



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월15일
(11) 등록번호 10-2375033
(24) 등록일자 2022년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/4748 (2013.01)
A61K 39/001186 (2018.08)
(21) 출원번호 10-2019-7029977
(22) 출원일자(국제) 2018년03월15일
심사청구일자 2021년03월11일
(85) 번역문제출일자 2019년10월11일
(65) 공개번호 10-2019-0129082
(43) 공개일자 2019년11월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/022759
(87) 국제공개번호 WO 2018/170338
국제공개일자 2018년09월20일
(30) 우선권주장
62/471,956 2017년03월15일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2014118236 A2*
JP2016505635 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
프레드 헛친슨 켄서 리서치 센터
미국 워싱턴 98109, 시애틀, 1100 페어뷰 애버뉴
엔.,
(72) 발명자
차푸이스 오드
미국 98117 워싱턴주 시애틀 3023 엔더블유 95티
에이치 스트리트
슈미트 토마스
미국 98119 워싱턴주 시애틀 3033 4티에이치 예비
뉴 더블유
맥아피 메간
미국 98122 워싱턴주 시애틀 1123 32엔디 예비뉴
(74) 대리인
특허법인한성

전체 청구항 수 : 총 32 항

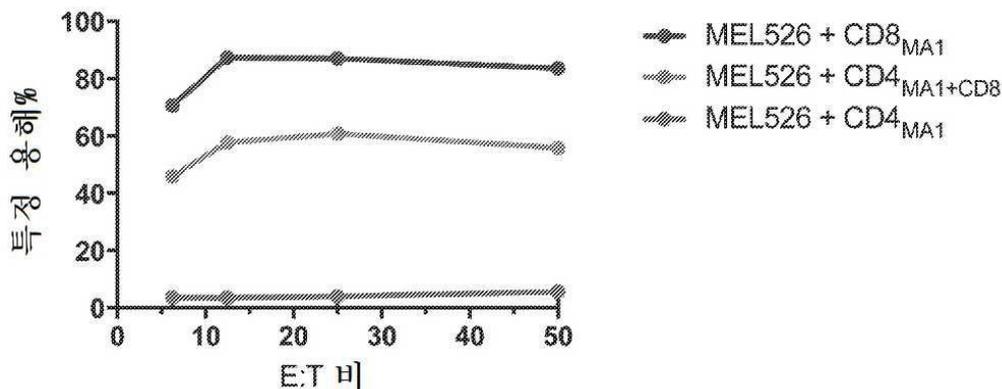
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **고친화도 MAGE-A1-특이적 TCR 및 이의 용도**

(57) 요약

본 개시내용은 다양한 종양 연관 항원(인간 MAGE-A1 에피토프를 포함)에 대해 높은 또는 향상된 친화도를 갖는 TCR, 이러한 고친화도 항원-특이적 TCR을 발현시키는 T 세포, 이를 암호화하는 핵산, 및 세포가 이들 항원 중 하나 이상을 과발현시키는 질환 또는 장애, 예컨대, 암을 치료하는 데 사용하기 위한 조성물을 제공한다.

대표도 - 도8c



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 35/02 (2018.01)

A61K 2039/5158 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

결합 단백질을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 단리된 변형 세포로서, 상기 암호화된 결합 단백질은

각각 서열 번호 48 내지 50의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 갖는 T 세포 수용체(TCR) α-쇄 가변(V_α) 도메인, 및 각각 서열 번호 45 내지 47의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 갖는 TCR β-쇄 가변(V_β) 도메인을 포함하고,

여기서 결합 단백질은 CD8과 독립적으로 또는 CD8의 부재하에 세포 표면 상에서 KVLEYVIKV(서열 번호 123):인간 백혈구 항원 (HLA)-A*0201 복합체에 특이적으로 결합할 수 있고,

여기서 상기 변형 세포는 CD4+ T 세포이고, CD8 공수용체의 적어도 세포의 부분을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 더 포함하는 것인,

단리된 변형 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 암호화된 결합 단백질은 10^{-8} M 이하의 K_d 로 KVLEYVIKV(서열 번호 123):HLA-A*201 복합체에 특이적으로 결합할 수 있는, 단리된 변형 세포.

청구항 3

제1항에 있어서, 암호화된 결합 단백질의 V_β 도메인은 TRBV30 대립유전자, TRBV29 대립유전자 또는 TRBV9 대립유전자로부터 유래된, 단리된 변형 세포.

청구항 4

제1항에 있어서, 암호화된 결합 단백질의 V_α 도메인은 TRAV38-1 대립유전자, TRAV34 대립유전자, TRAV16 대립유전자 또는 TRAV5 대립유전자로부터 유래된, 단리된 변형 세포.

청구항 5

결합 단백질을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 단리된 변형 세포로서, 상기 암호화된 결합 단백질은

각각 서열 번호 48 내지 50의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 갖는 TCR V_α 도메인, 및 각각 서열 번호 45 내지 47의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 갖는 TCR V_β 도메인을 포함하고,

여기서 결합 단백질은 CD8과 독립적으로 또는 CD8의 부재하에 세포 표면 상에서 KVLEYVIKV(서열 번호 123):인간 백혈구 항원 (HLA)-A*0201 복합체에 특이적으로 결합할 수 있고;

여기서,

(i) 암호화된 V_α 도메인은 서열 번호 19의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고;

(ii) 암호화된 V_β 도메인은 서열 번호 17의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고;

(iii) 상기 변형 세포는 CD4+ T 세포이고, CD8 공수용체의 적어도 세포의 부분을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 더 포함하는 것인,

단리된 변형 세포.

청구항 6

제1항 또는 제5항에 있어서, 암호화된 결합 단백질은 예비 결합 단백질 (pre-binding protein)이고 암호화된 V_{α} 도메인은 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진, 단리된 변형 세포.

청구항 7

제1항 또는 제5항에 있어서, 암호화된 결합 단백질은 예비 결합 단백질이고 암호화된 V_{β} 도메인은 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진, 단리된 변형 세포.

청구항 8

제1항 또는 제5항에 있어서, 서열번호 20의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 TCR α -쇄 불변 (C_{α}) 도메인을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드; 및/또는 서열번호 18의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 TCR β -쇄 불변 (C_{β}) 도메인을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 더 포함하는, 단리된 변형 세포.

청구항 9

제1항 또는 제5항에 있어서, 암호화된 결합 단백질은 예비 결합 단백질이고, 변형 세포는

(1)(a) 서열 번호 19를 포함하거나 이로 이루어진 V_{α} 도메인 및 (1)(b) 서열 번호 20을 포함하거나 이로 이루어진 C_{α} 도메인을 포함하는 TCR α -쇄 단백질원 (pre-protein) (1)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 (2)(a) 서열 번호 17을 포함하거나 이로 이루어진 V_{β} 도메인 및 (2)(b) 서열 번호 18을 포함하거나 이로 이루어진 C_{β} 도메인을 포함하는 TCR β -쇄 단백질원 (2)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 단리된 변형 세포.

청구항 10

제1항 또는 제5항에 있어서, 변형 세포는 인간 CD4+ T 세포인, 단리된 변형 세포.

청구항 11

제1항 또는 제5항에 있어서, 암호화된 CD8 공수용체의 적어도 세포의 부분이 전장 CD8 공수용체 α -쇄 및 전장 CD8 공수용체 수용체 β -쇄를 포함하는, 단리된 변형 세포.

청구항 12

제1항 또는 제5항에 있어서, 암호화된 CD8 공수용체의 적어도 세포의 부분이

- (i) 서열 번호 143의 CD8 공수용체 α -쇄 아미노산 서열; 및
- (ii) 서열 번호 144-145 중 어느 하나의 CD8 공수용체 β -쇄 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 변형 세포.

청구항 13

제12항에 있어서, 암호화된 CD8 공수용체의 적어도 세포의 부분이

- (i) 서열 번호 143의 CD8 공수용체 α -쇄 아미노산 서열; 및
- (ii) 서열 번호 144의 CD8 공수용체 β -쇄 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 변형 세포.

청구항 14

제1항 또는 제5항에 따른 변형 세포 및 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 MAGE-A1 발현과 연관된 과증식성 장애 치료용 조성물.

청구항 15

(i) 적어도 30%의 변형 CD4+ T 세포를 포함하는, 제14항의 조성물을

(ii) 세포 표면 상에서 KVLEYVIKV(서열 번호 123):인간 백혈구 항원 (HLA)-A*0201 복합체에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 단백질을 암호화하도록 변형된, 적어도 30%의 CD8+ T 세포를 포함하는 조성물과 조합되어 포함하는 단위 용량으로서,

여기서 변형 CD4+ T 세포 및 변형 CD8+ T 세포는 단위 용량에서 1:1 비율±20%로 존재하는 것인, 단위 용량.

청구항 16

제15항에 있어서, 단위 용량이,

동등한 수의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 갖는 환자 샘플에 비해,

단위 용량에 존재하는 미경험 T 세포의 집단의 50% 미만을 가지는 것인, 단위 용량.

청구항 17

(1) TCR V_α 도메인 및 TCR V_β 도메인을 가지는 결합 단백질, 여기서:

(i) 암호화된 V_α 도메인은 각각 서열 번호 48 내지 50의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 포함하고, 암호화된 V_β 도메인은 각각 서열 번호 45 내지 47의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 포함하고;

(ii) 암호화된 결합 단백질은 세포 표면 상에서 KVLEYVIKV(서열 번호 123):인간 백혈구 항원 (HLA)-A*0201 복합체에 특이적으로 결합할 수 있음; 및

(2) CD8 공수용체의 적어도 세포의 부분

을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 18

제17항에 있어서,

(i) 암호화된 V_α 도메인이 서열 번호 19의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일한 아미노산 서열을 포함하고,

(ii) 암호화된 V_β 도메인이 서열 번호 17의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일한 아미노산 서열을 포함하는,

단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 19

제18항에 있어서, 암호화된 결합 단백질이 예비 결합 단백질이고,

암호화된 V_α 도메인이 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어지고,

암호화된 V_β 도메인이 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어지는 것인,

단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 암호화된 결합 단백질이

TCR α-쇄 불변 (C_α) 도메인,

TCR β-쇄 불변 (C_β) 도메인, 또는

TCR α-쇄 불변 (C_α) 도메인 및 TCR β-쇄 불변 (C_β) 도메인 둘 다를 더 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 21

발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 단리된 발현 벡터.

청구항 22

발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 제20항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 단리된 발현 벡터.

청구항 23

제1항 또는 제5항에 따른 변형 세포를 포함하는, MAGE-A1 발현과 연관된 과증식성 장애를 치료하기 위한 약제.

청구항 24

제23항에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 항-PD-L1 항체와 병용하여 사용되는 약제.

청구항 25

제23항에 있어서, 과증식성 장애는 혈액학적 악성종양 또는 고형암인 약제.

청구항 26

제25항에 있어서, 혈액학적 악성종양은 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 호산구성 백혈병(CEL), 골수이형성 증후군(MDS), 비호지킨 림프종(NHL) 또는 다발성 골수종(MM)으로부터 선택되는 약제.

청구항 27

제25항에 있어서, 고형암은 비소세포 폐암(NSCLC), 삼중 음성 유방암 (TNBC), 난소암, 악성 흑색종, 결장암, 결장직장 선암종, 결장직장암, 담관암, 방광암, 뼈 및 연조직 암종, 뇌 종양, 유방암, 자궁경부암, 테스모이드 종양, 배아암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 위 선암종, 다형성 교모세포종, 부인과 종양, 두경부 편평 세포 암종, 간암, 폐암, 악성종피종, 골육종, 췌장암, 췌관 선암종, 원발성 성상세포종, 원발성 갑상선암, 전립선암, 신장암, 신세포 암종, 횡문근육종, 피부암, 연조직 육종, 고환 생식세포 종양, 요로 상피 세포암, 자궁 육종 또는 자궁암으로부터 선택되는 약제.

청구항 28

제23항에 있어서, CD4+ T 세포는 인간 CD4+ T 세포인, 약제.

청구항 29

결합 단백질을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 단리된 변형 인간 CD4+ T 세포로서, 상기 암호화된 결합 단백질은

(i) 각각 서열 번호 48 내지 50의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 T 세포 수용체(TCR) α-쇄 가변(V_α) 도메인; 및

(ii) 각각 서열 번호 45 내지 47의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 포함하는 TCR β 쇄 가변(V_β) 도메인을 포함하고,

여기서 암호화된 결합 단백질은 CD8과 독립적으로 또는 CD8의 부재하에 세포 표면 상에서 KVLEYVIKV(서열 번호 123):인간 백혈구 항원 (HLA)-A*0201 복합체에 특이적으로 결합할 수 있으며,

여기서 변형 인간 CD4+ T 세포가 CD8 공수용체의 적어도 세포의 부분을 암호화하는 이중 폴리뉴클레오타이드를 더 포함하고, 여기서 CD8 공수용체의 적어도 세포의 부분이

(i) 서열 번호 143의 CD8 공수용체 α-쇄 아미노산 서열; 및

(ii) 서열 번호 144-145 중 어느 하나의 CD8 공수용체 β-쇄 아미노산 서열을 포함하는,

단리된 변형 인간 CD4+ T 세포.

청구항 30

제29항에 있어서,

(a) V_{α} 도메인은 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, V_{α} 도메인은 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 C_{α} 도메인을 더 포함하는 TCR α -쇄 단백질원에 포함되고;

(b) V_{β} 도메인은 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, V_{β} 도메인은 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 C_{β} 도메인을 더 포함하는 TCR β -쇄 단백질원에 포함된,

단리된 변형 인간 CD4+ T 세포.

청구항 31

제30항에 있어서, 적어도 CD8 공수용체의 암호화된 세포 외 부분은

(i) 서열 번호 143의 CD8 공수용체 α -쇄 아미노산 서열; 및

(ii) 서열 번호 144의 CD8 공수용체 β -쇄 아미노산 서열을 포함하는,

단리된 변형 인간 CD4+ T 세포.

