	gtttgacccc	ccagcagg	720
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtgccag	caggcgtgg	agacggtcca	ggggctgttg	780
ccgggtgtgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	840
aatggtgca	agcaggcgct	ggagacggc	cagcggctgt	tggccgtgt	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtgcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggct	gttgcggtg	ctgtgcagg	cccacggctt	gacccggag	1020
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgtggc	ggcaaggcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg	tgcgtgtcca	ggcccacggc	ttgacccccc	agcaggttgt	ggccatcgcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgtgtgc	1200

caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	1260
caggcgctgg	agacggtcca	gcggctgttgc	ccgggtctgt	gccaggcccc	cggtttgacc	1320
ccccagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1380
cagcggtgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtgcc	1440
atcggccagca	atggcggtgg	aaagcaggcg	ctggagacgg	tccagcgct	gttgcgggt	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatgg	1560
ggcaagcagg	cgttgagac	ggtccagcg	ctgttgccgg	tgctgtgcc	ggcccacggc	1620
ttgacccccc	agcaggtgtt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgtggag	1680
acggtccagg	ggcgttgcc	ggtgcgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcagggt	1740
gtggccatcg	ccagaataaa	tggtgccag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgttgtt	1800
ccgggtgtgt	gccaggcccc	cggttgacc	ccccagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	1860
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtgcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcgct	ttgcccgg	ctgtgcagg	ccacggctt	gaccctcag	2040
caggtggtgg	ccatcgccag	aatggcggc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagtatctc	gccctgatcc	ggcgttgcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtgccttg	2160
gcctgcctcg	gccccgtcc	tgcgtggat	gcagtgaaaa	aggatgggg	ggatccatc	2220
agccgttccc	agctggtaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgcggcacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tgcggcgaa	cagcacccag	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcccgtccag	gaagcccgac	ggcgcctact	acaccgtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgtatcggtt	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccatcgcc	2520
caggcccacg	aaaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agtcaagtt	cctgttcgt	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	cctgtgtgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gccccgagat	gatcaaggcc	2760
ggcacccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagtcaaca	acggcgagat	caacttcgct	2820
gccgactgtat	aa					2832
<210>	53					
<211>	2814					
<212>	DNA					

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; TRBC\_T02-L TALEN

&lt;400&gt; 53

atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgcccgcatac acgcacgcgc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttgcgttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt	180
acacacgcgc acatcggttc gttaaagccaa caccggcag cgtagggac cgtcgcgttc	240
aagtatcagg acatgatcgc acgttgtcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgccttg gaggccttgc tacacggtggc gggagagtgg	360
agaggtccac cgttacagtt ggacacagggc caacttctca agattgcaaa acgtggcgcc	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcattgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgaccggcgg acgagggtggt ggccatcgcc agccacgtg gggcaagca ggcgcgtggag	540
acgggtccagg ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgaccccc ggagcagggtg	600
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gggcgttttgc	660
ccgggtgtgtt gccaggccca cggcttgacc cgggagcagg tggtgccat cgccagccac	720
gatggcggca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccgggtgt gtggcaggcc	780
cacggcttga ccccgagca ggtggtgccat atcgccagca atattgggtgg caagcaggcg	840
ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag	900
cagggtggccat ccatcgccag ccacgtggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcg	960
ctgtgccgg tgctgtgcca gggccacggc ttgacccggg agcagggtggt ggccatcgcc	1020
agccacgtg gggcaagca gggcgtggag acgggtccacg ggctgttgcc ggtgctgtgc	1080
caggcccacg gcttgaccccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag	1140
caggcgctgg agacggtcca gggcgttttgc cgggtgtgt ggcaggccca cggcttgc	1200
ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat aatggtgccaa acgaggcgct ggagacggc	1260
cagcggctgt tgccgggtgt gtggcaggcc cacggcttga cccggagca ggtggtgcc	1320
atcgccagca atattgggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg	1380
ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag cagggtggccatcg ccacgtggccag caataatgg	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcg ctgtgccgg tgctgtgcca gggccacggc	1500
ttgacccccc agcagggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgtggag	1560
acgggtccagg ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgaccccc ccagcagggtg	1620

gtggccatcg ccagcaatgg cggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg 1680

ccgggtgtgt gccaggcccc caaggcttgacc ccggagcagg tggtgccat cgccagccac 1740

gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgtgt gtgcaggcc 1800

cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atgccagca ataatggtgg caagcaggcg 1860

ctggagacgg tccagcggct gttggcggt ctgtggcagg cccacggctt gacccggag 1920

caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg 1980

ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccctc agcaggtggt ggccatgccc 2040

agcaatggcg gcggcaggcc ggccgtggag agcattgttg cccagttatc tcgcccgtat 2100

ccggcggtgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcgtgcct tggctgcct cggcgccgt 2160

cctgcgtgg atgcgtgaa aaaggattt gggatcta tcagccgttc ccagctggtg 2220

aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac 2280

gagtagatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcaccc aggacctat cctggagatg 2340

aaggtagtgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtcc 2400

aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460

gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccattcg gccaggccga cgaaatgcag 2520

aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca acccaacga gtggtggaag 2580

gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttccgtttcg tgtccggcca cttcaaggcc 2640

aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cggcgctg 2700

tccgtggagg agctcctgat cggcgccgag atgatcaagg cggcacccct gaccctggag 2760

gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

<210> 54

<211> 2832

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TRBC\_T02-R TALEN

<400> 54

atgggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggta atcgataagg agaccggccgc tgccaagttc 60

gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120

cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cggtcgacag tggcgccagca ccacgaggca 180

ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtcgat taagccaaca cccggcagcg 240

ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgacat cgttgccaga ggcgacacac 300

gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgac gcgccttgaa ggccttgctc	360
acggtgtggcg gagagtttag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgc当地ac gtggcggcgt gaccgcagt gaggcagtgc atgc当地ggc caatgcactg	480
acgggtgcccg cgctcaactt gacccccccag caggtggtgg ccatgc当地gg caataatgg	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgtggcgg tgctgtgcca ggccc当地ggc	600
ttgaccccccc agcaggtggt ggccatgc当地c agcaataatg gtggcaagca ggccgtggag	660
acggtccagg ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcagg	720
gtggccatcg ccagcaataa tggtgcaag caggcgtgg agacggtcca ggccgtgttgc	780
cggtgttgtt gccaggccca cggcttgacc cggaggcagg tggtgccat cgccagcaat	840
attggtgca agcaggcgct ggagacggtg caggcgtgt tgccggtgct gtgc当地ggcc	900
cacggcttga cccccccagca ggtggtggcc atgc当地ggca ataatggtgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggct gttggcggtg ctgtggcagg cccacggctt gacccc当地ggag	1020
caggtggtgg ccatgc当地gg caatattggt ggcaagcagg cgctggagac ggtgc当地ggcg	1080
ctgtggcgg tgctgtgcca ggccc当地ggc ttgaccccccc agcaggtggt ggccatgc当地c	1140
agcaatggcg gtggcaagca ggccgtggag acggtccagg ggctgttgcc ggtgctgtgc	1200
caggcccacg gtttgacccc ggaggcagggt gttggccatcg ccagccacga tggc当地ggcaag	1260
caggcgtgg agacggtcca ggccgtgttg cgggtgtgt gccaggccca cggcttgc当地c	1320
ccccaggcagg tggtgccat cgccagcaat ggccgtggca agcaggcgct ggagacggc	1380
cagggctgt tgccgggtct gtgc当地ggcc cacggcttga cccggagca ggtggtggcc	1440
atgc当地ggcc acgatggcg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttggcggtg	1500
ctgtggcagg cccacggctt gacccccccag caggtggtgg ccatgc当地gg caatggcgg	1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgtggcgg tgctgtgcca ggccc当地ggc	1620
ttgaccccccc agcaggtggt ggccatgc当地c agcaataatg gtggcaagca ggccgtggag	1680
acggtccagg ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gtttgacccc ggaggcagg	1740
gtggccatcg ccagccacga tggc当地ggcaag caggcgtgg agacggtcca ggccgtgttg	1800
ccgggtgtgtt gccaggccca cggcttgacc cccaggcagg tggtgccat cgccagcaat	1860
ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggc cagggctgt tgccgggtct gtgc当地ggcc	1920
cacggcttga cccccccagca ggtggtggcc atgc当地ggca atggcggtg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagcggct gttggcggtg ctgtggcagg cccacggctt gacccc当地c	2040