청구항 32

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 90과 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 88과 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

- 청구항 41
- 삭제
- 청구항 42
- 삭제
- 청구항 43
- 삭제
- 청구항 44
- 삭제
- 청구항 45
- 삭제
- 청구항 46
- 삭제
- 청구항 47
- 삭제
- 청구항 48
- 삭제
- 청구항 49
- 삭제
- 청구항 50
- 삭제
- 청구항 51
- 삭제
- 청구항 52
- 삭제
- 청구항 53
- 삭제
- 청구항 54
- 삭제
- 청구항 55
- 삭제
- 청구항 56
- 삭제

- 청구항 57
- 삭제
- 청구항 58
- 삭제
- 청구항 59
- 삭제
- 청구항 60
- 삭제
- 청구항 61
- 삭제
- 청구항 62
- 삭제
- 청구항 63
- 삭제
- 청구항 64
- 삭제
- 청구항 65
- 삭제
- 청구항 66
- 삭제
- 청구항 67
- 삭제
- 청구항 68
- 삭제
- 청구항 69
- 삭제
- 청구항 70
- 삭제
- 청구항 71
- 삭제
- 청구항 72
- 삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 서열목록에 관한 언급

[0002] 본 출원과 관련된 서열목록은 종이 사본 대신 텍스트 형식으로 제공되고, 본 명세서에 참고로 편입된다. 서열목록을 함유하는 텍스트 파일의 명칭은 360056_446WO_SEQUENCE_LISTING.txt이다. 텍스트 파일은 86.3KB이고, 2018년 3월 14일자로 생성되었으며, EFS-Web을 통해 전자적으로 제출된다.

배경 기술

[0003] 종양-특이적 T-세포의 입양 전달(adoptive transfer)은 존재하는 종양을 제거하기 위한 매력적인 전략이며, 존재하는 종양을 제거하고 재발을 방지하기 위해 생체내에서 항원-특이적 T 세포의 강한 집단의 확립을 필요로 한다(Stromnes *et al.*, *Immunol. Rev.* 257:145, 2014). 종양-특이적 CD8⁺ 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte: CTL)의 전달은 안전하며 선택 환자에서 직접적인 항-종양 활성을 매개할 수 있고(Chapuis *et al.*, *Cancer Res.* 72:LB-136, 2012; Chapuis *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 5:174ra127, 2013; Chapuis *et al.*, *Proc.*

Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 109:4592, 2012),²⁻⁴ 각각의 환자 또는 공여자로부터 단리된 CTL의 결합활성(avidity)의 가변성은 임상 시험에서 항-종양 효능을 제한한다(Chapuis *et al.*, 2013). TCR 친화도는 CTL 결합활성의 중요한 결정소이기 때문에(Zoete *et al.*, *Frontiers Immunol.* 4:268, 2013), 종양-특이적 항원에 특이적인 잘 특성규명된 T 세포 클론으로부터 단리된 고친화도 TCR α/β 유전자를 이용하여 공여자 또는 환자 T 세포의 항원 특이성을 전용하기 위한(redirect) 전략이 개발되었다(Stromnes *et al.*, *Immunol. Rev.* 257:145, 2014; Robbins *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 29:917, 2011). 자기/종양 반응성 TCR을 발현시키는 T 세포가 중추 및 말초 관용(peripheral tolerance)의 대상이기 때문에 이러한 고친화도 자기/종양 반응성 T 세포는 희귀하며(Stone and Kranz, *Frontiers Immunol.* 4:244, 2013), 상대적 TCR 친화도는 공여자 간에 크게 다르다. 따라서, 다수의 매칭된 공여자는 TCR α/β 유전자 요법 작제물로부터 생성될 수 있는 충분히 고친화도 종양-특이적 T 세포 클론을 동정하도록 선별되어야 한다. 예를 들어, 단일 HLA-대립유전자에 대한 고기능성 결합활성을 갖는 자연적으로 유발된 윌름 종양 항원 1(Wilms' Tumor antigen 1: WT1)-특이적 TCR의 단리는 75명 초과와 정상 공여자의 말초 레퍼토리로부터의 수천개의 개개 T 세포 클론을 나타내는 수백개의 WT-특이적 T 세포주의 선별, 매우 시간 및 노동 집약적인 공정이 필요하다(Chapuis *et al.*, 2013; Schmitt *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 20:1240, 2009; Ho *et al.*, *J. Immunol. Methods* 310:40, 2006).

발명의 내용

[0004] 다양한 암, 예컨대 백혈병 및 종양에 관한 대안의 항원-특이적 TCR에 대한 필요가 있다. 본 명세서에 개시된 실시형태는 이들 필요를 처리하며, 다른 관련된 이점을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0005] 도 1A 및 도 1B는 바이러스 항원에 대한 고친화도 T 세포가 매우 낮은 빈도(B)로 발견되는 자기-항원에 대한 고친화도 T 세포보다 더 높은 빈도(A)로 발견된다는 것을 도시하는 대표적인 데이터를 도시한 도면.

도 2a 및 도 2b는 각각 (a) 본 개시내용의 발명자에 의해 수행되는 T 세포 농축도 검정의 개략도, (b) 항원-특이적 CD8⁺ T 세포를 농축시키기 위해 사용되는 일련의 분류 실험으로부터의 유세포분석 데이터를 도시한 도면.

도 3은 MAGE-A1:HLA 사량체를 이용하는 본 개시내용의 TCR β CDR3 농축도 개략도로부터의 예시적 데이터를 도시한 도면.

도 4A 및 도 4B는 각각 (A) 본 개시내용의 방법을 이용하여 동정되는 TCR에 의한 MAGE-A1:HLA 사량체의 특이적 결합 및 (B) MAGE-A1-특이적 TCR의 농축도를 도시한 도면.

도 5a 내지 도 5c는 각각 (a) MAGE-A1:HLA 사량체에 결합하는 본 개시내용의 MAGE-A1-특이적 CD8⁺ T 세포를 나타내는 유세포분석 데이터, (b) 항원-발현성 U266 골수종 세포의 부재(좌) 또는 존재(우)하에 MAGE-A1-특이적 CD8⁺ T 세포에 의한 사이토카인 생산, 및 (c) 본 개시내용의 고친화도 MAGE-A1 TCR-형질도입된 CD8⁺ T 세포가 항원:MHC 사량체에 결합하고 MAGE-A1: MHC(A*0201)를 제시하는 세포를 사멸시킨다는 것을 나타내는 특정 용해 데이터를 제공하는 도면. (C)에서의 데이터는 CD8⁺ T 세포가 U266 세포 단독과 함께, 외인성 인터페론-감마(IFN γ)와 함께 또는 외인성 MAGE-A1 펩타이드와 함께 공동 배양된 표준 Cr⁵¹-방출 검정으로부터 유래되었다.

도 6a는 CD4⁺ T 세포가 펩타이드 항원에 특이적인 CD8⁺ T 세포로부터 둘 다 유래되는 TCR 및 CD8 공수용체를 발현시키기 위해 형질도입된 본 개시내용에 따른 면역요법 접근을 도시한 도면. 형질도입된 CD4⁺ T 세포의 활성화는 CD8⁺ T 세포, 예컨대 면역요법 상황에서 주입된 CTL의 항원 반응을 증가시키거나 또는 개선시킬 수 있다. 도 6b는 CD4⁺ T 세포가 CD8-독립적 MHC 클래스 I-제한된 TCR을 발현시키기 위해 형질도입되었지만, CD8 공수용체를 발현시키지 않는 본 개시내용의 발명자에 의해 수행된 실험 설계를 도시한 도면.

도 7a는 고친화도 CD8 항-MAGE-A1 TCR을 발현시키는 T 세포(CD8⁺ 및 CD4⁺)가 MAGE-A1:MHC 사량체에 대한 결합에 대해 검정되는 실험으로부터의 유세포분석 데이터를 도시한 도면. 도 7b는 MAGE-A1-특이적 T 세포에 의한 MAGE-A1:MHC 사량체에 대한 특이적 결합을 도시한 도면. 도 7c는 본 개시내용의 MAGE-A1-특이적 TCR을 발현시키는

CD8⁺ T 세포에 의한 표적 세포 용해(Cr⁵¹ 방출) 및 비슷한 CD4⁺ T 세포에 의한 사멸 결여를 도시한 도면.

도 8a는 CD4⁺ T 세포가 고친화도 MAGE A1 클래스 I TCR + CD8 α β 공수용체를 발현시키기 위해 형질도입되고 세포 발현 펩타이드:MHC의 존재하에 기능성에 대해 시험되는 본 개시내용의 발명자에 의해 수행되는 실험을 도시하는 개략도를 도시한 도면. 도 8b는 MAGE-A1 TCR과 CD8 공수용체 둘 다와 함께 형질도입된 더 높은 비율의 CD4⁺ T 세포가 MAGE-A1 TCR 단독을 발현시키는 CD4⁺ T 세포에 비해 사이토카인을 생산한다는 것을 도시한 도면. 도 8c는 표시된 T 세포에 의한 항원-제시 MEL526 흑색종 표적 세포의 특정 용해를 도시한 도면. 도 8d는 항원에 의한 자극 후 형질도입된 CD4⁺ T 세포의 두 그룹의 확장을 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0006] 소정의 양상에서, 본 개시내용은, 예를 들어, MAGE-A1 발현과 관련된 질환 또는 장애(예를 들어, 암)를 치료하는 데 사용될 수 있는 주조직 적합 복합체(major histocompatibility complex: MHC)(예를 들어, 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen), HLA)와 관련된 MAGE-A1 펩타이드 항원에 특이적인 결합 단백질을 포함하는 조성물 또는 암을 치료하는 입양 면역요법을 제공한다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용은 이러한 MAGE-A1-특이적 결합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드뿐만 아니라 MAGE-A1-특이적 결합 단백질(예를 들어, TCR)을 발현시키도록 변형된 숙주 세포를 제공한다.
- [0007] 다른 양상에서, 본 개시내용은 펩타이드 항원(예를 들어, MAGE-A1)에 특이적으로 결합할 수 있는 CD8⁺ T 세포로부터의 TCR을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 포함하고 선택적으로 CD8 공수용체 분자의 적어도 세포 외 부분을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 변형된 CD4⁺ T 세포를 제공한다.
- [0008] 배경기술의 방법에 의해, 종양은 이전의 정상 조직으로부터 생기기 때문에 T 세포-기반 면역요법에 대한 대부분의 종양 표적은 자가-항원이다. 예를 들어, 이러한 종양-연관 항원(tumor-associated antigen: TAA)은 암 세포에서 고수준으로 발현될 수 있지만, 발현되지 않을 수도 있거나 또는 다른 세포에서 최소로 발현될 수도 있다. 흉선에서 T 세포 발생 동안, 자가-항원에 약하게 결합하는 T 세포는 흉선에서 생존하도록 허용되며, 추가적인 발생 및 성숙을 겪을 수 있는 한편, 이러한 세포가 바람직하지 않은 자가면역 반응을 시작하기 때문에 자가-항원에 강하게 결합하는 T 세포는 제거된다. 따라서, T 세포는 외래 침입자에 반응하는 면역계를 준비하는 항원에 결합하는 상대적 능력(즉, 비-자기 항원의 인식)에 의해 분류되는 한편, 동시에 자가면역 반응(즉, 자가-항원의 인식)을 방지한다. 이 관용 메커니즘은 고친화도로 종양(자가) 항원을 인식할 수 있는 천연 유래 T 세포를 제한하고, 따라서, 종양 세포를 효과적으로 제거하는 T 세포를 제거한다. 결과적으로, 종양 항원에 특이적인 고친화도 TCR을 갖는 T 세포를 단리시키는 것은 대부분의 이러한 세포가 면역계에 의해 본질적으로 제거되기 때문에 어렵다.
- [0009] 본 개시내용은 MAGE-A1(MAGE-1, MAGE 패밀리를 구성원 A1, CT 1.1, 및 흑색종-항원 유전자 1로도 불림) 펩타이드에 특이적인 TCR, 예컨대 MAGE-A1 펩타이드에 특이적인 고친화도 TCR을 제공하되, 이러한 TCR을 발현시키는 세포는 CD8과 독립적인 MAGE-A1:HLA 복합체에 결합할 수 있다. 추가로, 이러한 TCR은 선택적으로 내인성 TCR에 비해 CD3 단백질에 더 효율적으로 결합할 수 있다.
- [0010] 단시간(약 6 내지 8주)에 HLA-매칭된 공여자의 거대 코호트로부터 T 세포 클론유형을 빠르게 그리고 동시에 선별하고 랭크하기 위한(친화도에 기반) 방법이 개발되었다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용은 대상체의 면역 세포(예를 들어, PBMC)의 존재하에 항원-특이적 pMHC 다량체의 제한적 농도를 이용함으로써 고친화도 TCR을 이용하여 세포를 농축시키는 방법을 제공한다. TCR α-쇄 및 β-쇄 쌍을 정확하게 동정하기 위해 생물정보학과 결합하여 TCRβ 레퍼토리 및 빈도 분석을 사용하였다. 이들 방법의 이점은 그들이 개개 TCR 클로닝과 대조적으로 다중 공여자로부터의 수천개의 클론의 TCR 친화도의 빠른 비교를 허용한다는 것이다.
- [0011] 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 소정의 실시형태에서 MAGE-A1 발현과 관련된 질환 및 병태의 치료를 위한 치료 효용을 가질 것이다. 이러한 질환은 과증식성 장애, 예컨대 혈액학적 악성종양 및 고형암의 다양한 형태를 포함한다. 이들 및 관련된 용도의 비제한적 예는 본 명세서에 기재되어 있으며, 예컨대 MAGE-A1 펩타이드에 특이적인 항상된 또는 고친화도 TCR을 발현시키는 재조합 T 세포의 사용에 의한 MAGE-A1 항원-특이적 T 세포 반응의 시험관내, 생체의 및 생체내 자극을 포함한다.
- [0012] 본 개시내용을 더 상세하게 제시하기 전에, 본 명세서에서 사용되는 소정의 용어의 정의를 제공하는 것은 이의

이해에 도움이 될 수 있다. 추가적인 정의가 본 개시내용 전체적으로 제시된다.