caggtggcgg ccatcgccag caatggcgcc ggcaggccgg cgctggagag cattttgcc	2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcccttgc	2160
gcctgcctcg gccccgtcc tgcgtggat gcagtaaaa agggattggg ggatcctatc	2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgccccgaa cagcacccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgtatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacagggc	2400
aagcacctgg gccccctccag gaagccgcac ggcgcctatc acaccgtggg ctccccatc	2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatacg	2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaagggt gtacccctcc agcgtgaccc agttcaagtt cctttcg	2640
tccggccact tcaaggccaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg ccgtgtgtc cgtggaggag ctccgtatcg gccccgagat gatcaaggcc	2760
ggcacccctga cccgtggagga ggtgaggagg aagttaaca acggcgagat caacttcg	2820
gccgactgtat aa	2832
<210> 55	
<211> 2814	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD52\_T02-L TALEN

<400> 55

atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgccccatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgac caccacgagg cactggtcgg ccacgggtt	180
acacacgcgc acatcggtgc gttaagccaa cacccggcag cgtagggac cgtcgctgtc	240
aagtatcagg acatgatcgac acgttgtcca gagggcgacac acgaagcgat cgttggcg	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgtctg gaggccttgc tacgggtggc gggagatgg	360

agagggtccac cgttacagtt ggacacagggc caacttctca agattgcaaa acgtggcg	420
gtgaccgcgat tggaggcagt gcatgcattt cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgttggag	540
acgggtccacgc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggccacgc gcttgacccc ggagcaggt	600
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	660

ccgggtgtgt gcccggccca cggcttgacc ccggaggcagg tggggccat cgccagccac	720
gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgtgct gtgccaggcc	780
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atcgccagca atggcggtgt caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggct gttggcggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag	900
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccgg agcaggtggt ggccatcgcc	1020
agccacgatg gcccgaagca ggccgtggag acgggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc	1080
cagggccacg gcttgacccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaatgg cggtgcaag	1140
caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggctgtgt gccaggccca cggcttggacc	1200
ccggaggcagg tggggccat cgccagcaat attgggtggca agcaggcgct ggagacggtg	1260
caggcgctgt tgccgggtct gtggccaggcc cacggcttga cccggagca ggtggtgcc	1320
atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttggcggt	1380
ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt	1440
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgacccgg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcccgaagca ggcgtggag	1560
acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggeccacg gcttgacccc ggagcagggtg	1620
tgggccatcg ccagcaaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgtgttg	1680
ccgggtgtgt gcccggccca cggcttgacc ccggaggcagg tggggccat cgccagccac	1740
gatggcgcca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtct gtggccaggcc	1800
cacggcttga ccccgagca ggtggtgcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggct gttggcggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag	1920
caggtggtgg ccatcgccag caatattggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtgcaggcg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc ggcgtggag agcattgttg ccagtata tcggccgtat	2100
ccggcggtgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcgtgcct tggcctgcct cggcggcg	2160
cctgcgtgg atgcgtgaa aaaggattt gggatccat tgcgtgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280
gagtatcatcg agtgcgtgaa gatcgcccg aacagcaccc aggacccgtat cctggagatg	2340
aagggtatgg agttttcat gaagggtgtac ggctacaggc gcaagcacct gggcggtcc	2400

aggaagccg acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggttacaac ctgcccattcg gccaggccga cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtgaaag	2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttccctgttcg tgtccggcca cttcaaggc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tccgtggagg agtcctgat cggcggcgag atgatcaagg cggcaccct gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814
<210> 56	
<211> 2832	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD52\_T02-R TALEN

<400> 56

atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgataagg agaccggc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca ccacgaggca	180
ctggcgcc acgggtttac acacgcgcac atcggtcggt taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgacat cgttgcaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgctgg caaacagtgg tccggcgacac ggcgtctgg ggccttgtc	360

acgggtggcgg gagagtttag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaaac gtggcgccgt gaccgcgtg gaggcagtgc atgcattggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaacctt gaccccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgccca gggccacggc	600
ttgacccccc agcaggtgtt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgttggag	660
acggtccagg ggctgttgcc ggtgtgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcagggtg	720
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	780

ccgggtgtgt gccaggccccca cggcttgacc ccccgaggagg tggtgccat cgccagcaat	840
ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgtgt gtggcaggcc	900
cacggcttga ccccgaggca ggtggtggcc atcgccagcc acgtggcgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggtt gttggccgtg ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag	1020
caggtggtgg ccgtcgccag caatggcggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080

ctgtgtccgg tgctgtCCA ggcccacggc ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgCC	1140
agcaatggcg gtggcaagca ggCGCTGGAG acggTCCAGC ggCTGTGCC ggtGCTGTGC	1200
caggccccacg gcttgacccc ggAGCAGGTG GTGGCCATCG CCAGCAATAT TGGTGGCAAG	1260
caggCGCTGG AGACGGTGCA GGCGCTGTG CCGGTGCTGT GCCAGGCCA CGGCTTGACC	1320
ccggAGCAGG TGGTGGCCAT CGCCAGCCAC GATGGCGCA AGCAGGCGCT GGAGACGGTC	1380
cAGCGGCTGT TGCCGGTGTG GTGCCAGGCC ACAGGCTGA CCCGGAGCA GGTGGTGGCC	1440
ATCGCCAGCC ACATGGCGG CAAGCAGGC CTGGAGACGG TCCAGGGCT GTTGGCGTG	1500
CTGTGCCAGG CCCACGGCTT GACCCCCAG CAGGTGGTGG CCATCGCCAG CAATGGCGGT	1560
GGCAAGCAGG CGCTGGAGAC GGTCCAGCGG CTGTGCCGG TGTGTGCCA GGCCCACGGC	1620
ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgCC agcaataatG gtggcaagca ggCGCTGGAG	1680
acggTCCAGC GGCTGTGCC GGTGCTGTGC CAGGCCACG GCTTGACCCC CCAGCAGGTG	1740
GTGGCCATCG CCAGCAATGG CGGTGGCAAG CAGGCCTGG AGACGGTCCA GCGGCTGTG	1800
CCGGTGTGTG GCCAGGCCA CGGCTTGACC CGGGAGCAGG TGGTGGCCAT CGCCAGCAAT	1860
ATTGGTGGCA AGCAGGCGCT GGAGACGGTG CAGGCCTGTG TGCCGGTGT GTGCCAGGCC	1920
CACGCTTGA CCCGGAGCA GGTGGTGGCC ATCGCCAGCC ACATGGCGG CAAGCAGGCC	1980
CTGGAGACGG TCCAGGGCT GTTGGCGTG CTGTGCCAGG CCCACGGCTT GACCCCTAG	2040
caggTGGTGG CCATCGCCAG CAATGGCGG GGCAGGCCGG CGCTGGAGAG CATTGTGCC	2100
cagttatctc GCCCTGATCC GGCCTGGCC GCGTTGACCA ACGACCACCT CGTCGCCTG	2160
GCCTGCCTCG GCGGGCGTCC TCGCTGGAT GCAGTGAAGAA AGGGATTGGG GGATCCTATC	2220
AGCCGTTCCC AGCTGGTAA GTCCGAGCTG GAGGAGAAGA AATCCGAGTT GAGGCACAAG	2280
CTGAAGTAGC TGCCCCACGA GTACATCGAG CTGATCGAGA TCGCCCGAA CAGCACCCAG	2340
GACCGTATCC TGGAGATGAA GGTGATGGAG TTCTTCATGA AGGTGTACGG CTACAGGGC	2400
AAGCACCTGG GCGGCTCCAG GAAGCCCGAC GGCGCCATCT ACACCGTGGG CTCCCCATC	2460
gactacggcg tgategtgga caccaaggcc tactccggcg getacaacct gcccattggc	2520
caggcccacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtggaaagggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctttcggt	2640
tccggccact tcaaggccaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctccctgatcg gggcgagat gatcaaggcc	2760
ggcacccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttaacaaca acggcgagat caacttcgCG	2820

gccgactgat aa	2832
<210> 57	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TRAC_T02	
<400> 57	
ttagaaagt tcctgtgatg tcaagctggc cgagaaaagc tttgaaaca	49
<210> 58	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TRAC_T03	
<400> 58	
tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc gatttgatt ctaaacaa	49
<210> 59	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TRAC_T04	
<400> 59	
tatatacag acaaaactgt gctagacatg aggtctatgg acttcaaga	49
<210> 60	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TRAC_T05	
<400> 60	
tgaggcttat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaa	49
<210> 61	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> CD52\_T01

<400> 61

ttccttcc tcctaccacc atcagcctcc tttacctgta ccataac 47

<210> 62

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD52\_T04

<400> 62

ttcctctac tcaccacagg ctccggct tacctgtacc ata 43

<210> 63

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD52\_T05

<400> 63

tcctactcac catagctcc tggttatttg ctcttacctg tac 43

<210> 64

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD52\_T06

<400> 64

ttatccact tctctctac agatacaaac ttttgtcct gagagt 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

```
ccatctcatc cctgcgtgta tccgacttag nnnnnnnnnn cagatctgca gaaagggaaacg          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

```
ccatctcatc cctgcgtgta tccgacttag 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

```
ccatctcatc cctgcgtgta tccgacttag nnnnnnnnnn agagccctta ccagaaccagg          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

ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn ggaccttagta 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 accagtcag ctccacgtgg t 51  
<210> 73

<211> 495

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; ant i-CD19 CAR

&lt;400&gt; 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 Ser 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 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 ttttcttctc ttcatccctg tcttctgca	49
---	----

<210> 75

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4\_T03

<400> 75

tttccatgc tagcaatgca cgtggccag cctgctgtgg tactggcca	49
---	----

<210> 76

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4\_T04

<400> 76

tccatgctag caatgcacgt ggcccagcct gctgtggta c tgccagca	49
---	----

<210> 77

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDCD1\_T01

<400> 77

ttctccccag ccctgctcggt ggtgaccgaa ggggacaacg ccacccatca	49
---	----

<210> 78

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; PDCD1\_T03

&lt;400&gt; 78

tacctctgtg gggccatctc cctggcccc aaggcgcaga tcaaagaga 49

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 530

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Repeat CTLA4\_T01-L

&lt;400&gt; 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 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
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
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
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 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 Arg Pro Ala

515

520

525

Leu Glu

530

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 530

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Repeat CTLA4\_T01-R

&lt;400&gt; 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 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
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
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser 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 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 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 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	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 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 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 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 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 Arg Pro Ala

515

520

525

Leu Glu

530

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 530

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Repeat CTLA4\_T04-L

&lt;400&gt; 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 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 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 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 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 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
-----	-----	-----

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	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> 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 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 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 Arg Pro Ala

515

520

525

Leu Glu

530

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 529

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

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

&lt;400&gt; 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 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 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 Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro		
385	390	395
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 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
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 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 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 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 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
-----	-----	-----

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
-----	-----	-----

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
-----	-----	-----

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 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 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 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 Arg Pro Ala Leu

515

520

525

Glu

&lt;210&gt; 89

&lt;211&gt; 2814

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; CTLA4\_T01-L TALEN

&lt;400&gt; 89

atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgcccgtatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttctgttcgac agtggcgcaag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt	180
acacacgcgc acatcggtgc gtttaagccaa cacccggcag cgtagggac cgtcgctgtc	240

aagtatcagg acatgatcgc agcggttgcca gagggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgtctg gagggcttgc tcacggtgtgc gggagatgg	360
agaggtccac cgttacagtt ggacacagggc caacttctca agattgcaaa acgtggcgcc	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcattt cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgtggag	540
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	600
gtggccatcg ccagcaataa tggggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	660

ccgggtgtgt gcccggccca cggcttgacc ccggagcagg tggggccat cgccagccac	720
gatggcgca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggctgt gtgcaggcc	780
cacggcttga ccccgagca ggtggtgcc atgccagcc acgatggcg caagcaggcg	840
ctggagacgg tccagcggtc ttggccgttg ctgtccagg cccacggctt gacccggag	900
caggtggtgg ccatcgccag ccacgtggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcg	960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccccc agcagggtgtt ggccatcgcc	1020
agcaatggcg gtggcaagca ggctggagac acggccatcg ggctgttgcc ggtgtgtgc	1080
caggccccacg gcttgacccccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaataa tggggcaag	1140
caggcgctgg agacggtcca cggcgctgttg ccgggtgtgt gcccggccca cggcttgc	1200
ccggagcagg tggggccat cgccagccac gatggcgca agcaggcgct ggagacggc	1260
cagcggctgt tgccgggtgt gtggccaggc cacggcttga ccccgagca ggtggtgcc	1320
atcgccagca atattgggttgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct tgccgggtg	1380
ctgttgccagg cccacggctt gacccggag caggtggtgg ccatcgccag ccacgtggc	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgacccccc agcagggtgtt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggctggag	1560
acggccatcg ggctgttgcc ggtgtgtgc caggeccacg gttgacccccc ggagcagggt	1620
gtggccatcg ccagccacga tggcgcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	1680
ccgggtgtgt gcccggccca cggcttgacc cccagcagg tggggccat cgccagcaat	1740
ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccggctgt gtggccaggcc	1800
cacggcttga ccccgagca ggtggtgcc atcgccagcc acgatggcg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtc ttggccgttg ctgtggcagg cccacggctt gacccggag	1920
caggtggtgg ccatcgccag ccacgtggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcagggtgtt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc ggcgtggag agcattgttgc cccagtatc tcggccatgt	2100
ccggcggtgg cggcggttgc caacgaccac ctgtcgctt tgccctgcct cggcggcg	2160
cctgcgtgg atgcagtgaa aaaggattt gggatccta tcagccgttc ccagctgggt	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280
gagttacatcg agctgatcg gatcgccgg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aagggtgtgg agttttcat gaagggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggtcc	2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtt ggctccccc tgcactacgg cgtgtatcg	2460
gacaccaagg cctactccgg cgctacaac ctggccatcg gccaggccga cgaaatgcag	2520

aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	acccaaacga	gtggtgaaag	2580
gtgtaccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcggcgag	atgataagg	ccggcacccct	gaccctggag	2760
gaggtgggaa	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cgccgactg	ataa	2814
<210>	90					
<211>	2832					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	CTLA4_T01-R TALEN					
<400>	90					
atggcgate	ctaaaaagaa	acgttaaggc	atcgataagg	agaccggccgc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatac	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaaggtt	cgttcgacag	tggcgcagca	ccacgaggca	180
ctggcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggtcggt	taagccaaca	ccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgtgtcaa	gtatcaggac	atgatcgac	cgttgcaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcg	caaacagtgg	tccggcgcac	gcgccttgc	ggccttgc	360
acggtggcgg	gagagtttag	agggtccaccc	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgc当地	gtggcggcgt	gaccgcgt	gaggcagtgc	atgc当地ggc	aatgc当地	480
acgggtggcc	cgc当地caactt	gaccccccag	cagggtgggg	ccatcgccag	caataatgg	540
ggcaagcagg	cgc当地ggagac	ggtccagcgg	ctgttgcgg	tgtgtgc当地	ggcccacggc	600
ttgacccccc	acgagggtgg	ggccatcgcc	agccacgatg	gccc当地agca	ggc当地gtggag	660
acgggtccagc	ggc当地gttgcc	ggc当地gtgtgc	caggcccacg	gttgc当地cccc	ggaggcagg	720
gtggccatcg	ccagcaatat	ttgtggcaag	caggcgttgg	agacgggtgc	ggc当地gtgttg	780
ccgggtgtgt	gccaggccca	cggcttgcacc	ccccaggcagg	tggtggccat	cgccaggcaat	840
aatgggtggca	agcaggcgt	ggagacggc	cagcggctgt	tgc当地gtgt	gtgc当地aggcc	900
cacggcttga	ccccggagca	ggtgggtggcc	atgc当地aggca	atattgggtgg	caaggcaggcg	960
ctggagacgg	tgcaggcgt	gttgc当地gggt	ctgtgc当地agg	cccacggctt	gacccggag	1020
cagggtgggg	ccatcgccag	caatattgg	ggcaaggagg	cgc当地ggagac	ggtgc当地aggcg	1080
ctgttgc当地gg	tgtgtgc当地	ggcccacggc	ttgacccccc	agcagggtgg	ggccatcgcc	1140
agcaataatg	gtggcaagca	ggc当地gtggag	acgggtccagc	ggc当地gtgtgc	ggtgc当地gtgc	1200

caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatat	tggtgtggcaag	1260
caggcgctgg	agacggtgca	ggcgctgttgc	ccgggtctgt	gccaggcccc	cggtttgacc	1320
ccggagcagg	tggtgtggcat	cgccagccac	gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1380
cagggctgt	tgcgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtgggtggcc	1440
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgcaggcgct	gttggcggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	1560
ggcaagcagg	cgttggagac	ggtccagcg	ctgtggccgg	tgctgtgcc	ggcccacggc	1620
ttgacccccc	acaggttggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgtggag	1680
acggtccagc	ggcgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcagggt	1740
gtggccatcg	ccagcaataaa	tggtgccag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgtgttgc	1800
ccggtgctgt	gccaggcccc	cggttgcacc	ccggagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	1860
attggtgcc	agcaggcgct	ggagacggtg	caggcgctgt	tgcgggtgct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtgcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggt	gttggccgt	ctgtgcagg	ccacggctt	gacccctcag	2040
caggtggtgg	ccatcgccag	aatggcggc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagtatctc	gcctgtatcc	ggcgttgcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtgccttg	2160
gcctgcctcg	gccccgtcc	tgcgtggat	gcagtggaaaa	agggatgggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtaaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tggccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tgcggccaa	cagcacccag	2340
gaccgttatcc	tggagatgaa	ggtgtatggag	ttttcatga	agggtacgg	ctacagggc	2400
aagcacctgg	ggggctccag	gaagcccgac	ggcgccatct	acaccgtgg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgtatcggtt	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccatcgcc	2520
cagggccacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaagg	gtacccctcc	agcgtgaccg	agtcaagtt	cctgttcgt	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgtacca	ggctgtacca	catcacaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgtgtc	cgtggaggag	ctcctgtatcg	gccccggat	gatcaaggcc	2760
ggcacccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagtcaaca	acggcgagat	caacttcg	2820
gccgactgat	aa					2832
<210>	91					
<211>	2814					
<212>	DNA					

## <213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4\_T03-L TALEN

<400> 91