- [0013] 본 명세서에서, 임의의 농도 범위, 백분율 범위, 비율 범위 또는 정수 범위는 달리 표시되지 않는 한, 인용되는 범위 내의 임의의 정수의 값, 그리고 적절한 경우, 이의 분율(예컨대 정수의 1/10 및 1/100)을 포함하는 것으로 이해된다. 또한, 임의의 물리적 특징, 예컨대 중합체 서브유닛, 크기 또는 두께에 관한 본 명세서에 인용된 임의의 숫자 범위는, 달리 표시되지 않는 한, 인용되는 범위 내의 임의의 정수를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서 사용된 바와 같은 용어 "약"은, 달리 표시되지 않는 한, 표시된 범위, 값 또는 구조의 ± 20%를 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 단수의 용어는 열거된 성분 중 "하나 이상"을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 대안의(예를 들어, "또는") 사용은 대안 중 하나, 둘 다 또는 이들의 임의의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "포함한다(include)", "가진다" 및 "포함한다(comprise)"는 동시에 사용되며, 이의 용어 및 변형은 비제한적인 것으로 해석되는 것으로 의도된다.
- [0014] 추가로, 본 명세서에 기재된 구조 및 치환체의 다양한 조합으로부터 유래된 개개 화합물 또는 화합물의 그룹은 각각의 화합물 또는 화합물들의 그룹이 개개로 제시되는 것과 동일한 정도로 본 출원에 의해 개시된다는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 특정 구조 또는 특정 치환체의 선택은 본 개시내용의 범주 내이다.
- [0015] 용어 "로 본질적으로 이루어진"은 "포함하는"과 동일하지 않으며, 청구범위의 구체화된 물질 또는 단계, 또는 청구된 대상 물질의 기본적 특징에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것을 지칭한다. 예를 들어, 단백질 도메인, 영역 또는 모듈(예를 들어, 결합 도메인, 힌지 영역, 링커 모듈) 또는 단백질(하나 이상의 도메인, 영역 또는 모듈을 가질 수 있음)은, 조합하여, 도메인, 영역, 모듈 또는 단백질 길이의 최대 20%(예를 들어, 최대 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%)에 기여하고 도메인(들), 영역(들), 모듈(들) 또는 단백질의 활성(예를 들어, 결합 단백질의 표적 결합 친화도)에 실질적으로 영향을 미치지 않는(즉, 50% 초과만큼 활성을 감소시키지 않음, 예컨대 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% 또는 1% 이하) 연장, 결실, 돌연변이 또는 이들의 조합(예를 들어, 아미노- 또는 카복시-말단에서 또는 도메인 사이의 아미노산)을 포함할 때, 특정 아미노산 서열"로 본질적으로 이루어진다".
- [0016] 본 명세서에서 사용되는 "면역계 세포"는 2가지 주요 계통, 즉, 골수성 전구 세포(골수성 세포, 예컨대 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 거핵세포 및 과립구가 생기게 함) 및 림프계 전구 세포(림프계 세포, 예컨대 T 세포, B 세포 및 자연 살해(natural killer: NK) 세포가 생기게 함)가 생기게 하는 골수 내 조혈모세포로부터 유래된 면역계의 임의의 세포를 의미한다. 예시적인 면역계 세포는 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, CD4- CD8- 이중 음성 T 세포, $\gamma \delta$ T 세포, 조절 T 세포, 자연 살해 세포 및 수지상 세포를 포함한다. 대식세포 및 수지상 세포는 펩타이드와 복합체화된 APC 표면 상의 구조적 적합 복합체(MHC) 수용체가 T 세포 표면 상의 TCR과 상호작용할 때, T 세포를 활성화할 수 있는 전문화된 세포인 "항원 제시 세포" 또는 "APC"로서 지칭될 수 있다.
- [0017] "구조적 적합 복합체"(MHC)는 세포 표면에 펩타이드 항원을 전달하는 당단백질을 지칭한다. MHC 클래스 I 분자는 막 스패닝(spanning) α 쇠(3개의 α 도메인을 가짐) 및 비공유적으로 결합된 $\beta 2$ 마이크로글로불린을 갖는 이형이량체이다. MHC 클래스 II 분자는 2개의 막관통 당단백질, 즉, α 와 β 로 구성되는데, 이들 둘 다 막에 걸쳐있다. 각각의 쇠는 2개의 도메인을 가진다. MHC 클래스 I 분자는, 펩타이드:MHC 복합체가 CD8⁺ T 세포에 의해 인식되는 세포 표면에 사이토솔에서 유래된 펩타이드를 전달한다. MHC 클래스 II 분자는, 그들이 CD4⁺ T 세포에 의해 인식되는 세포 표면에 소포 시스템에서 유래된 펩타이드를 전달한다. 인간 MHC는 인간 백혈구 항원(HLA)으로서 지칭된다.
- [0018] "T 세포"는 흉선에서 성숙하고 T 세포 수용체(TCR)를 생산하는 면역계 세포이다. T 세포는 미경험(항원에 노출되지 않음; CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 및 CD45RA의 증가된 발현, 및 T_{CM}에 비해 CD45RO의 감소된 발현), 기억 T 세포(T_M)(항원-경험 및 장기간 생존), 및 효과기 세포(항원-경험, 세포독성)일 수 있다. T_M은 중심 기억 T 세포(T_{CM}, 미경험 T 세포에 비해 CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO 및 CD95의 증가된 발현, 및 CD54RA의 감소된 발현) 및 효과기 기억 T 세포(T_{EM}, 미경험 T 세포 또는 T_{CM}에 비해 CD62L, CCR7, CD28, CD45RA의 감소된 발현, 및 CD127의 증가된 발현)의 서브셋으로 추가로 분화될 수 있다. 효과기 T 세포(T_E)는 CD62L, CCR7, CD28의 발현이 감소되고, T_{CM}에 비해 그랜자임 및 퍼포린에 대해 양성인 항원-경험 CD8+ 세포독성 T 림프구를 지칭한다. 다른 예시적인 T 세포는 조절 T 세포, 예컨대 CD4+ CD25+(Foxp3+) 조절 T 세포 및 Treg17 세포뿐만 아니라 Tr1, Th3, CD8+CD28-, 및 Qa-1 제한 T 세포를 포함한다.
- [0019] "T 세포 수용체"(TCR)는 MHC 수용체에 결합된 항원 펩타이드에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 슈퍼패

밀리 구성원(가변 결합 도메인, 불변 도메인, 막관통 영역, 및 짧은 세포질 꼬리를 가짐; 예를 들어, 문헌 [Janeway *et al.*, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997] 참조)을 지칭한다. TCR은 세포 표면 상에서 또는 가용성 형태로 발견될 수 있고, 일반적으로 α 및 β 쇄(또한 각각 TCR α 및 TCR β 로서 알려짐), 또한 γ 및 δ 쇄(또한 각각 TCR γ 및 TCR δ 로서 알려짐)를 갖는 이형이량체로 구성된다. 면역글로불린과 같이, TCR쇄(예를 들어, α -쇄, β -쇄)의 세포외 부분은 2개의 면역글로불린 도메인, 즉, N-말단에서의 가변 도메인(예를 들어, α -쇄 가변 도메인 또는 V α , β -쇄 가변 도메인 또는 V β ; 전형적으로 카바트 넘버링(Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.)에 의거한 아미노산 1 내지 116, , 및 세포막에 인접한 하나의 불변 도메인(예를 들어, α -쇄 불변 도메인 또는 C α , 전형적으로 카바트에 의거한 아미노산 117 내지 259, β -쇄 불변 도메인 또는 C β , 전형적으로 카바트에 의거한 아미노산 117 내지 295)을 함유한다. 또한 면역글로불린과 같이, 가변 도메인은 프레임워크 영역(framework region: FR)에 의해 분리되는 상보성 결정 영역(complementary determining region: CDR)을 함유한다(예를 들어, 문헌[Jores *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 87:9138, 1990; Chothia *et al.*, *EMBO J.* 7:3745, 1988] 참조; 또한 문헌[Lefranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27:55, 2003] 참조). 천연 TCR의 V α 및 V β 는 일반적으로 유사한 구조를 갖는데, 각각의 가변 도메인은 4개의 보존된 FR 및 3개의 CDR을 포함한다. V α 도메인은 2개의 별개의 DNA 세그먼트, 즉, 가변 유전자 세그먼트 및 결합 유전자 세그먼트(V-J)에 의해 암호화되고; V β 도메인은 3개의 별개의 DNA 세그먼트, 가변 유전자 세그먼트, 다양성 유전자 세그먼트 및 결합 유전자 세그먼트(V-D-J)에 의해 암호화된다. 단일 V α 또는 V β 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하는 데 충분할 수 있다. 더 나아가, 특정 항원에 결합하는 TCR은 상보성 V α 또는 V β 도메인의 라이브러리를 각각 선별하기 위해 항원에 결합하는 TCR로부터의 V α 또는 V β 도메인을 이용하여 단리될 수 있다. 소정의 실시형태에서, TCR은 T 세포(또는 T 림프구) 상의 표면에서 발견되며, CD3 복합체와 회합된다. 본 개시내용에서 사용되는 바와 같은 TCR의 공급원은 다양한 동물 중, 예컨대 인간, 마우스, 래트, 토끼 또는 다른 포유류로부터 유래될 수 있다.

[0020] 본 명세서에서 사용되는 용어 "CD8 공수용체" 또는 "CD8"은 알파-알파 동종이량체 또는 알파-베타 이형이량체로서 세포 표면 당단백질 CD8을 의미한다. CD8 공수용체는 세포독성 T 세포(CD8⁺)의 기능을 보조하며, 그의 세포질 타이로신 인산화 경로를 통한 신호전달을 통해 작용한다(Gao and Jakobsen, *Immunol. Today* 21:630-636, 2000; Cole and Gao, *Cell. Mol. Immunol.* 1:81-88, 2004). 다섯(5)가지의 상이한 CD8 베타쇄(UniProtKB 식별자 P10966 참조) 및 단일 CD8 알파쇄(UniProtKB 식별자 P01732 참조)가 있다. CD8은 일반적으로 pMHC 클래스 I 복합체에 결합한다.

[0021] "CD4 공수용체" 또는 "CD4"는 항원-제시 세포와 상호 연락하는 TCR을 돕는 면역글로불린 공수용체 당단백질을 지칭한다(문헌[Campbell & Reece, *Biology* 909 (Benjamin Cummings, Sixth Ed., 2002)] 참조). CD4는 면역 세포, 예컨대 T 헬퍼 세포, 단핵구, 대식세포 및 수지상 세포 표면 상에서 발견되며, 세포 표면에서 발현되는 4개의 면역글로불린 도메인(D1 내지 D4)을 포함한다. 항원 제시 동안, CD4는 MHCII 분자의 상이한 영역에 결합하도록(CD4는 MHCII β 2에 결합하는 한편, TCR 복합체는 MHCII α 1/ β 1에 결합함) TCR 복합체와 함께 보충된다. 이론에 의해 구속되는 일 없이, TCR 복합체에 대한 근위는 CD4-회합된 키나제 분자가 CD3의 세포질 도메인 상에 존재하는 면역수용체 타이로신 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine activation motif: ITAM)를 인산화시키도록 허용하는 것으로 여겨진다. 이 활성화는 다양한 유형의 T 헬퍼 세포를 생산하기 위해 활성화된 TCR에 의해 생성된 신호를 증폭시키는 것으로 생각된다. CD4는 일반적으로 pMHC 클래스 II 복합체에 결합한다.

[0022] "CD3"은 6개 쇠의 다중-단백질 복합체이다(문헌[Abbas and Lichtman, 2003; Janeway *et al.*, p172 및 178, 1999] 참조). 포유류에서, 복합체는 CD3 γ 쇄, CD3 δ 쇄, 2개의 CD3 ϵ 쇄 및 CD3 ζ 쇄의 동종이량체를 포함한다. CD3 γ , CD3 δ 및 CD3 ϵ 쇄는 단일 세포의 면역글로불린 도메인을 함유하는 면역글로불린 슈퍼패밀리의 고도로 관련된 세포 표면 단백질이다. CD3 γ , CD3 δ 및 CD3 ϵ 쇄의 막관통 영역은 음으로 하전되는데, 이는 이들 쇠가 양으로 하전된 T 세포 수용체 쇠와 회합되도록 허용하는 특징이다. CD3 γ , CD3 δ 및 CD3 ϵ 쇄의 세포내 꼬리는 각각 면역수용체 타이로신계 활성화 모티프 또는 ITAM으로서 알려진 단일의 보존된 모티프를 함유하는 반면, 각각의 CD3 ζ 쇄는 셋을 가진다. 이론에 의해 구속되는 일 없이, ITAM은 TCR 복합체의 신호전달 능력에 중요한 것으로 여겨진다. 본 개시내용에서 사용되는 바와 같은 CD3은 인간, 마우스, 래트 또는 다른 포유류를 포함하는 다

양한 동물 종으로부터 유래될 수 있다.