```
atgggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60  
gctatcgata tcgcccgtatc acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120  
aaaccgaaagg ttcggttcgac agtggcgccgag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
```

acacacgcgc acatcggtgc gttaaagccaa caccggcag cgtagggac cgtcgctgtc	240
aagtatcagg acatgatcgac gcgttgccaa gaggcgacac acgaagcgat cgttggcg	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgcctgt gggcccttgc tcacggtgtc gggagagt	360
agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag	540
acggttccage ggctgttgcc ggtgtgtgc caggccccacg gttgacccccc ccagcagg	600

```
gtggccatcg ccagcaatgg cggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgtg 660  
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tggtggccat cgccagcaat 720  
ggcggtgtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc 780  
cacggcttga ccccggagca ggtggtgcc atcgccagcc acgatggcg caagcaggcg 840  
ctggagacgg tccagcggtc gttggcggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag 900  
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg 960  
ctgttgccgg tgctgtgcga ggccccacggc ttgaccccgg agcagggtgt ggccatcgcc 1020
```

agcaatattg gtggcaagca ggcgttggag acggcgcagg cgctgttgcc ggtgttgtgc 1080  
caggccccacg gcttgcaccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaatgg cggtgtggcaag 1140  
caggcgctgg agacggtcca gcggcgtttg ccgggtctgt gccaggccca cggcttgacc 1200  
ccccagcagg tggtggccat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1260  
cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggccc cacggcttga cccggagca ggtgtggcc 1320  
atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttggccgtg 1380  
ctgtggccagg cccacggctt gaccccccag caggtggtgg ccatggccag caatggcggt 1440

ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1500  
ttgacccccgg agcagggttgt ggccatcgcc agcaaatattg gtggcaagca ggcgctggag 1560  
acggtgtgcagg cgctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gttgaccccc ccagcagggtg 1620  
gtggccatcg ccagcaataa tggtggcaag caggcgttgg agacggtcca gccggctgtg 1680

ccgggtgtgt	gccaggccc	cggttgcacc	ccggagcagg	tggtgccat	cggcagccac	1740
gatggcgca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggctgt	tgccgtgtc	gtgcaggcc	1800
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtgcc	atgcgcagca	atattggtg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgtg	ctgtgcagg	cccacggctt	gaccggag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	caatatttgt	ggcaaggagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	1980
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgaccctc	agcaggttgt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcccggcc	ggcgctggag	agcatgttg	cccagtatac	tcgcctgtat	2100
ccggcggtgg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgctgcct	tggctgcct	cggcggcg	2160
cctgcgttgttgg	atgcagtgaa	aaaggatgttgg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagcttgttgg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtccccac	2280
gagtagatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtagatgg	agtcttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	ggggcgctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccca	tcgactacgg	cgtgatcg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggttacaac	ctgcccattcg	gccaggccga	cggaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtgaaag	2580
gtgttaccctt	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cggcgtgtcg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cgccggcgag	atgatcaagg	ccggcaccc	gaccctggag	2760
gaggtaggaa	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cgcccgactg	ataaa	2814
<210>	92					
<211>	2832					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	CTLA4_T03-RTALEN					
<400>	92					
atggcgcgtc	ctaaaaagaa	acgttaaggc	atcgataagg	agaccggcc	tgcggatcc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatac	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagg	ttcgacag	tggcgcagca	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggtcg	taagccaa	ccggcagcg	240
tttagggaccg	tgcgtgtcaa	gtatcaggac	atgatcgac	cgttgccaga	ggcgcacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcgg	caaacagtgg	tccggcgcac	gcgccttgaa	ggccttgctc	360

acggtgccgg gagagttag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attcaaaac gtggccgcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgccca gccccacggc	600
ttgacccccc agcaggttgt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	660
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcagggtg	720
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgttgg agacggtcca gggctgttg	780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggaggcagg tggtgccat cgccagccac	840
gatggcggca acgaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgtgtc gtgcaggcc	900
cacgcttga ccccgagca ggtggtgcc atcgccagca atatttgtgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tgcaggcgct gttggcgtt ctgtggcagg cccacggctt gaccccccag	1020
caggtggtgg ccatcgccag caataatgtt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc ttgacccccc agcaggttgt ggccatcgcc	1140
agcaatggcg gtggcaagca ggccgtggag acggccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc	1200
caggcccacg gcttgacccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtgccag	1260
cagggcgtgg agacggtgca ggccgtgtt ccggtgctgt gcccaggccca cggcttgacc	1320
ccggaggcagg tggtgccat cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc	1380
cagggctgt tgccgtgtc gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggttgtggcc	1440
atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagggct gttggcgtt	1500
ctgtgcccagg cccacggctt gacccggag caggtggtgg ccatcgccag caatattgtt	1560
ggcaaggcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgccca ggcccacggc	1620
ttgaccccggtt agcaggttgtt ggccatcgcc agccacgtt gggcaagca ggcgctggag	1680
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcagggtg	1740
gtggccatcg ccagcaatat tggtgccag caggcgttgg agacggtgca ggcgctgttg	1800
ccggtgctgtt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtgccat cgccagcaat	1860
aatggtgccca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgtgtc gtgcaggcc	1920
cacggcttga ccccgagca ggtggtgcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg	1980
ctggagacgg tccagggctt gttggcgtt ctgtggcagg cccacggctt gacccctcag	2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc	2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttgcc ggcgttgacca acgaccaccc cgtcgccttgc	2160
gcctgcctcg gccccgttcc tgcgtggat gcagtggaaa agggattggg ggatcctatc	2220

agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgccccgaa cagcacccag	2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacagggc	2400
aagcacctgg gcggctccag gaagccgc acaccgtggg ctccccatc	2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcg	2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
cccaacgagt ggtgaaaggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctttcg	2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg ccgtgctgac cgtggaggag ctccgtatcg gcggcgagat gatcaaggcc	2760
ggcacccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttaacaaca acggcgagat caacttcg	2820
gccgactgat aa	2832
<210> 93	
<211> 2814	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CTLA4_T04-L TALEN	
<400> 93	
atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgcccgtatc acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttcggtcgac agtggcgacg caccacgagg cactggtcgg ccacgggtt	180
acacacgcgc acatcggtgc gttaagccaa cacccggcag cgtagggac cgtcgctg	240
aagtatcagg acatgatcgac agcggtgcca gaggcgacac acgaagcgat cggtggcg	300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgtctg gaggccttgc tcacggtggc gggagatgt	360
agaggccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcg	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcattt cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgaccccg agcaggttgtt ggccatcgcc agccacgatg gcccggcaagca ggccgtgg	540
acgggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcagg	600
gtggccatcg ccagccacga tggcgccaa caggcgctgg agacggtcca gcccgtgtt	660
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc cggaggcagg tggtgccat cggccat	720
attggtgca agcaggcgct ggagacgggtg caggcgctgt tgccgggtgt gtgcgg	780
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atcgccagca atggcgggtgg caagcaggcg	840

ctggagacgg tccagcggct gttgccggc ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag	900
caggtggtgg ccatcgccag caataatggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	960
ctgtgccgg tgcgtgcca gccccacggc ttgacccggc agcaggtggt ggccatcgcc	1020
agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtcagc ggctgtgcc ggtgtgtgc	1080
cagggccacg gcttgaccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaatgg cggtggcaag	1140
caggcgctgg agacggtcca gcggtgttgc ccgggtctgt gccaggccca cggcttgacc	1200
ccggagcagg tggtgccat cgccagcaat attggtgca agcaggcgct ggagacggtg	1260
caggcgctgt tgccgggtct gtgccaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc	1320
atcggccagca ataatggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggc	1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccggag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagggc ctgtgccgg tgctgtgcc gccccacggc	1500
ttgacccggc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgtggag	1560
acgggtcagg cgctgttgcc ggtgtgtgc caggcccacg gcttgacccgg agagcagggtg	1620
gtggccatcg ccagaatat ttgtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgtgttgc	1680
ccgggtctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtgccat cgccagcaat	1740
ggcgtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtct gtgccaggcc	1800
cacggcttga ccccccagca ggtggtgcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggct gttgccggc ctgtgccagg cccacggctt gacccggag	1920
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagggc	1980
ctgtgccgg tgctgtgcc gccccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc ggcgctggag agcattgttgc cccagtata tcgcctgtat	2100
ccggcgttgg ccgcgttgac caacgaccac ctgcgtgcct tggcctgcct cggcggcgt	2160
cctgcgttgg atgcagtgaa aaaggattt gggatccatc tgcgtgttgc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agtgaagta cgtccccac	2280
gagtagatcg agtgcgtcgat gatcgcccg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aagggtatgg agttttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaaggcacct gggggctcc	2400
aggaagcccg acggccat ctacaccgtg ggctcccca tgcactacgg cgtgtatcg	2460
gacaccaagg ctactccgg cggctacaac ctgcctatcg gccaggccga cgaardtgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtgaaag	2580

gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttccctgttcg tgtccggcca cttcaaggc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg cggcacccct gaccctggag	2760
gagggtgagaa ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814
<210> 94	
<211> 2832	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CTLA4_T04-R TALEN	
<400> 94	
atggcgcata ctaaaaagaa acgttaaggta atcgataagg agaccggcc tgccaagttc	60
gagagacagc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgacagca ccacgaggca	180
ctggctggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtcgta taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgac cggtgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgctgg caaacagtgg tccggcgacac ggcgtctgg ggccttgctc	360
acggtgtggcg gagagtttag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaaac gtggcgccgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcattggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt	540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	600
ttgaccccg agcaggttgtt ggccatcgcc agccacgatg gggcaagca ggcgttgag	660
acggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggccccacg gcttgacccctt ccagcagggt	720
gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	780
ccgggtgtgtt gccaggccca cggcttgacc cccacggagg tggtgccat cgccagcaat	840
aatggtgca agcaggcgct ggagacggc cagcggctgt tgccgggtgt gtcggcaggcc	900
cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tccagcggct gttggccgtg ctgtggcagg cccacggctt gacccggag	1020
cagggttgtt ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggccacggc ttgaccccg agcaggttgtt ggccatcgcc	1140
agccacgatg gggcaagca ggccgtggag acgggtccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc	1200
caggccccacg gcttgacccctt ggagcagggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtgcaag	1260

caggcgctgg	agacggtgca	ggcgctgtt	ccgggtctgt	gccaggccc	cggttgcacc	1320
cccccaggcagg	tggggccat	cggcagcaat	aatggtgca	agcaggcgct	ggagacggtc	1380
cagcggttgt	tggcggtct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggt	gttggcggt	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	caggtgggtt	ccatcgccag	caatattgg	1560
ggcaagcagg	cgtggagac	ggtgcaggcg	ctgttgccgg	tgctgtgcc	ggcccacggc	1620
ttgaccccg	agcagggtgt	ggccatcgcc	agccacgt	gcccgaagca	ggcgttggag	1680
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgtgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcagggt	1740
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgttgc	1800
ccgggtgtgt	gccaggccc	cggttgcacc	ccggaggcagg	tggggccat	cgccagcaat	1860
atgggtggca	agcaggcgct	ggagacgggt	caggcgctgt	tgccgggt	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgtggcgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggt	gttggcggt	ctgtgccagg	ccacggctt	gaccctcag	2040
caggtggtgg	ccatcgccag	aatggcggc	ggcaggccgg	cgtggagag	cattgttgcc	2100
cagtatctc	gccctgatcc	ggcgttggcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtgccttg	2160
gcctgcctcg	ggggcgtcc	tgcgtggat	gcagtgaaaa	aggatgggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	actggtgaa	gtccgagct	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgccccgaa	cagcacccag	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgtatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcccgtccag	gaagcccgac	ggcgcacatct	acaccgtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgtatcggtt	acccaaggcc	tactccggcg	gttacaacct	gccccatggc	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaagg	gtacccctcc	agcgtgaccc	agttaagtt	cctttcggt	2640
tccggccact	tcaaggc	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gccccgagat	gatcaaggcc	2760
ggcacccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttaaca	acggcgagat	caacttcg	2820
gccgactgat	aa					2832
<210>	95					
<211>	2814					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					

<220><223> PDCD1\_T01-L TALEN

<400> 95

atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60

gctatcgata tcgcccgtact acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaaccgaagg ttcgttgcac agtggcgccag caccacgagg cactggtcgg ccacgggtt	180
acacacgcgc acatcggtgc gttaaagccaa caccggcgag cgtagggac cgtcgctgtc	240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gagggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc	300
ggcaaacagt ggtccggcgcc acgcgtctg gaggccttgc tcacggtgtc gggagagtgt	360
agaggtccac cgttacagtt ggacacagggc caacttctca agattgcaaa acgtggcgcc	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgttgc cgcgtatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480