- [0023] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "TCR 복합체"는 TCR과 CD3의 회합에 의해 형성되는 복합체를 지칭한다. 예를 들어, TCR 복합체는 CD3 γ 쇠, CD3 δ 쇠, 2개의 CD3 ϵ 쇠, CD3 ζ 쇠의 동종이량체, TCR α 쇠 및 TCR β 쇠로 구성될 수 있다. 대안적으로, TCR 복합체는 CD3 γ 쇠, CD3 δ 쇠, 2개의 CD3 ϵ 쇠, CD3 ζ 쇠의 동종이량체, TCR γ 쇠, 및 TCR δ 쇠로 구성될 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "TCR 복합체의 성분"은 TCR 쇠(즉, TCR α , TCR β , TCR γ 또는 TCR δ), CD3 쇠(즉, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ 또는 CD3 ζ), 또는 2 이상의 TCR 쇠 또는 CD3 쇠에 의해 형성된 복합체(예를 들어, TCR α 와 TCR β 의 복합체, TCR γ 와 TCR δ 의 복합체, CD3 ϵ 과 CD3 δ 의 복합체, CD3 γ 과 CD3 ϵ 의 복합체, 또는 TCR α , TCR β , CD3 γ , CD3 δ , 및 2개의 CD3 ϵ 쇠의 서브-TCR 복합체)를 지칭한다.
- [0025] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "결합 도메인"(또한 "결합 영역" 또는 "결합 모이어티"로서 지칭됨)은 표적(예를 들어, MAGE-A1, MAGE-A1 펩타이드:MHC 복합체)과 특이적으로 그리고 비공유적으로 회합하거나, 연합하거나 또는 합쳐지는 능력을 갖는 분자 또는 이의 일부(예를 들어, 펩타이드, 올리고펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질)를 지칭한다. 결합 도메인은 생물학적 분자, 분자 복합체(즉, 2개 이상의 생물학적 분자를 포함하는 복합체), 또는 관심 대상의 다른 표적에 대한 임의의 천연 유래, 합성, 반합성 또는 재조합적으로 생산된 결합 상대를 포함한다. 예시적인 결합 도메인은 생물학적 분자, 분자 복합체 또는 관심 대상의 다른 표적에 결합하는 그들의 특정 능력을 위해 선택된 단일쇄 면역글로불린 가변 영역(예를 들어, scTCR, scFv), 수용체 엑토도메인, 리간드(예를 들어, 사이토카인, 케모카인) 또는 합성 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는, "특이적으로 결합하는" 또는 "에 특이적인"은 10^5 M^{-1} 이상인 (이 결합 반응에 대해 온-속도(on-rate)[k_{on}] 대 오프-속도(off-rate)[k_{off}]의 비는 동일함) 친화도 또는 K_a (즉, 1/M 단위의 특정 결합 상호작용의 평형 결합 상수)로 표적 분자에 결합 단백질(예를 들어, TCR 수용체) 또는 결합 도메인(또는 이의 융합 단백질)이 회합 또는 연합하는 한편, 샘플 내 임의의 다른 분자 또는 성분과 상당히 회합 또는 연합하지 않는 것을 지칭한다. 결합 단백질 또는 결합 도메인(또는 이의 융합 단백질)은 "고친화도" 결합 단백질 또는 결합 도메인(또는 이의 융합 단백질)로서 또는 "저친화도" 결합 단백질 또는 결합 도메인(또는 이의 융합 단백질)으로서 분류될 수 있다. "고친화도" 결합 단백질 또는 결합 도메인은 K_a 가 적어도 10^7 M^{-1} , 적어도 10^8 M^{-1} , 적어도 10^9 M^{-1} , 적어도 10^{10} M^{-1} , 적어도 10^{11} M^{-1} , 적어도 10^{12} M^{-1} , 또는 적어도 10^{13} M^{-1} 인 해당 결합 단백질 또는 결합 도메인을 지칭한다. "저친화도" 결합 단백질 또는 결합 도메인은 10^7 M^{-1} 까지, 10^6 M^{-1} 까지, 10^5 M^{-1} 까지인 K_a 를 갖는 해당 결합 단백질 또는 결합 도메인을 지칭한다. 대안적으로, 친화도는 M의 단위(예를 들어, 10^{-5} M 내지 10^{-13} M)를 갖는 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수(K_d)로서 정의될 수 있다.
- [0027] 소정의 실시형태에서, 수용체 또는 결합 도메인은 "향상된 친화도"를 가질 수 있는데, 이는 표적 항원에 대해 야생형(또는 모) 결합 도메인보다 더 강한 결합을 갖는 선택된 또는 조작된 수용체 또는 결합 도메인을 지칭한다. 예를 들어, 향상된 친화도는 야생형 결합 도메인보다 더 큰 표적 항원에 대한 K_a (평형 해리 상수)에 기인하거나, 야생형 결합 도메인보다 더 적은 표적 항원에 대한 K_d (해리 상수)에 기인하거나, 야생형 결합 도메인보다 더 적은 표적 항원에 대한 오프-속도(k_{off})에 기인하거나, 또는 이들의 조합일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 향상된 친화도 TCR은 특정 숙주 세포, 예컨대 T 세포에서 발현을 향상시키도록 최적화된 코돈일 수 있다 (Scholten *et al.*, *Clin. Immunol.* 119:135, 2006).
- [0028] 특정 표적에 특이적으로 결합하는 본 개시내용의 결합 도메인을 동정할뿐만 아니라 결합 도메인 또는 융합 단백질 친화도를 결정하기 위한 다양한 검정, 예컨대 웨스턴 블롯, ELISA, 분석 초원심분리, 분광학 및 표면 플라즈몬 공명(비아코어(Biacore)(등록상표)) 분석은 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Scatchard *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660, 1949; Wilson, *Science* 295:2103, 2002; Wolff *et al.*, *Cancer Res.* 53:2560, 1993]; 및 미국 특허 제5,283,173호, 제5,468,614호 또는 동등물 참조).
- [0029] 용어 "MAGE-A1-특이적 결합 단백질"은 MAGE-A1 또는 이의 펩타이드 또는 단편에 특이적으로 결합하는 단백질 또는 폴리펩타이드를 지칭한다. 일부 실시형태에서, MAGE-A1-특이적 결합 단백질 또는 폴리펩타이드는, 예를 들어, 적어도, 또는 적어도 약 특정 친화도로 세포 표면 상에서 MHC 또는 HLA 분자와 복합체화된 MAGE-A1 또는 이의 펩타이드, 예컨대 MAGE-A1 펩타이드에 결합한다. 소정의 실시형태에서, MAGE-A1-특이적 결합 단백질은 약

10^{-8} M 미만, 약 10^{-9} M 미만, 약 10^{-10} M 미만, 약 10^{-11} M 미만, 약 10^{-12} M 미만, 또는 약 10^{-13} M 미만의 K_d 로, 또는, 예를 들어, 동일한 검정에 의해 측정하여, 본 명세서에 제공된 예시적인 MAGE-A1 특이적 결합 단백질, 예컨대 본 명세서에 제공된 임의의 MAGE-A1-특이적 TCR에 의해 나타난 친화도와 거의 동일하거나, 적어도 거의 동일하거나 또는 이상인 친화도로 MAGE-A1-유래 펩타이드:HLA 복합체(또는 MAGE-A1-유래 펩타이드:MHC 복합체)에 결합한다. 소정의 실시형태에서, MAGE-A1-특이적 결합 단백질은 MAGE-A1-특이적 면역글로불린 슈퍼패밀리 결합 단백질 또는 이의 결합 부분을 포함한다.

[0030] 친화도 또는 겔보기 친화도 또는 상대적 친화도를 평가하기 위한 검정은, 예를 들어, 다양한 농도의 사랑체에 대한 결합을 평가함으로써, 예를 들어, 표지된 사랑체를 이용하는 유세포분석에 의해 TCR에 대한(또는 TCR로부터 유래된 결합 도메인을 포함하는 결합 단백질에 대한) 겔보기 친화도를 측정하는 것을 포함한다. 일부 예에서, TCR의 겔보기 K_D 는 다양한 농도에서 표지된 사랑체의 2배 희석 다음에, 비선형 회귀에 의한 결합 곡선의 결정을 이용하여 측정되며, 겔보기 K_D 는 최대 절반의 결합을 수득한 리간드 농도로서 결정된다.

[0031] 용어 "MAGE-A1 결합 도메인" 또는 "MAGE-A1 결합 단편"은 특이적 MAGE-A1 결합을 초래하는 MAGE-A1-특이적 결합 단백질의 도메인 또는 부분을 지칭한다. MAGE-A1-특이적 결합 도메인 단독(즉, MAGE-A1-특이적 결합 단백질의 임의의 다른 부분 없음)은 가용성일 수 있으며, 약 10^{-8} M 미만, 약 10^{-9} M 미만, 약 10^{-10} M 미만, 약 10^{-11} M 미만, 약 10^{-12} M 미만 또는 약 10^{-13} M 미만의 K_d 로 MAGE-A1에 결합할 수 있다. 예시적인 MAGE-A1-특이적 결합 도메인은 MAGE-A1-특이적 scTCR(예를 들어, 단일쇄 α β TCR 단백질, 예컨대 $V\alpha$ -L- $V\beta$, $V\beta$ -L- $V\alpha$, $V\alpha$ C α -L- $V\alpha$ 또는 $V\alpha$ -L- $V\beta$ -C β , 여기서 $V\alpha$ 및 $V\beta$ 는 각각 TCR α 및 β 가변 도메인이고, C α 및 C β 는 각각 TCR α 및 β 불변 도메인이며, L은 링커임) 및 항-MAGE-A1 TCR 또는 항체로부터 유래될 수 있는 scFv 단편을 포함한다.

[0032] 항원 제시 세포(antigen presenting cell: APC)(예컨대, 수지상 세포, 대식세포, 림프구 또는 다른 세포 유형)에 의한 항원 처리의 원칙 및 면역적합성(예를 들어, 항원 제시에 적절한 MHC 유전자의 적어도 하나의 대립 유전자 형태를 공유) APC와 T 세포 사이의 구조적 적합 복합체(MHC)-제한 제시를 포함하는 APC에 의한 T 세포에 대한 항원제시의 원칙은 잘 확립되어 있다(예를 들어, 문헌[Murphy, Janeway's Immunobiology (8th Ed.) 2011 Garland Science, NY; chapters 6, 9 and 16] 참조). 예를 들어, 사이토졸(예를 들어, 종양 항원, 세포내 병원균)에서 유래된 가공된 항원 펩타이드는 일반적으로 길이가 약 7개의 아미노산 내지 약 11개의 아미노산이며, 클래스 I MHC 분자와 회합하는 한편, 소포 시스템(예를 들어, 박테리아, 바이러스)에서 가공된 펩타이드는 길이가 약 10개의 아미노산 내지 약 25개의 아미노산으로 다를 것이며, 클래스 II MHC 분자와 회합한다.

[0033] "MAGE-A1 항원" 또는 "MAGE-A1 펩타이드 항원"은 MHC(예를 들어, HLA) 분자와 복합체를 형성할 수 있고 이러한 복합체가 MAGE-A1 펩타이드:MHC(예를 들어, HLA) 복합체에 특이적인 TCR과 결합할 수 있는, 길이가 약 7개의 아미노산 내지 약 15개의 아미노산의 범위인 MAGE-A1 단백질의 자연적으로 또는 합성에 의해 생산된 부분을 지칭한다.

[0034] "링커"는 2개의 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 도메인, 영역 또는 모티프를 연결하는 아미노산 서열을 지칭하며, 얻어진 폴리펩타이드가 표적 분자에 대해 특이적 결합 친화도(예를 들어, scTCR)를 보유하거나 또는 신호 전달 활성(예를 들어, TCR 복합체)을 보유하도록 2개의 하위-결합 도메인의 상호작용에 적합한 스페이서 기능을 제공할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 링커는 약 2 내지 약 35개의 아미노산, 예를 들어, 또는 약 4개 내지 약 20개의 아미노산 또는 약 8 내지 약 15개의 아미노산 또는 약 15 내지 약 25개의 아미노산을 포함한다.

[0035] "접합 아미노산" 또는 "접합 아미노산 잔기"는 폴리펩타이드의 두 인접한 모티프, 영역 또는 도메인 사이의, 예컨대 결합 도메인과 인접한 불변 도메인 사이의 또는 TCR 쇄와 인접한 자기-절단성 펩타이드 사이의 하나 이상의(예를 들어, 약 2 내지 10개의) 아미노산 잔기를 지칭한다. 접합 아미노산은 융합 단백질의 작제물 설계(예를 들어, 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자의 작제 동안 제한 효소 부위의 사용으로부터 초래된 아미노산 잔기)로부터 초래될 수 있다.

[0036] "변경된 도메인" 또는 "변경된 단백질"은 적어도 85%(예를 들어, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%)의 야생형 모티프, 영역, 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질(예를 들어, 야생형 TCR α 쇄, TCR β 쇄, TCR α 불변 도메인, TCR β 불변 도메인)에 대해 비동일 서열 동일성을 갖는 모티프, 영역, 도메인, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질을 지칭한다.