tgtacccccc	agcagggttgt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgtgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagccacga	tggcgcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcggctgtg	660
ccggtgctgt	gccagggcca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtgccat	cggcagcaat	720
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcgctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtgcc	atcgccagcc	acgatggcg	caaggcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcgct	gttggcggt	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccggag	900

cagggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccgg	agcaggttgt	ggccatcgcc	1020
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgcgtggag	acggtccagc	ggctgttgtcc	ggtgctgtgc	1080
caggcccacg	gcttgacccc	ggagcagggtg	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	1140
caggcgctgg	agacggtcca	gccccgtgttgc	ccgggtctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1200
ccggagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	attggtgttca	agcaggcgct	ggagacggtg	1260
caggcgctgt	tgccgggtctgt	gtgcaggcc	cacggcttgc	ccccccagca	ggtgtggcc	1320

atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccgtg	1380
ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgtt ccatcgccag ccacgatggc	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcggtt ctgttgccgg tgctgtgcga ggcccacggc	1500
tttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gggcaagca ggccgtggag	1560
acggttccagc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggccccacg gttgacccggagcggatgg	1620
gtggccatcg ccagccacga tggccggcaag caggcgctgg agacggtcca gcccgtgttg	1680

ccgggtgtgt	gccaggccc	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	1740
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggctgt	tgccggct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtgcc	atgccagca	ataatggtg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	ttgcccgtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccggag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaaggcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg	tgttgtgcca	ggcccacggc	ttgaccctc	agcaggtgg	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcccgcaggcc	ggcgctggag	agcatgttg	cccagttatc	tcgcctgtat	2100
ccggcggtgg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgctgcct	tggctgcct	cggcgccgt	2160
cctgcgtgg	atgcagtgaa	aaaggattt	ggggatcc	tccggcttc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtccccac	2280
gagtagatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtagatgg	agttttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	ggccggctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccca	tgcactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cgctacaac	ctgcctatcg	gccaggccga	cggaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtgaaag	2580
gtgtaccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttccgttgc	tgtccggcca	cttcaaggc	2640
aactacaagg	cccaagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgt	2700
tccgtggagg	agtcctgtat	cgccggcgag	atgatcaagg	ccggcaccc	gaccctggag	2760
gaggtaggaa	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cgcccgactg	ataaa	2814
<210>	96					
<211>	2829					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	PDCD1_T01-R TALEN					
<400>	96					
atggcgtatc	ctaaaaagaa	acgttaaggc	atcgataagg	agaccggcc	tgcgttttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatac	gccgatctac	gcacgctcg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaaggtt	cgttgcacag	tggcgacca	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggtcg	taagccaaca	cccgccagcg	240
tttagggaccg	tgcgtgtcaa	gtatcaggac	atgatcgac	cgttgccaga	ggcgcacac	300
gaagcgtatcg	ttggcgtcg	caaacagtgg	tccggccac	gctctgg	ggccttgctc	360

acgggtggcg	gagagttag	aggccac	ttacagtgg	acacaggcc	acttctcaag	420
attcaaaac	gtggcgcgt	gaccgcagt	gaggcagtgc	atgcattgc	caatgcact	480
acgggtgccc	cgtcaactt	gaccccccag	caagtctcg	caatcgccag	caataacgga	540
gggaagcaag	ccctcgaaac	cgtcgacgg	ttgttcctg	tgctctgcca	ggcccacggc	600
cttacccctg	agcagggtgt	ggccatcgca	agtaacattg	gaggaaagca	agccttggag	660
acagtgcagg	ccctgttgcc	cgtgctgtgc	caggcacacg	gcctcacacc	agagcaggtc	720
gtggccattg	cctccaacat	cggggggaaa	caggctctgg	agaccgtcca	ggccctgctg	780
cccgctct	gtcaagctca	cggcctgact	ccccacaag	tggtcgccc	cgcctcta	840
aacggcggga	agcaggcact	ggaaacagt	cagagactgc	tccctgtgc	ttgccaagct	900
catgggttga	cccccaaca	ggtcgtcgct	attgcctcaa	acaacggggg	caagcaggcc	960
cttgagactg	tgcagaggct	gttgccagtg	ctgtgtcagg	ctcacggct	cactccacaa	1020
caggtggtcg	caattgccag	caacggcggc	ggaaagcaag	ctcttggaaac	cgtcaacgc	1080
ctcctgccc	tgctctgtca	ggctcatggc	ctgacaccac	aacaagtctgt	ggccatcgcc	1140
agtaataatg	gccccaaaca	ggctttttag	accgtccaga	ggctgtccc	agtgtctgc	1200
caggcacacg	ggctgacccc	ccagcagggt	gtggctatcg	ccagcaataa	tggggcaag	1260
caggccctgg	aaacagtcca	ggccctgtgc	ccagtgcatt	gccaggctca	cgggctcact	1320
cccgaaacagg	tcgtggcaat	cgccccaac	ggagggaaac	aggctctgg	gaccgtcgag	1380
agactgctgc	ccgtcttgt	ccaggcccac	ggactcacac	ctcagcagg	cgtcgccatt	1440
gcctctaaca	acggggcaa	acaaggcc	gagacagtgc	agggctgtt	gcctgttgt	1500
tgccaaagccc	acggcttgac	tcctcaacaa	gtggtcgcca	tcgcctcaa	tggccgggaa	1560
aaacaagctc	tggagacagt	gcagaggtt	ctgcccgtcc	tctgccaagc	ccacggcctg	1620
actccccaac	aggctgtcg	cattgccagc	aacggcggag	gaaagcaggc	tctcgaaact	1680
gtcagcggc	tgcttctgt	gttgtgtcag	gtcataggc	tgaccccca	gcaagtggt	1740
gctattgcct	ctaacaatgg	aggcaagcaa	gcccttgaga	cagtccagag	gctgttgcca	1800
gtgctgtgcc	aggcccacgg	gctcacaccc	cagcagggtgg	tcgcctcg	cagtaacggc	1860
ggggccaaac	aggcattgga	aaccgtccag	cgccctgttc	cagtgtctg	ccaggcacac	1920
ggactgacac	ccgaacaggt	ggtggccatt	gcatccatg	atggggcaa	gcaggccctg	1980
gagaccgtgc	agagactct	gccagtgtt	tgccaaagtc	acggcc	ccctcagcaa	2040
gtcgtggcca	tcgcctcaa	cggggggggc	cgccctgcac	tggagagcat	tgttgcccag	2100

ttatctgcc	ctgatccggc	gttggccg	ttgaccaacg	accacctcg	cgccttgcc	2160	
tgcctcg	ggcgtc	ctgc	gctggatgc	gtaaaaagg	gattgggg	tcctatcagc	2220
cgttccc	agg	tcgttgaagtc	cgagctggag	gagaagaaat	ccgagttgag	gcacaagctg	2280
aagtacgtc	ccccac	gagta	catcgagctg	atcgagatcg	ccggaaacag	caccaggac	2340
cgtatcc	ttgg	atgttgaaggt	gatggat	ttcatgaagg	tgtacggcta	cagggcaag	2400
acacctgg	ggcg	gctcc	caggaa	gcccga	ccatctaca	ccgtgggctc	2460
tacggcgt	gtgt	tgac	ggacac	caaggcctac	tccggcg	acaac	2520
gccgac	gaaa	tgca	gaggta	cgtggagg	aaccagac	ggaacaagca	2580
aacgagtg	gtt	ggaagg	gtgt	ccc	ccagc	gtgacc	2640
ggccactt	ca	aggca	acta	caagg	ccag	ctgttgc	2700
aacggc	ccg	tgtgt	ccgt	ggagg	agctc	ctgatcg	2760
accctgac	cc	tgg	aggaggt	gagg	aggaa	ttcaacaac	2820
gactgataa							2829
<210>	97						
<211>	2814						
<212>	DNA						
<213>	Artificial Sequence						
<220><223>	PDCD1_T03-L TALEN						
<400>	97						

atggcgc	atc	taaaaagaa	acgt	taagg	tc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60	
gctatcg	ata	tcg	ccgat	ct	acg	cacg	ctc	ggctacag	120	
aaacc	gaagg	ttc	gtt	cgac	agt	ggc	gcag	caaca	ggagaagatc	
acacac	gc	acat	cgtt	gc	gtt	aa	cacccgg	cg	tttaggg	
aagtat	cagg	acat	gat	cg	cg	ccaa	cg	cgat	cgtcgctg	
ggcaa	acagt	acat	gat	cg	cg	gacac	ac	gaag	cgat	
agagg	tccac	cg	tt	ac	tg	ggc	tt	gg	ttg	
gtgacc	gc	tg	gagg	ca	gt	gat	gc	cc	gtcaac	480
ttgac	cc	gg	agg	gtt	gtt	gc	ccat	gt	ccat	540
acgg	tg	gg	gtt	gtt	gtt	gc	ccat	gt	ccat	600
gtggcc	at	cc	gtt	gtt	gtt	gc	ccat	gt	ccat	660
ccgg	gt	cc	gtt	gtt	gtt	gc	ccat	gt	ccat	720

gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggctgt	tgcgggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtgccc	atcgccagca	atggcggtgtt	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgcggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccggag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaaggagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgtgcgg	tgcgtgcca	ggcccacggc	ttgacccccc	agcaggtgg	ggccatcgcc	1020
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgtgtgc	1080
caggcccacg	gcttgacccc	ccagcagggt	gtggccatcg	ccagcaataa	tggggcaag	1140
caggcgtgg	agacggtcca	gcccgtgtt	ccggctgtgt	gccaggccca	cggcttgacc	1200
ccccagcagg	tgtggccat	cgccagcaat	ggcggtgcc	agcaggcgct	ggagacggtc	1260
cagcggctgt	tgcgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtgccc	1320
atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgcggtg	1380
ctgtgcagg	cccacggctt	gaccccccag	cagggtgg	ccatcgccag	caataatgg	1440
ggcaaggagg	cgtggagac	ggtccagcgg	ctgtgcgg	tgcgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgacccccc	agcaggtgg	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgtggag	1560
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcagggt	1620
gtggccatcg	ccagcaataa	tggggcaag	caggcgtgg	agacggtcca	gcccgtgtt	1680
ccggcgttgt	gccaggccca	cggttgacc	ccggaggagg	tggggccat	cgccagccac	1740
gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggctgt	tgcgggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtgccc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgcggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccggag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	aatattgg	ggcaaggagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	1980
ctgtgcgg	tgcgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaggtgg	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcccaggccc	ggcgctggag	agcattgtt	cccagtatac	tgccttgat	2100
ccggcgttgg	ccgggttgac	caacgaccac	ctcgctgcct	tggcctgcct	cgccggcg	2160
cctgcgtgg	atgcagtgaa	aaaggattt	ggggatctta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtccccac	2280
gagtagatcg	agctgatcg	gatcgcccg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtagatgg	aggtagatgg	gatcgatcg	ggctacaggg	gcaagcacct	ggccggctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtt	ggctccccc	tgcactacgg	cgtgtatcg	2460

gacaccaagg cctactccgg cggttacaac ctgcccattcg gccaggccga cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag	2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttccctgttcg tgccggcca cttcaaggc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg	2700
tccgtggagg agctcctgat cggcgccgag atgatcaagg ccggccacct gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagtcaa caacggcgag atcaacttcg cgcccgactg ataa	2814
<210> 98	
<211> 2829	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PDCD1_T03-R TALEN	
<400> 98	

atggcgtatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgataagg agaccggcg tgccaaatgc	60
gagagacagg acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaaggctt cggtcgacag tggcgccagca ccacgaggca	180
ctggctggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtcggt taagccaaaca cccggcagcg	240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatgcag cgttgccaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgtcg caaacagtgg tccggcgac ggcgtctgg ggccttgctc	360
acggtggcgag gagatgttag aggtccaccc ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420

attgcaaaac gtggcgccgt gaccgcgtg gaggcagtgc atgcattggcg caatgcactg	480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccccggag caagtcgtcg caatcgccag ccatgatggaa	540
gggaagcaag ccctcgaaac cgtgcagcgg ttgttccctg tgctctgcca ggccccacggc	600
cttacccttc agcagggtgtt ggccatcgca agtaacggag gagaaagca agccttggag	660
acagtgcagc gcctgttgcc cgtgtgtgc caggcacacg gcctcacacc agaggaggc	720
gtggccatttgc cttccatgtt cggggggaaa caggctctgg agaccgttcca gaggctgtcg	780
cccgctcttgc gtcaagctca cggcctgact ccccaacaag tggtcggccat cgcctctaatt	840

ggcggcgaaa agcaggcact ggaaacagtgc cagagactgc tccctgtgtt tgccaaatgc	900
catgggttga ccccccacaa ggtcggtcgat attgcctcaa acgggggggg caagcaggccc	960
ctttagactg tgcagaggct gttggcgtgc cttgtgtcagg ctcacgggtt cactccacaa	1020
cagggtgtcg caattgccag caacggcgcc ggaaagcaag ctcttggaaac cgtgcaacgc	1080
ctccctggcccg tgctctgtca ggctcatggc ctgacaccac aacaagtgtt ggccatcgcc	1140

actgtgcagc ggctgcttcc tgtgctgtgt caggctcatg ggctgacccc cgagcaagt	1740
gtggctattg cctctaattgg aggcaagcaa gcccttgaga cagtcacagag gctttgcca	1800
gtgctgtgcc agggccacgg gtcacaccc cagcaggtag tcgcacatcgc cagtaacaac	1860
ggggcaaac aggcattgga aaccgtccag cgcccttc cagtgcctg ccaggcacac	1920
ggactgacac ccgaacaggt ggtggccatt gcatccatg atggggcaa gcagggctg	1980
gagaccgtgc agagactctt gccagtgtt tgccaaagctc acggcctcac ccctcagcaa	2040
gtcggtggca tcgcctcaaa cggggggggc cgccctgcac tggagagcat tgttgcctc	2100
ttatctcgcc ctgatccggc ttggcccg ttgaccaacg accaccttgt cgccttggcc	2160
tgcctggcg ggcgtcctgc gctggatgca gtgaaaagg gattggggaa tcctatcagc	2220
cgttccagc tggtaagtc cgagctggag gagaagaaat ccgagtttag gcacaagtg	2280
aagtacgtgc cccacgagta catcgagtg atcgagatcg cccgaaacag cacccaggac	2340
cgtatcctgg agatgaaggt gatggagttc ttcatgaagg tgtacggcta cagggcaag	2400
cacctggcg gctccagaa gcccacggc gccatctaca ccgtggctc cccatcgac	2460
tacggcgtga tcgtggacac caaggctac tccggcgct acaacctgcc catggccag	2520
ggcgacgaaa tgacggatgt cgtggaggag aaccagacca ggaacaagca catcaacccc	2580
aacgagtggta ggaagggtgtt cccctccagc gtgaccgagt tcaagttcct gttcggttcc	2640
ggccacttca aggcaacta caaggccag ctgaccagc tgaaccacat caccaactgc	2700
aacggcgccg tgctgtccgt ggaggagctc ctgatggcg gcgagatgtt caaggccggc	2760
accctgaccc tggaggaggtt gaggaggaag ttcaacaacg gcgagatcaa cttcgccggcc	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 cctgcgtgta	tccgacttag	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 cctgcgtgta	tccgacttag	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 cctgcgtgta	tccgacttag	nnnnnnnnnn	ccacagaggt	agtgccgc	59
-----------------------	------------	------------	------------	----------	----

<210> 102

<211> 60

<212> DNA

&lt;213&gt;

&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Forward primer PDCD1\_T03

&lt;220&gt;&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (31)..(40)

&lt;223&gt; n is a or c or t or g

&lt;400&gt; 102

ccatctcatc cctgcgtgtc tccgacttag nnnnnnnnnn gacagagatg ccggcacca	60
	60

&lt;210&gt; 103

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Reverse primer CTLA4\_T01

&lt;400&gt; 103

cctatcccgt gtgtgccttg gcagtctcag tggaatacag agccagccaa	50
--	----

&lt;210&gt; 104

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Reverse primer CTLA4\_T03/04

&lt;400&gt; 104

cctatcccgt gtgtgccttg gcagtctcag ggtgccgtg cagatggaa	50
--	----

&lt;210&gt; 105

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Reverse primer PDCD1\_T01

&lt;400&gt; 105

cctatcccgt gtgtgccttg gcagtctcag ggctctgcag tggaggccag	50
--	----

&lt;210&gt; 106

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Reverse primer PDCD1\_T03

&lt;400&gt; 106

cctatccctt gtgtgccttg gcagtcctgggacaaacgcc accttacact 50

&lt;210&gt; 107

&lt;211&gt; 281

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; pTalpha-FL

&lt;400&gt; 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 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 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 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 Ala Leu Gly Cys Pro Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val 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 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	265	270
-----	-----	-----

<210> 109

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTalpha-Delta48