- [0037] 본 명세서에서 사용되는, "핵산" 또는 "핵산 분자" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는, 예를 들어, 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)에 의해 또는 시험관내 번식에 의해 생성된 임의의 데옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA), 올리고뉴클레오타이드, 단편, 및 임의의 결찰, 절단, 엔도뉴클레아제 작용 또는 엑소뉴클레아제 작용에 의해 생성된 단편을 지칭한다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 핵산은 PCR에 의해 생산된다. 핵산은 천연 유래 뉴클레오타이드(예컨대 데옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드), 천연 유래 뉴클레오타이드의 유사체(예를 들어, 천연 유래 뉴클레오타이드의 α -거울상체 형태), 또는 이들 둘의 조합물인 단량체로 구성될 수 있다. 변형된 뉴클레오타이드는 당 모이어티, 또는 피리미딘 또는 퓨린 염기 모이어티에서의 변형 또는 대체를 가질 수 있다. 핵산 단량체는 이러한 결합의 포스포다이에스터 결합 또는 유사체에 의해 연결될 수 있다. 포스포다이에스터 결합의 유사체는 포스포로티오에이트, 포스포로다이티오에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로다이셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포로아닐리데이트, 포스포로아미테이트 등을 포함한다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥 중 하나일 수 있다.
- [0038] 용어 "단리된"은 물질이 그의 본래의 환경(예를 들어, 천연 유래라면 천연 환경)으로부터 제거된다는 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 존재하는 천연 유래 핵산 또는 폴리펩타이드는 단리되지 않지만, 천연 시스템에서 공동 존재하는 물질 중 일부 또는 모두로부터 분리된 동일한 핵산 또는 폴리펩타이드가 단리된다. 이러한 핵산은 벡터의 일부일 수 있었고/있거나 이러한 핵산 또는 폴리펩타이드는 조성물(예를 들어, 세포 용해물)의 부분일 수 있었으며, 이러한 벡터 또는 조성물은 핵산 또는 폴리펩타이드에 대한 천연 환경의 부분이 아니도록 여전히 단리된다. 용어 "유전자"는 폴리펩타이드 쇄를 생산하는 데 수반되는 DNA 세그먼트를 의미하며; 이는 암호화 영역인 "리더 및 트레일러(trailer)" 앞과 뒤의 영역뿐만 아니라 개개 암호화 세그먼트 사이의 개개 서열(엑손)을 포함한다.
- [0039] 본 명세서에서 사용되는 용어 "변형된", "조작된" 또는 "재조합"은 외인성 또는 이종성 핵산 분자의 도입에 의해 변형되는 인간 개입에 의해 유전자 조작된 세포, 미생물, 핵산 분자 또는 벡터를 지칭하거나, 또는 내인성 핵산 분자 또는 유전자의 발현이 제어되거나, 하향조절되거나 또는 구성적이 되도록 변경된 세포 또는 미생물을 지칭한다. 인간-생성된 유전자 변경은, 예를 들어, (프로모터와 같은 발현 제어 요소를 포함할 수 있는) 하나 이상의 단백질 또는 효소를 암호화하는 핵산 분자를 도입하는 변형, 또는 세포의 유전자 물질에 대한 다른 핵산 분자 첨가, 결실, 치환 또는 다른 기능성 파괴 또는 첨가를 포함할 수 있다. 예시적인 변형은 기준 또는 모 분자로부터의 이종성 또는 상동성 폴리펩타이드의 암호 영역 또는 이의 기능성 단편에서의 변형을 포함한다.
- [0040] 본 명세서에서 사용되는, "돌연변이"는 기준 또는 야생형 핵산 분자 또는 폴리펩타이드 분자에 비해 각각 핵산 분자 또는 폴리펩타이드 분자에서의 변화를 지칭한다. 돌연변이는 뉴클레오타이드(들) 또는 아미노산(들)의 치환, 삽입 또는 결실을 포함하는 서열에서의 몇몇 상이한 유형의 변화를 초래할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 돌연변이는 1 또는 3개의 코돈 또는 아미노산의 치환, 1 내지 약 5개의 코돈 또는 아미노산의 결실, 또는 이들의 조합이다.
- [0041] "보존적 치환"은 하나의 아미노산의 유사한 특성을 갖는 다른 아미노산으로의 치환으로서 당업계에서 인식된다. 예시적인 보존적 치환은, 예를 들어: WO 97/09433의 10 페이지; 문헌[Lehninger, Biochemistry, 2nd Edition; Worth Publishers, Inc. NY, NY, pp.71-77, 1975; 및 Lewin, Genes IV, Oxford University Press, NY and Cell Press, Cambridge, MA, p. 8, 1990]에 기재되어 있다. 아미노산의 보존적 치환은 자연적으로 생길 수 있거나 또는 결함 단백질 또는 TCR이 재조합적으로 생산될 때 도입될 수 있다. 아미노산 치환, 결실 및 첨가는 당업계에 공지된 돌연변이유발 방법을 이용하여 단백질에 도입될 수 있다(예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001] 참조). 올리고뉴클레오타이드-지시 부위-특이적(또는 세그먼트 특이적) 돌연변이유발 절차는 목적하는 치환, 결실 또는 삽입에 따라 변경된 특정 코돈을 갖는 변경된 폴리뉴클레오타이드를 제공하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 무작위 또는 포화 돌연변이유발 기법, 예컨대 알라닌 스캐닝 돌연변이유발, 오투 유발 중합효소 연쇄반응 돌연변이유발, 및 올리고뉴클레오타이드 지시 돌연변이유발은 면역원 폴리펩타이드 변이체를 제조하기 위해 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.*] 상기 참조).
- [0042] 용어 "작제물"은 재조합 핵산 분자를 함유하는 임의의 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 작제물은 벡터(예를 들어, 박테리아 벡터, 바이러스 벡터)에 존재할 수 있거나 또는 계놈에 통합될 수 있다.
- [0043] "벡터"는 다른 핵산 분자를 수송할 수 있는 핵산 분자이다. 벡터는, 예를 들어, 염색체, 비-염색체, 반-합성 또는 합성 핵산 분자를 포함할 수 있는 플라스미드, 코스미드, 바이러스, RNA 벡터 또는 선형 또는 원형 DNA 또는 RNA 분자일 수 있다. 예시적인 벡터는 그들이 연결된 핵산 분자(발현 벡터)의 자율적 복제(에피솜 벡터) 또는

발현을 가능하게 하는 것이다.

- [0044] 용어 "작동 가능하게 연결된" 또는 "작동 가능하게-연결된"은 하나의 기능이 다른 것에 의해 영향을 받도록 단일 핵산 분자 또는 단편 상에서의 2 이상의 분자의 회합을 지칭한다. 예를 들어, 프로모터는 해당 암호화 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있을 때 암호화 서열과 작동 가능하게 연결된다(즉, 암호화 서열은 프로모터의 전사 제어 하에 있다). "연결되지 않은"은 회합된 유전자 요소가 서로 가깝게 회합되지 않고 하나의 기능은 다른 것에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.
- [0045] 본 명세서에서 사용되는, "발현 벡터"는 적합한 숙주에서 핵산 분자의 발현을 달성할 수 있는 적합한 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 핵산 분자를 함유하는 DNA 작제물을 지칭한다. 이러한 제어 서열은 전사를 달성하기 위한 프로모터, 이러한 전사를 제어하기 위한 선택적 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 암호화하는 서열 및 전사 및 번역의 종결을 제어하는 서열을 포함한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 바이러스 또는 단순히 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 일단 적합한 숙주로 형질전환된다면, 벡터는 숙주 게놈과 독립적으로 복제하고 작용할 수 있거나, 또는 일부 예에서, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 본 명세서에서, "플라스미드", "발현 플라스미드", "바이러스" 및 "벡터"는 종종 상호 호환 가능하게 사용된다.
- [0046] 본 명세서에서 사용되는 용어 "발현"은 핵산 분자, 예컨대 유전자의 암호화 서열에 기반하여 폴리펩타이드가 생산되는 과정을 지칭한다. 상기 과정은 전사, 전사후 제어, 전사후 변형, 번역, 번역후 제어, 번역후 변형 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0047] 세포내에 핵산 분자를 삽입하는 것과 관련하여 용어 "도입된"은 "형질감염", 또는 "형질전환" 또는 "형질도입"을 의미하며, 진핵 또는 원핵 세포 내로 핵산 분자의 혼입에 대한 언급을 포함하되, 핵산 분자는 세포의 게놈(예를 들어, 염색체, 플라스미드, 플라스티드 또는 미토콘드리아 DNA)에 혼입되거나, 자율 복제로 전환되거나 또는 일시적으로 발현될 수 있다(예를 들어, 형질감염된 mRNA).
- [0048] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "이종성" 또는 "외인성" 핵산 분자, 작제물 또는 서열은 숙주 세포에 천연이 아니지만, 숙주 세포로부터의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 일부에 대해 상동성일 수 있는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 일부를 지칭한다. 이종성 또는 외인성 폴리뉴클레오타이드, 작제물 또는 서열의 공급원은 상이한 속 또는 종으로부터 유래될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 이종성 또는 외인성 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어, 접합, 형질전환, 형질감염, 전기천공법 등에 의해 숙주 세포 또는 숙주 게놈에 첨가되되(즉, 내인성 또는 천연이 아님), 첨가된 분자는 숙주 게놈에 통합될 수 있거나 또는 염색체외 유전자 물질로서(예를 들어, 플라스미드 또는 자가-복제 벡터의 다른 형태로서) 존재할 수 있고, 다중 복제물에 존재할 수 있다. 추가로, "이종성"은, 숙주 세포가 상동성 단백질 또는 활성을 암호화한다고 해도, 숙주 세포 내로 도입되는 외인성 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 비천연 효소, 단백질 또는 다른 활성을 지칭한다.
- [0049] 본 명세서에서 기재되는 바와 같은, 하나 초과외 이종성 또는 외인성 핵산 분자는 별개의 폴리뉴클레오타이드로서, 복수의 개개로 제어된 유전자로서, 다시스트론성(polycistronic) 폴리뉴클레오타이드로서, 융합 단백질을 암호화하는 단일 핵산 분자로서 또는 이들의 임의의 조합으로서 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 바와 같은, 숙주 세포는 MAGE-A1 항원 펩타이드에 특이적인 목적하는 TCR(예를 들어, TCR α 및 TCR β)을 암호화하는 2 이상의 이종성 또는 외인성 폴리뉴클레오타이드를 발현시키도록 변형될 수 있다. 2 이상의 외인성 핵산 분자가 숙주 세포에 도입될 때, 2 이상의 외인성 핵산 분자가 단일 폴리뉴클레오타이드로서(예를 들어, 단일 벡터 상에서) 도입될 수 있거나, 별개의 벡터 상에서 단일 부위 또는 다중 부위에서 숙주 염색체에 통합될 수 있거나, 또는 이들의 임의의 조합인 것이 이해된다. 언급된 이종성 핵산 분자의 수 또는 단백질 활성은 암호화 핵산 분자의 수 또는 단백질 활성의 수(숙주 세포에 도입된 별개의 폴리뉴클레오타이드의 수는 아님)를 지칭한다.
- [0050] 본 명세서에서 사용되는 용어 "내인성" 또는 "천연"은 숙주 세포에 정상적으로 존재하는 유전자, 단백질 또는 활성을 지칭한다. 게다가, 모 유전자, 단백질 또는 활성에 비해 돌연변이되거나, 과발현되거나, 서플링되거나, 중복되거나 또는 달리 변경된 유전자, 단백질 또는 활성은 해당 특정 숙주 세포에 대해 내인성 또는 천연인 것으로 여전히 고려된다. 예를 들어, 제1 유전자로부터의 내인성 제어 서열(예를 들어, 프로모터, 번역 감쇠 서열)은 제2 천연 유전자 또는 핵산 분자의 발현을 변경시키거나 또는 조절하기 위해 사용될 수 있되, 제2 천연 유전자 또는 핵산 분자의 발현 또는 조절은 모 세포에서의 정상 발현 또는 조절과 상이하다.
- [0051] 용어 "상동성" 또는 "상동체"는 숙주 세포, 종 또는 균주에서 발견되거나 또는 유래된 분자 또는 활성을 지칭한다. 예를 들어, 이종성 또는 외인성 핵산 분자는 천연 숙주 세포 유전자에 대해 상동성일 수 있고, 그리고 선택

적으로 변경된 발현 수준, 상이한 서열, 변경된 활성 또는 이들의 임의의 조합을 가질 수 있다.

- [0052] 본 명세서에서 사용되는 "서열 동일성"은, 필요하다면, 서열 동일성 최대 백분율을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후에, 그리고 서열 동일성의 부분으로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않고, 다른 기준 폴리펩타이드 서열 내 아미노산 잔기와 동일한 하나의 서열 내 아미노산 잔기의 백분율을 지칭한다. 서열 동일성 값의 백분율은 문헌[Altschul *et al.* (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402]에 나타난 바와 같은 NCBI BLAST2.0 소프트웨어를 이용하여 생성될 수 있으며, 매개변수는 디폴트 값으로 설정한다.
- [0053] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "조혈 전구 세포"는 조혈모세포 또는 태아 조직으로부터 유래될 수 있고, 성숙 세포 유형(예를 들어, 면역계 세포)으로 추가로 분화될 수 있는 세포이다. 예시적인 조혈 전구체 세포는 CD24^{lo} Lin⁻ CD117⁺ 표현형 또는 흉선에서 발견되는 것을 갖는 것(전구체 흉선세포로서 지칭됨)을 포함한다.
- [0054] 본 명세서에서 사용되는 용어 "숙주"는 관심 대상의 폴리펩타이드를 생산하기 위해 이종성 또는 외인성 핵산 분자(예를 들어, 높은 또는 향상된 친화도 항-MAGE-A1 TCR)로 유전자 변형에 대해 표적화된 세포(예를 들어, T 세포) 또는 미생물을 지칭한다. 소정의 실시형태에서, 숙주 세포는 선택적으로 이종성 또는 외인성 단백질의 생합성과 관련된 또는 관련없는 목적하는 특성을 부여하는 다른 유전자 변형(예를 들어, 검출 가능한 마커; 결실된, 변경된 또는 절단된 내인성 TCR; 증가된 공자극 인자 발현의 포함)을 이미 갖거나 또는 이들을 포함하도록 변형될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 숙주 세포는 MAGE-A1 항원 펩타이드에 특이적인 TCR α 쇄를 암호화하는 이종성 또는 외인성 핵산 분자로 형질도입된 인간 조혈 전구체 세포이다.
- [0055] 본 명세서에서 사용되는, "과증식성 장애"는 정상 또는 비질환 세포에 비해 과도한 성장 또는 증식을 지칭한다. 예시적인 과증식성 장애는 종양, 암, 신생물 조직, 암종, 육종, 악성세포, 전암성 세포뿐만 아니라 비-신생물 또는 비악성종양 과증식성 장애(예를 들어, 선종, 섬유종, 지방종, 평활근종, 혈관종, 섬유증, 재협착증뿐만 아니라 자가면역질환, 예컨대 류마티스 관절염, 골관절염, 건선, 염증성 장 질환 등)를 포함한다.
- [0056] MAGE-A1 항원 펩타이드에 특이적인 결합 단백질
- [0057] 소정의 양상에서, 본 개시내용은 MAGE-A1 또는 MAGE-A1 펩타이드 항원, 예컨대 HLA 분자와 복합체화된 MAGE-A1 펩타이드에 특이적으로 결합하는 결합 단백질(예를 들어, TCR, 단일쇄 TCR(scTCR) 또는 CAR)을 암호화하는 이종성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 변형된 세포를 제공한다.
- [0058] 배경기술의 방법에 의해, 면역요법에 대한 이상적인 표적은 악성종양 조직에서 고발현을 갖고 정상 조직에서 제한된 발현을 갖거나 발현이 없는 면역원성 단백질이다. 암/고환 항원(cancer/testis antigen: CTA)으로서 알려진 단백질의 독특한 그룹은 다양한 악성종양 조직에서의 그들의 발현 그러나 고환의 생식 세포를 제외하고 건강한 성인 조직에서의 저수준의 발현에 기인하여 현저한 면역치료적 표적으로서 동정되었다(Ademuyiwa *et al.* *PLoS One*, 7(6):e38783 (2012); Badovinac Crnjevic *et al.*, *Med Oncol.*, 29(3):1586-91 (2012); Curigliano, G. *et al.*, *Ann. Oncol.*, 22(1):98-103 (2011). 게다가, CTA는 특히 더 고등급의 병변 및 응집성 악성종양에서 발견되며, 더 불량한 임상 결과와 관련된다(Barrow *et al.*, *Clin Cancer Res.*, 12(3 Pt 1):764-71 (2006); Gure, *et al.* *Clin Cancer Res.*, 11(22):8055-62 (2005); Velazquez *et al.*, *Cancer Immun.*, 7: 11 (2007)). MAGE 패밀리 단백질은 다수의 종양 유형, 예컨대 흑색종, 폐, 난소, 다발성 골수종뿐만 아니라 TNBC에서 광범위하게 발현되는 CTA이다. 문헌[Simpson, A.J., *et al.*, Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer, *Nat. Rev. Cancer*, 2005. 5(8):615-25; Weon, J.L. and P.R. Potts, *Curr Opin Cell Biol*, 2015. 37: 1-8; Park, T.S., *et al.*, *J Immunother*, 2016. 39(1): 1-7; Li, X., S.C. Hughes, and R. Wevrick, *Cancer Genet*, 2015. 208(1-2):25-34; Kerkar, S.P., *et al.*, *J Immunother*, 2016. 39(4):181-7]. 특히, MAGE-A1은 TNBC 사례 전체의(n=81) 69.1%에서 그리고 III 등급 사례의 85.7%에서 발현된다. 문헌[Mrklic, I., *et al.*, *Acta Histochem*, 2014. 116(5): 740-6] 참조. 추가적으로, 흑색종 세포주로부터의 증거는 MAGE-A1이 종양 형성을 직접적으로 유도한다는 것을 시사한다. 문헌[Wang, D., *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. 473(4): 959-65].
- [0059] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 단백질은 (a) 서열번호 26, 32, 38, 44, 50 또는 51 중 어느 하나에 따른 CDR3 아미노산 서열을 갖는 T 세포 수용체(TCR) α -쇄 가변(V α) 도메인, 및 TCR β -쇄 가변(V β) 도메인; (b) 서열번호 23, 29, 35, 41 또는 47 중 어느 하나에 따른 CDR3 아미노산 서열을 갖는 V β 도메인, 및 V α 도메인; 또는 (c) 서열번호 26, 32, 38, 44, 50 또는 51 중 어느 하나에 따른 CDR3 아미노산 서열을 갖는 V α

도메인, 및 서열번호 23, 29, 35, 41 또는 47 중 어느 하나에 따른 CDR3 아미노산 서열을 갖는 V_{β} 도메인을 포함한다.

[0060] 펩타이드-MHC 복합체, 예컨대 MAGE-A1 펩타이드:MHC 복합체는 TCR V_{α} 및 TCR V_{β} 도메인에 의해 인식되고 이를 통해 결합된다. 림프구 발생 동안, V_{α} 엑손은 상이한 가변 및 결합 유전자 세그먼트(V-J)로부터 조립되고, V_{β} 엑손은 상이한 가변, 다양성 및 결합 유전자 세그먼트(V-D-J)로부터 조립된다. TCR α 염색체 좌위는 70 내지 80 개의 가변 유전자 세그먼트 및 61개의 결합 유전자 세그먼트를 가진다. TCR β 염색체 좌위는 52개의 가변 유전자 세그먼트, 및 6 또는 7개의 결합 유전자 세그먼트와 함께 단일 다양성 유전자 세그먼트를 각각 함유하는 2개의 별개의 클러스터를 가진다. 기능성 V_{α} 및 V_{β} 유전자 엑손은 V_{α} 에 대해 결합 유전자 세그먼트를 갖는 가변 유전자 세그먼트, 및 V_{β} 에 대해 다양성 유전자 세그먼트 및 결합 유전자 세그먼트를 갖는 가변 유전자 세그먼트의 재조합에 의해 생성된다.

[0061] TCR V_{α} 및 V_{β} 도메인은 각각 펩타이드-MHC 복합체와 접촉되는 상보성 결정 영역(CDR)으로서도 지칭되는 3개의 추가변 루프를 포함한다. CDR1 및 CDR2는 가변 유전자 세그먼트 내에서 암호화되는 반면, CDR3은 V_{α} 에 대해 가변 및 결합 세그먼트에 걸쳐있는 영역, 또는 V_{β} 에 대해 가변, 다양성 및 결합 세그먼트에 걸쳐있는 영역에 의해 암호화된다. 따라서, V_{α} 또는 V_{β} 의 가변 유전자 세그먼트의 동일성이 알려져 있다면(예를 들어, 공지된 TRAV 또는 TRVB 대립유전자에 의함), 그들의 대응하는 CDR1 및 CDR2의 서열은 추론될 수 있다. 게다가, MAGE-A1(예를 들어, 고친화도 CDR3 서열을 가짐으로써 동정되는 것)에 특이적인 소정의 현재 개시된 고친화도 TCR 가변 영역은 선택 TCR α 대립유전자 또는 TCR β 대립유전자에 의해 암호화된다. 소정의 실시형태에서, 암호화된 결합 도메인은 TRBV30 대립유전자, TRBV29 대립유전자 또는 TRBV9 대립유전자로부터 유래된 V_{β} 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 암호화된 결합 도메인은 TRAV38-1 대립유전자, TRAV34 대립유전자, TRAV16 대립유전자 또는 TRAV5 대립유전자로부터 유래된 V_{α} 도메인을 포함한다.

[0062] TCR 가변 도메인 서열은 넘버링 체계(국제 면역유전자 정보 시스템(International Immunogenetics Information System: IMGT) 및 Aho)에 대해 정렬되어, 동등한 잔기 위치가 주석이 달리고 상이한 분자는 항원 수용체 넘버링 및 수용체 분류(Antigen receptor Numbering And Receptor Classification: ANARCI) 소프트웨어 툴을 이용하여 비교되도록 허용할 수 있다(2016, Bioinformatics 15:298-300). 넘버링 체계는 TCR 가변 도메인에서 프레임워크 영역 및 CDR에서 표준화된 묘사를 제공한다.

[0063] 소정의 실시형태에서, 결합 단백질은 본 명세서에 개시된 기준 아미노산 서열에 비해 기능성 변이체 아미노산 서열을 포함하되, 암호화된 결합 단백질은 기준 아미노산 서열을 포함하는 결합 단백질에 비해 결합 특징을 보유한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 암호화된 V_{α} 도메인은 서열번호 3, 7, 11, 15 및 19 중 어느 하나에 따른 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90% 동일한(예를 들어, 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하고, 암호화된 V_{β} 도메인은 서열번호 1, 5, 9, 13, 17 중 어느 하나에 따른 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 단, (a) CDR 중 적어도 셋 또는 넷은 서열의 변화가 없되, 서열 변화를 갖는 CDR은 단지 2개까지의 아미노산 치환, 인접한 5개까지의 아미노산 결실, 또는 이들의 조합을 갖고, 그리고 (b) 암호화된 결합 단백질은 CD8과 독립적으로 또는 이의 부재하에 MAGE-A1 펩타이드:HLA 세포 표면 복합체 복합체에 특이적으로 결합할 수 있게 남아있다.

[0064] 특정 실시형태에서, (a) V_{α} 도메인은 (i) 서열번호 24, 30, 36, 42 및 48 중 어느 하나에 따른 CDR1 아미노산 서열, 및/또는 (ii) 서열번호 25, 31, 37, 43 및 49 중 어느 하나에 따른 CDR2 아미노산 서열을 포함하고; 그리고/또는 (b) 암호화된 V_{β} 도메인은 (iii) 서열번호 21, 27, 33, 39 및 45 중 어느 하나에 따른 CDR1 아미노산 서열, 및/또는 (iv) 서열번호 22, 28, 34, 40 및 46 중 어느 하나에 따른 CDR2 아미노산 서열을 포함한다. 추가 실시형태에서, 암호화된 결합 단백질은 (a) 각각 서열번호 24 내지 26에 따른 V_{α} CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열, 및 각각 서열번호 21 내지 23에 따른 V_{β} CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열; (b) 각각 서열번호 30 내지 32에 따른 V_{α} CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열, 및 각각 서열번호 27 내지 29에 따른 V_{β} CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열; (c) 각각 서열번호 36 내지 38에 따른 V_{α} CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열, 및 각각 서열번호 33 내지 35에 따른 V_{β} CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열; (d) 각각 서열번호 42 내지 44에 따른 V_{α} CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열, 및 각각 서열번호 39 내지 41에 따른 V_{β} CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열; 또는 (e) 각각 서열번호 48 내지 50에 따른 V_{α} CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열, 및 각각 서열번호 45 내지 47에 따른 V_{β} CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 포함한다.

- [0065] 소정의 실시형태에서, V α 도메인은 서열번호 3, 7, 11, 15 또는 19에 따른 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이들로 이루어진다. 추가 실시형태에서, 암호화된 V β 도메인은 서열번호 1, 5, 9, 13 또는 17에 따른 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이들로 이루어진다.
- [0066] 일부 실시형태에서, 결합 단백질은 TCR α -쇄 불변 도메인, TCR β -쇄 불변 도메인, 또는 둘 다를 포함한다. 소정의 실시형태에서, TCR α -쇄 불변(C α) 도메인은 서열번호 4, 8, 12, 16 또는 20 중 어느 하나의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 가진다. 추가 실시형태에서, TCR β -쇄 불변(C β) 도메인은 서열번호 2, 6, 10, 14 또는 18의 아미노산 서열 중 어느 하나에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 가진다.
- [0067] 따라서, 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 결합은 V α 도메인, V β 도메인, C α 도메인 및 C β 도메인을 포함한다. 추가 실시형태에서, 결합 단백질은 서열번호 3을 포함하거나 또는 서열번호 3으로 이루어진 V α 도메인, 서열번호 1을 포함하거나 또는 서열번호 1로 이루어진 V β 도메인, 서열번호 4를 포함하거나 또는 서열번호 4로 이루어진 C α 도메인, 및 서열번호 2를 포함하거나 또는 서열번호 2로 이루어진 C β 도메인을 포함한다. 다른 실시형태에서, 결합 단백질은 서열번호 7을 포함하거나 또는 서열번호 7로 이루어진 V α 도메인, 서열번호 5를 포함하거나 또는 서열번호 5로 이루어진 V β 도메인, 서열번호 8을 포함하거나 또는 서열번호 8로 이루어진 C α 도메인, 및 서열번호 6을 포함하거나 또는 서열번호 6으로 이루어진 C β 를 포함한다. 또한 추가 실시형태에서, 결합 단백질은 서열번호 11을 포함하거나 또는 서열번호 11로 이루어진 V α 도메인, 서열번호 9를 포함하거나 또는 서열번호 9로 이루어진 V β 도메인, 서열번호 12를 포함하거나 또는 서열번호 12로 이루어진 C α 도메인 및 서열번호 10을 포함하거나 또는 서열번호 10으로 이루어진 C β 도메인을 포함한다. 다른 실시형태에서, 결합 단백질은 서열번호 15를 포함하거나 또는 서열번호 15로 이루어진 V α 도메인, 서열번호 13을 포함하거나 또는 서열번호 13으로 이루어진 V β 도메인, 서열번호 16을 포함하거나 또는 서열번호 16으로 이루어진 C α , 및 서열번호 14를 포함하거나 또는 서열번호 14로 이루어진 C β 도메인을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 결합 단백질은 서열번호 19를 포함하거나 또는 서열번호 19로 이루어진 V α 도메인, 서열번호 17을 포함하거나 또는 서열번호 17로 이루어진 V β 도메인, 서열번호 20을 포함하거나 또는 서열번호 20으로 이루어진 C α 도메인, 및 서열번호 18을 포함하거나 또는 서열번호 18로 이루어진 C β 도메인을 포함한다.
- [0068] 본 명세서에 개시된 임의의 실시형태에서, 결합 단백질(예를 들어, 가용성 형태 또는 본 개시내용의 변형된 세포의 세포 표면 상에서 발현됨)은 CD8과 독립적으로 또는 이의 부재하에 세포 표면 상에서 MAGE-A1:HLA-A*201 복합체(예를 들어, KVLEYVIKV(서열번호 123):HLA-A*201 복합체)에 결합할 수 있다.
- [0069] 소정의 실시형태에서, 임의의 앞서 언급한 MAGE-A1 특이적 결합 단백질은 각각의 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체 또는 TCR의 항원-결합 단편이고, 이 중 어떤 것은 키메라, 인간화 또는 인간일 수 있다. 추가 실시형태에서, TCR의 항원-결합 단편은 단일쇄 TCR(scTCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함한다. 소정의 실시형태에서, MAGE-A1 특이적 결합 단백질은 TCR, 선택적으로 scTCR이다. 조작된 TCR을 생산하는 방법은, 예를 들어, 문헌[Bowerman *et al.*, *Mol. Immunol.*, 46(15):3000 (2009)]에 기재되어 있다, 이의 기법은 본 명세서에 참고로 편입된다. 소정의 실시형태에서, MAGE-A1-특이적 결합 도메인은 MAGE-A1-특이적 TCR 결합 도메인을 포함하는 CAR이다(예를 들어, 문헌[Walseng *et al.*, *Scientific Reports* 7:10713 (2017)]을 참조하며, 이의 TCR CAR 작제물은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 편입된다). CAR의 제조 방법은 또한, 예를 들어, 미국 특허 제 6,410,319호; 미국 특허 제 7,446,191호; 미국 특허 공개 제 2010/065818호; 미국 특허 제 8,822,647; 국제 특허 출원 공개 WO 2014/031687; 미국 특허 제 7,514,537호; 및 문헌[Brentjens *et al.*, 2007, *Clin. Cancer Res.* 13:5426]에 기재되어 있으며, 이의 기법은 본 명세서에 참고로 편입된다.
- [0070] 예로서 재조합적으로 생산된 가용성 TCR을 단리시키고 정제하는 데 유용한 방법은 재조합 가용성 TCR을 배양 배지에 분비하는 적합한 숙주 세포/백터로부터 상청액을 얻는 단계 및 이어서 상업적으로 입수 가능한 필터를 이용하여 배지를 농축시키는 단계를 포함할 수 있다. 농축 후에, 농축물은 단일의 적합한 정제 기질에 또는 일련의 적합한 기질, 예컨대 친화도 기질 또는 이온 교환 수지에 적용될 수 있다. 하나 이상의 역상 HPLC 단계는 재조합 폴리펩타이드를 추가로 정제하기 위해 사용될 수 있다. 이들 정제 방법은 또한 면역원을 그의 천연 환경으로부터 단리시킬 때 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 단리된/재조합 가용성 TCR 중 하나 이상의 대규모 생산 방법은 회분식 세포 배양(batch cell culture)을 포함하는데, 이는 적절한 배양 조건을 유지하기 위해 모니터링되고 수집된다. 가용성 TCR의 정제는 본 명세서에 기재되고 당업계에 공지된 방법에 따라 수행될 수 있으며, 국내 및 외국 규제기관의 법 및 가이드라인을 따른다.
- [0071] 소정의 실시형태에서, MAGE-A1에 특이적인 결합 단백질 또는 고친화도 TCR을 암호화하는 핵산 분자는 입양 전달 요법에서 사용하기 위해 숙주 세포(T 세포)를 형질감염/형질도입하기 위해 사용된다. TCR 서열분석의 진보가 기