<400> 109

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 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 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> 110

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><223> pTalpha-Delta62

<400> 110

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 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 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 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

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; pTalpha-Delta78

&lt;400&gt; 111

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 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 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 Arg Leu Arg Ala Leu Gly

180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly

195 200

&lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 189

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; pTalpha-Delta92

&lt;400&gt; 112

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 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 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 Arg Leu Arg

180 185

&lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 171

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; pTalpha-Delta110

&lt;400&gt; 113

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 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 Phe Lys Leu

145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys

165 170

&lt;210&gt; 114

&lt;211&gt; 167

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; pTalpha-Delta114

&lt;400&gt; 114

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 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 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 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 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 Leu Gly Ala Phe Phe Arg Gly Asp Leu  
 260 265 270  
 Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly 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 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 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 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 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 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 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  
 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 Ala Leu Gly Cys Pro Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Thr Gly Val 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 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 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 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 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 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 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 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 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

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 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 Phe Lys Leu

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Arg Leu Trp Ser Ser

165

170

&lt;210&gt; 122

&lt;211&gt; 173

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; pTalpha.EC-TCRalpha. TM. IC

&lt;400&gt; 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 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

&lt;210&gt; 123

&lt;211&gt; 233

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; pTalpha.EC-Delta48-1xMUT

&lt;400&gt; 123

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 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 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 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 Ala Leu Gly Cys Pro Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val 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 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 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 Ser 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 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 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 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
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
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		
atggctcctg ccatggaatc ccctactcta ctgtgtgtag ctttactgtt cttcgctcca		60

gatggcgtgt tagcagaggt gcagttgcag cagttagggc cagagttgtat taagcccgaa		120
gcctccgtca agatgtcctg caaggccagc gggtacactt tcaccagcta cgatcatgtat		180

tgggtgaagg agaagccagg ccaggggctt gagtgattt ggtacatcaa cccctacaac	240
gacgggacca aatacaacga gaaattcaag ggcaagcca cactcaccc cgataagtcc	300
tcctctaccg cctacatgga gtcagctcc ctgacctcg aggatagcgc tgtgtattac	360
tgcgcaaggg gcacatacta ctatggctt agggtgttcg actactgggg gcagggact	420
actctcacag tgagctcagg cggaggaggc agtggcggag gggaaagtgg gggccggcgc	480
agcgatattt tcatgaccca ggcagccct agtatccctg tgactccagg cgagagcgtg	540
agcatcagct gccggccag caagagcctg ctgaacagta acgaaacac atacccctac	600
tggttctgc agaggcccgg ccagagccct cagctgctga ttaccgcat gtcaaattt	660
gcctctgggg tggccatag atttagtggg agcggatccg gcacagctt tacatgggg	720
atctccagag tcgaggccga agacgtgggg gtctattact gtatgcaaca cctgaaatac	780
ccctttaacct tcggagccgg cacaaagctg gagctgaagg gggctgacac cacaaccccc	840
gctccaaggc cccctacccc cgaccaact attgcctccc agccactctc actgcggcct	900
gaggccctg tcggccgtgc tggaggcga gtgcatacaa gggccctcg tttgcctgc	960
gattttttta tccccattttt ggtgggtatt ctgtttctg tggacacagg attatttatac	1020
tcaactcagc agcagggtcac atttctttt aagattaaga gaaccaggaa aggcttcaga	1080
cttctgaacc cacatcctaa gccaaacccc aaaaacaaca gagccgaggg cagaggcagc	1140
ctgctgacct gccccgacgt ggaggagaac ccaggccca tggacacaga aagtaatagg	1200
agagcaaattt ttgtctccc acaggagct tccagtgtgc ctgcatttga agtcttgaa	1260
atatctcccc aggaagtatac ttcaaggcaga ctattgaatg cggcctcatc cccaccactg	1320
catacatggc tgacagttt gaaaaaagag caggagttcc tggggtaac acaaattctg	1380
actgctatga tatgcctttt ttttggaca gttgtctgt ctgtacttga tatttcacac	1440
attgagggag acattttttca atcatttaaa gcaggatttac cattctgggg agccatattt	1500
ttttcttattt ctggaatgtt gtcaattata tctgaaagga gaaatgcaac atatctggtg	1560
agaggaagcc tggggagaaa cactgccagc agcatagctg gggaaacggg aattaccatc	1620
ctgatcatca acctgaagaa gagcttggcc tataccaca tccacagttt ccagaaattt	1680
ttttagacca agtgcattt ggcttcctt tccactgaaa ttgttagtgtat gatgcgtttt	1740
ctcaccattt tgggacttgg tagtgctgtc tcactcacaa tctgtggagc tggggaaagaa	1800
ctcaaaggaa acaagggttcc agagaaacgg ggccggaga agctccctta catttttaag	1860
cagcctttca tgcggccagt gcagacaacc caagaggagg atgggtttc ctgcagattc	1920
cctgaggaag aggaaggcgg gtgcgagctg gtttctggcg taaaacagac tttgaatttt	1980
gaccttctca agtggcggg agacgtggag tccaaacccag ggcccatgat tccagcgtg	2040

gtcttgctct tactccttt ggttgaacaa gcagcggccc tgggagagcc tcagctctgc	2100
tataatcctgg atgccatcct gtttctgtat ggaattgtcc tcaccctcct ctactgtcga	2160
ctgaagatcc aagtgcgaaa ggcagctata accagctatg agaaatcaag agtgaagttc	2220
tccaggagcg cagatgcccc cgcttatcaa cagggccaga accagctcta caacgagctt	2280
aacctcgaaa ggcgcgaaga atacgacgtg ttggataaga gaagggggcg ggaccccgag	2340
atgggaggaa agcccccggag gaagaaccct caggaggcc tgtacaacga gctgcagaag	2400
gataagatgg ccgaggccta ctcagagatc gggatgaagg gggagccggcg ccgcgggaag	2460
ggcacatgcgatg ggctctacca gggctgagc acagccacaa aggacacata cgacgccttg	2520
cacatgcagg ccctccacc ccggta	2547