재되어 있고(예를 들어, 문헌[Robins *et al.*, *Blood* 114:4099, 2009; Robins *et al.*, *Sci. Translat. Med.* 2:47ra64, 2010; Robins *et al.*, (Sept. 10) *J. Imm. Meth.* Epub ahead of print, 2011; Warren *et al.*, *Genome Res.* 21:790, 2011]) 본 개시내용에 따른 실시형태를 실행하는 과정에서 사용될 수 있다. 유사하게, T 세포에 목적하는 핵산을 형질감염/형질도입하기 위한 방법은, HLA 수용체와 복합체화된 MAGE-A1 펩타이드 항원에 특이적인 고친화도 TCR로 지향된 것을 비롯하여, 본 명세서의 교시에 기반하여, 본 명세서에 개시된 실시형태에 대한 이들 방법의 적용이 상정되도록, 목적하는 항원-특이성의 T 세포를 이용하는 입양 전달 절차를 갖는 것으로(예를 들어, 문헌[Schmitt *et al.*, *Hum. Gen.* 20:1240, 2009; Dossett *et al.*, *Mol. Ther.* 17:742, 2009; Till *et al.*, *Blood* 112:2261, 2008; Wang *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 18:712, 2007; Kuball *et al.*, *Blood* 109:2331, 2007; US 2011/0243972; US 2011/0189141; Leen *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 25:243, 2007]) 기재되어 있다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2004/0087025호).

[0072] 본 명세서에 기재된 바와 같은 MAGE-A1-특이적 결합 단백질 또는 도메인은 T 세포 결합, 활성화 또는 유도의 결정을 포함하고 그리고 또한 항원-특이적인 T 세포 반응의 결정을 포함하는, T 세포 활성을 검증하기 위한 임의의 다수의 당업계에 허용되는 방법에 따라 기능적으로 특성규명될 수 있다. 예는 T 세포 증식, T 세포 사이토카인 방출, 항원-특이적 T 세포 자극, MHC 제한된 T 세포 자극, CTL 활성(예를 들어, 사전 부하된 표적 세포로부터 ⁵¹Cr 방출을 검출함으로써), T 세포 표현형 마커 발현의 변화 및 T-세포 기능의 다른 측정의 결정을 포함한다. 이들 및 유사한 검정을 수행하는 절차는, 예를 들어, 문헌[Lefkowitz (*Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*, 1998)]에서 찾을 수 있다. 또한 문헌[*Current Protocols in Immunology*; Weir, *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell Scientific, Boston, MA (1986); Mishell and Shigii (eds.) *Selected Methods in Cellular Immunology*, Freeman Publishing, San Francisco, CA (1979); Green and Reed, *Science* 281:1309 (1998)] 및 이에 인용된 참고문헌을 참조한다.

[0073] "MHC-펩타이드 사랑체 염색"은 적어도 하나의 항원(예를 들어, MAGE-A1)(예를 들어, 이와 동일하거나 또는 관련된) 동족인 아미노산 서열을 갖는 동일한 펩타이드를 각각 포함하는 MHC 분자의 사랑체를 특징으로 하는 항원-특이적 T 세포를 검출하기 위해 사용되는 검정을 지칭되, 복합체는 동족 항원에 특이적인 T 세포 수용체에 결합할 수 있다. MHC 분자의 각각은 바이오틴 분자로 태그될 수 있다. 바이오틴일화된 MHC/펩타이드는 형광으로 표지될 수 있는 스트렙타비딘의 첨가에 의해 사랑체화된다. 사랑체는 형광 표지를 통해 유세포분석에 의해 검출될 수 있다. 소정의 실시형태에서, MHC-펩타이드 사랑체 검정은 본 개시내용의 향상된 친화도 TCR을 검출하거나 또는 선택하기 위해 사용된다.

[0074] 사이토카인 수준은, 예를 들어, ELISA, ELISPOT, 세포내 사이토카인 염색, 및 유세포분석 및 이들의 조합(예를 들어, 세포내 사이토카인 염색 및 유세포분석)을 포함하는 본 명세서에 기재된 그리고 당업계에서 실행되는 방법에 따라 결정될 수 있다. 면역 반응의 항원-특이적 유발 또는 자극으로부터 초래되는 면역 세포 증식 및 클론 확장은 림프구를 단리시키는 것, 예컨대 말초 혈액 세포 또는 림프절로부터의 세포의 샘플에서 림프구를 순환시키는 것, 항원으로 세포를 자극하는 것 및 사이토카인 생산, 세포 증식 및/또는 세포 생존도를, 예컨대 삼중수소 티미딘의 혼입 또는 비방사성 분석, 예컨대 MTT 분석 등에 의해 측정하는 것에 의해 결정될 수 있다. Th1 면역 반응과 Th2 면역 반응 사이의 균형에 대한 본 명세서에 기재된 면역원의 효과는, 예를 들어, Th1 사이토카인, 예컨대 IFN- γ , IL-12, IL-2 및 TNF- β 및 2형 사이토카인, 예컨대 IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 및 IL-13 수준을 결정함으로써 시험될 수 있다.

[0075] 폴리뉴클레오타이드 및 벡터

[0076] 다른 양상에서, 단리된 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드가 본 명세서에 제공되, 폴리뉴클레오타이드는 5T4에 특이적인 본 개시내용의 결합 단백질(예를 들어, 면역글로불린 슈퍼패밀리 결합 단백질, 예컨대 TCR, scTCR 또는 CAR)을 암호화하고, 그리고 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포(예를 들어, 본 개시내용의 면역 세포)에서의 발현을 위해 코돈 최적화된다. 또한 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터(예를 들어, 발현 벡터)가 제공되, 폴리뉴클레오타이드는 발현 제어 서열(예를 들어, 프로모터)에 작동적으로 결합되거나 또는 작동 가능하게 연결된다. 본 개시내용의 MAGE-A1 펩타이드에 특이적인 결합 단백질을 생산하기 위한 발현 벡터의 구성은, 예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.* (1989 and 2001 editions; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) 및 Ausubel *et al.* (*Current Protocols in Molecular Biology*, 2003)]에 기재된 바와 같이 제한 엔도뉴클레아제 분해, 절찰, 형질전환, 플라스미드 정제, DNA 서열분석, 또는 이들의 조합물을 이용하여 생성될 수 있다. 효율적인 전사 및 번역을 위해, 발현 작제물에 함유된 폴리뉴클레오타이드는 적어도 하나의 적절한 발현 제어 서열(또한 조절 서열로 불림), 예컨대 리더 서열 및 특히 본 개시내

용의 결합 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게(즉, 작동적으로) 연결된 프로모터를 포함한다.

- [0077] 핵산은 임의의 형태로 단일- 또는 이중-가닥 DNA, cDNA 또는 RNA일 수 있고, 안티-센스 DNA, cDNA 및 RNA를 포함하는 서로 상보체인 핵산의 양성 및 음성 가닥을 포함할 수 있다. 또한 siRNA, 마이크로RNA, RNA-DNA 혼성체, 리보자임 및 다른 다양한 천연 유래 또는 DNA 또는 RNA의 합성 형태가 포함된다.
- [0078] 본 명세서에 기재된 바와 같은 MAGE-A1에 특이적인 결합 단백질(예를 들어, 면역글로불린 슈퍼패밀리 결합 단백질) 또는 고친화도 재조합 T 세포 수용체(TCR)를 암호화하는 단리된 또는 재조합 핵산 분자는 분자 생물학 또는 폴리펩타이드 정제 분야의 다양한 방법 및 기법에 따라 생산되고 제조될 수 있다.
- [0079] 소정의 실시형태에서, TCR V α 도메인 및 TCR V β 도메인을 갖는 결합 단백질을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 제공되며, 암호화된 결합 단백질은 CD8과 독립적으로 또는 CD8의 부재하에 세포 표면 상에서 MAGE-A1 펩타이드:HLA 복합체에 특이적으로 결합할 수 있으며, 단리된 폴리뉴클레오타이드는: (a) 서열번호 97, 103, 109, 115 또는 121에 따른 V α CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드, 및 V β 암호화 폴리뉴클레오타이드; (b) 서열번호 94, 100, 106, 112 또는 118에 따른 V β CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드, 및 V α -암호화 폴리뉴클레오타이드; 또는 (c) 서열번호 97, 103, 109, 115 또는 121에 따른 V α CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드 및 서열번호 94, 100, 106, 112 또는 118에 따른 V β CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 추가 실시형태에서, V β 암호화 폴리뉴클레오타이드는 TRBV30 대립유전자, TRBV29 대립유전자 또는 TRBV9 대립유전자로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, V α -암호화 폴리뉴클레오타이드는 TRAV38-1 대립유전자, TRAV34 대립유전자, TRAV16 대립유전자 또는 TRAV5 대립유전자로부터 유래된다.
- [0080] 결합 단백질을 암호화하는 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오타이드는, 일부 실시형태에서, (a) 서열번호 97에 따른 V α CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드 및 서열번호 94에 따른 V β CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드; (b) 서열번호 103에 따른 V α CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드 및 서열번호 100에 따른 V β CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드; (c) 서열번호 109에 따른 V α CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드 및 서열번호 106에 따른 V β CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드; (d) 서열번호 115에 따른 V α CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드 및 서열번호 112에 따른 V β CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드; 또는 (e) 서열번호 121에 따른 V α CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드 및 서열번호 118에 따른 V β CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 결합 단백질을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드는 (a) 서열번호 95, 101, 107, 113 또는 119에 따른 V α CDR1-암호화 폴리뉴클레오타이드; (b) 서열번호 96, 102, 108, 114 또는 120에 따른 V α CDR2-암호화 폴리뉴클레오타이드; (c) 서열번호 92, 98, 104, 110 또는 116에 따른 V β CDR1-암호화 폴리뉴클레오타이드; 및/또는 (d) 서열번호 93, 99, 105, 111 또는 117에 따른 V β CDR2-암호화 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다.
- [0081] 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 단백질을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드는 (a) 서열번호 95에 따른 V α CDR1-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 96에 따른 V α CDR2-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 97에 따른 V α CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 92에 따른 V β CDR1-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 93에 따른 V β CDR2-암호화 폴리뉴클레오타이드, 및 서열번호 94에 따른 V β CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드; (b) 서열번호 101에 따른 V α CDR1-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 102에 따른 V α CDR2-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 103에 따른 V α CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 98에 따른 V β CDR1-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 99에 따른 V β CDR2-암호화 폴리뉴클레오타이드, 및 서열번호 100에 따른 V β CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드; (c) 서열번호 107에 따른 V α CDR1-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 108에 따른 V α CDR2-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 109에 따른 V α CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 104에 따른 V β CDR1-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 105에 따른 V β CDR2-암호화 폴리뉴클레오타이드, 및 서열번호 106에 따른 V β CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드; (d) 서열번호 113에 따른 V α CDR1-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 114에 따른 V α CDR2-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 115에 따른 V α CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 110에 따른 V β CDR1-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 111에 따른 V β CDR2-암호화 폴리뉴클레오타이드, 및 서열번호 112에 따른 V β CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드; 또는 (e) 서열번호 119에 따른 V α CDR1-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 120에 따른 V α CDR2-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 121에 따른 V α CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 116에 따른 V β CDR1-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 117에 따른 V β CDR2-암호화 폴리뉴클레오타이드, 및 서열번호 118에 따른 V β CDR3-암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0082] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 결합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하되, V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 58, 66, 74, 82 또는 90에 대해 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일성)을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 그리고 V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 56, 64, 72, 80 또는 88에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 추가 실시형태에서: (a) V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 58에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 그리고 V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 56에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나; (b) V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 66에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 그리고 V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 64에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나; (c) V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 74에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 그리고 V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 72에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나; (d) V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 82에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 그리고 V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 80에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나; 또는 (e) V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 90에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 그리고 V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 88에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0083] 특정 실시형태에서, (a) V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 58에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어지고 그리고 V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 56에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어지거나; (b) V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 66에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어지고 그리고 V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 64에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어지거나; (c) V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 74에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어지고 그리고 V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 72에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어지거나; (d) V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 82에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어지고 그리고 V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 80에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 이것으로 이루어지거나; 또는 (e) V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 90에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 서열번호 90에 따른 뉴클레오타이드 서열로 이루어지고 그리고 V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 88에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 서열번호 88에 따른 뉴클레오타이드 서열로 이루어진다.

[0084] 본 개시내용의 결합 단백질-암호화 폴리뉴클레오타이드는, 소정의 실시형태에서, TCR α -쇄 불변 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, TCR β -쇄 불변 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 둘 다를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 단백질을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드는: (a) 서열번호 59, 67, 75, 83 또는 91에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 C_{α} -도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드; 및/또는 (b) 서열번호 57, 65, 73, 81 또는 89에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 C_{β} -도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 추가 실시형태에서, C_{α} -도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 59, 67, 75, 83 또는 91에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 이들로 이루어지고, C_{β} -도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 57, 65, 73, 81 또는 89에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 이들로 이루어진다.

[0085] 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 단백질을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드는: (a) 서열번호 58에 따른 V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 56에 따른 V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 59에 따른 C_{α} -도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드, 및 서열번호 57에 따른 C_{β} -도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드; (b) 서열번호 66에 따른 V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 64에 따른 V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 67에 따른 C_{α} -도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드, 및 서열번호 65에 따른 C_{β} -도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드; (c) 서열번호 74에 따른 V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 72에 따른 V_{β} -암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 75에 따른 C_{α} -도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드 및 서열번호 73에 따른 C_{β} -도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드; (d) 서열번호 82에 따른 V_{α} -암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 80에 따른 V_{β} -

암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 83에 따른 C_α-도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드 및 서열번호 81에 따른 C_β-도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드; 또는 (e) 서열번호 90에 따른 V_α-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 88에 따른 V_β-암호화 폴리뉴클레오타이드, 서열번호 91에 따른 C_α-도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드, 및 서열번호 89에 따른 C_β-도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0086] 추가 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 단백질의 2 이상의 치환체 유전자 산물은 절단 가능한 또는 제거 가능한 세그먼트에 의해 분리되는 부분을 갖는 단일 펩타이드로서 발현된다. 예를 들어, 단일 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터에 의해 암호화된 분리 가능한 폴리펩타이드의 발현에 유용한 자기-절단성 펩타이드는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 돼지 테스코바이러스-1 2A(P2A) 펩타이드, 예컨대 서열번호 128 또는 129 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 펩타이드, 토세아시그나 (Thoseaasigna) 바이러스 2A(T2A) 펩타이드, 예컨대 서열번호 132에 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 펩타이드, 마 비염 A 바이러스(ERAV) 2A(E2A) 펩타이드, 예컨대 서열번호 131에 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 펩타이드, 및 구제역 바이러스 2A(F2A) 펩타이드, 예컨대 서열번호 130에 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 펩타이드를 포함한다.

[0087] 따라서, 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 단백질을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드는 TCR α-쇄-암호화 폴리뉴클레오타이드와 TCR β-쇄-암호화 폴리뉴클레오타이드 사이에 배치되거나, 또는 TCR Vβ 도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드와 TCR Vα-암호화 폴리뉴클레오타이드 사이에 배치되거나, 또는 TCR 가변 도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드와 TCR 불변 도메인-암호화 폴리뉴클레오타이드 사이에 배치되거나 또는 이들의 조합인, 자기-절단성 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 자기-절단성 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 128 내지 132 중 어느 하나에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 이들로 이루어진다. 추가 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 124 내지 127 중 어느 하나에 따른 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이들로 이루어진 자기-절단성 펩타이드를 암호화한다.

[0088] 또한 본 명세서에 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 벡터가 제공된다. 관심 대상의 MAGE-A1 펩타이드에 특이적인 결합 단백질 또는 고친화도 조작된 TCR을 재조합적으로 생산하기 위해 사용되는 발현 벡터의 작제는, 예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.* (1989 and 2001 editions; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) 및 Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, 2003)]에 기재된 바와 같은 제한 엔도뉴클레아제 분해, 절찰, 형질전환, 플라스미드 정제 및 DNA 서열분석의 사용을 포함하는 임의의 적합한 분자 생물학 조작 기법을 이용함으로써 달성될 수 있다. 효율적인 전사 및 번역을 얻기 위해, 각각의 재조합 발현 작제물 내 폴리뉴클레오타이드는 적어도 하나의 적절한 발현 제어 서열, 예컨대 결합 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게(즉, 작동적으로) 연결된 프로모터를 포함한다. 추가로, 본 개시내용의 결합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 또한 결합 단백질(또한 사전-결합 단백질로서 지칭됨)의 아미노-말단에서 리더 서열을 암호화하는 서열을 포함할 수 있는데, 이 리더 서열은 성숙 결합 단백질을 생산하기 위해 세포에 의해 제거될 수 있다.

[0089] 예시적인 벡터는, 핵산 분자가 연결되거나 또는 숙주 유기체에서 복제할 수 있는 다른 핵산 분자를 수송할 수 있는, 핵산 분자를 포함할 수 있다. 벡터의 일부 예는 플라스미드, 바이러스 벡터, 코스미드 및 기타를 포함한다. 일부 벡터는 그들이 도입된 숙주 세포에서 자율 복제를 할 수 있는 반면(예를 들어, 박테리아 복제기점 및 에피솜 포유류 벡터를 갖는 박테리아 벡터), 다른 벡터는 숙주 세포의 게놈에 통합되거나 또는 숙주 세포 내로 도입 시 폴리뉴클레오타이드 삽입물의 통합을 촉진시킴으로써, 숙주 게놈(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)과 함께 복제할 수 있다. 추가적으로, 일부 벡터는 그들이 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다(이들 벡터는 "발현 벡터"로서 지칭될 수 있다). 관련된 실시형태에 따르면, 1종 이상의 제제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 MAGE-A1에 특이적인 결합 단백질 또는 고친화도 재조합 TCR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)가 대상체에게 공동 투여된다면, 각각의 제제는 별개의 또는 동일한 벡터에 존재할 수 있으며, 다중 벡터(각각 상이한 제제, 동일한 제제를 함유함)는 세포 또는 세포 집단에 도입되거나 또는 대상체에 투여될 수 있다는 것이 추가로 이해된다.

[0090] 소정의 실시형태에서, MAGE-A1에 특이적인 결합 단백질 또는 고친화도 재조합 TCR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 벡터의 특정 요소에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 서열이 절찰된 암호화 서열의 발현 및 가공을 달성하는 데 필요한 폴리뉴클레오타이드 서열은 작동 가능하게 연결될 수 있다. 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 효율적인 RNA 가공 신호, 예컨대 스플라이싱

및 폴리아데닐화 신호; 세포질 mRNA를 안정화하는 서열; 번역을 효율적으로 향상시키는 서열(즉, 코작(Kozak) 공통 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 가능하게는 단백질 분비를 향상시키는 서열을 포함할 수 있다. 발현 제어 서열은, 관심대상 유전자를 제어하기 위해 도중에 또는 제어하기 위한 거리에서 작용하는 관심대상 유전자 및 발현 제어 서열과 인접해 있다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 결합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 바이러스 벡터, 예컨대 렌티바이러스 벡터 또는 γ -레트로바이러스 벡터인 발현 벡터에 함유된다.

[0091] 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 파보바이러스(예를 들어, 아데노-연관 바이러스), 코로나바이러스, 음성 가닥 RNA 바이러스, 예컨대 오쏘-믹소바이러스(예를 들어, 인플루엔자 바이러스), 라브도바이러스(예를 들어, 광견병 및 수포성 구내염 바이러스), 파라믹소바이러스(예를 들어, 홍역 및 센다이(Sendai)), 양성 가닥 RNA 바이러스, 예컨대 피코르나바이러스 및 알파바이러스, 및 이중-가닥 DNA 바이러스(아데노바이러스, 헤르페스(예를 들어, 단순포진 바이러스 1형 및 2형, 엡스타인-바르 바이러스, 거대세포바이러스) 및 폭스바이러스(예를 들어, 백시니아, 계두 및 카나리아두창)를 포함)를 포함한다. 다른 바이러스는, 예를 들어, 노워크 바이러스, 토가바이러스, 플라비바이러스, 레오바이러스, 파보바이러스, 헤파드나바이러스 및 간염 바이러스를 포함한다. 레트로바이러스의 예는 조류 백혈증-육종, 포유류 C-형, B-형 바이러스, D 형 바이러스, HTLV-BLV 그룹, 렌티바이러스, 스푸마바이러스를 포함한다(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).

[0092] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "렌티바이러스 벡터"는 통합 또는 비통합될 수 있고, 상대적으로 거대한 패키징 능력을 가지며, 그리고 다양한 상이한 세포 유형을 형질도입할 수 있는, 유전자 전달을 위한 HIV-기반 렌티바이러스 벡터를 의미한다. 렌티바이러스 벡터는 보통 셋(패키징, 외피 및 전달) 이상의 플라스미드의 생산자 세포 내로의 일시적 형질감염 후에 생성된다. HIV와 같이, 렌티바이러스 벡터는 세포 표면 상에서 수용체와 바이러스 표면 당단백질의 상호작용을 통해 표적 세포에 유입된다. 유입 시, 바이러스 RNA는 바이러스 역전사효소 복합체에 의해 매개되는 역전사를 겪는다. 역전사의 생성물은 감염 세포의 DNA 내로의 바이러스 통합을 위한 기질인, 이중 가닥 선형 바이러스 DNA이다.

[0093] 특정 실시형태에서, 재조합 또는 조작된 발현 벡터는 적절한 세포(즉, 숙주 세포에 본 개시내용의 결합 단백질-암호화 폴리뉴클레오타이드를 전달할 수 있음), 예를 들어, T 세포 또는 항원-제시 세포, 즉, 세포 표면(예를 들어, 수지상 세포) 상에서 펩타이드/MHC 복합체를 나타내고 CD8을 결여하는 세포에 전달된다. 소정의 실시형태에서, 숙주 세포는 조혈 전구체 세포 또는 인간 면역계 세포이다. 예를 들어, 면역계 세포는 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, CD4- CD8- 이중 음성 T 세포, $\gamma \delta$ T 세포, 자연살해 세포, 수지상 세포, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 소정의 실시형태에서, T 세포는 숙주이고, T 세포는 미경험, 중심 기억 T 세포, 효과기 기억 T 세포 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 재조합 발현 벡터는 또한, 예를 들어, 림프모양 조직-특이적 전사 조절 요소(TRE), 예컨대 B 림프구, T 림프구 또는 수지상 세포 특이적 TRE를 포함할 수 있다. 림프모양 조직 특이적 TRE는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Thompson *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 12:1043, 1992]; Todd *et al.*, *J. Exp. Med.* 177:1663, 1993]; Penix *et al.*, *J. Exp. Med.* 178:1483, 1993] 참조).

[0094] 벡터에 추가로, 소정의 실시형태는 현재 개시된 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 당업자는 다수의 적합한 숙주 세포가 당업계에서 입수 가능하다는 것을 용이하게 이해한다. 숙주 세포는 벡터를 받을 수 있는 임의의 개개 세포 또는 세포 배양물 또는 핵산 및/또는 단백질의 혼입물뿐만 아니라 임의의 자손 세포를 포함한다. 상기 용어는 또한 유전적으로 또는 표현형적으로 동일하든 또는 상이하든 숙주 세포의 자손을 포함한다. 적합한 숙주 세포는 벡터에 의존할 수 있으며, 포유류 세포, 동물 세포, 인간 세포, 유인원 세포, 곤충 세포, 효모 세포 및 박테리아 세포를 포함할 수 있다. 이들 세포는 바이러스 벡터, 인산칼슘 침전을 통한 형질전환, DEAE-덱스트란, 전기천공법, 미량주사법 또는 기타 방법의 사용에 의해 벡터 또는 다른 물질을 혼입하도록 유도될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2d ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)] 참조.

[0095] 숙주 세포

[0096] 또한 본 개시내용의 결합 단백질을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포(즉, 변형된 세포)가 제공된다. 소정의 실시형태에서, 숙주 세포는 인간 면역 세포, 예컨대, T 세포, NK 세포 또는 NK-T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 CD4⁺T 세포, CD8⁺T 세포 또는 둘 다를 포함한다. 본 명세서에 개

시된 실시형태에 대한 이들 방법의 적용이 본 명세서의 교시에 기반하여 상정되도록, 목적하는 표적 특이성의 T 세포를 이용하는 입양 전달 절차를 갖는 것으로(e.g., Schmitt *et al.*, *Hum. Gen.* 20:1240, 2009; Dossett *et al.*, *Mol. Ther.* 17:742, 2009; Till *et al.*, *Blood* 112:2261, 2008; Wang *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 18:712, 2007; Kuball *et al.*, *Blood* 109:2331, 2007; US 2011/0243972; US 2011/0189141; Leen *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 25:243, 2007) T 세포에 목적하는 핵산을 형질감염/형질도입하기 위한 방법이 기재되어 있다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2004/0087025호).

[0097] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 결합 단백질을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 포함하되, 암호화된 결합 단백질은: (a) 서열번호 26, 32, 38, 44, 50 또는 51 중 어느 하나에 따른 CDR3 아미노산 서열을 갖는 T 세포 수용체(TCR) α -쇄 가변(V_α) 도메인, 및 TCR β -쇄 가변(V_β) 도메인; (b) 서열번호 23, 29, 35, 41 또는 47 중 어느 하나에 따른 CDR3 아미노산 서열을 갖는 V_β 도메인, 및 V_α 도메인; 또는 (c) 서열번호 26, 32, 38, 44, 50 또는 51 중 어느 하나에 따른 CDR3 아미노산 서열을 갖는 V_α 도메인, 및 서열번호 23, 29, 35, 41 또는 47 중 어느 하나에 따른 CDR3 아미노산 서열을 갖는 V_β 도메인을 포함하고; 그리고 결합 단백질은 CD8과 독립적으로 또는 CD8의 부재하에 세포 표면 상에서 MAGE-A1 펩타이드:HLA 복합체에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 암호화된 결합 단백질은 약 10^{-8} M 이하의 K_d 로 KVLEYVIKV(서열번호 123):인간 백혈구 항원 (HLA) 복합체에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0098] 임의의 적절한 방법은 세포, 예를 들어, T 세포를 형질감염시키거나 또는 형질도입하기 위해, 또는 본 방법의 폴리뉴클레오타이드 또는 조성물을 투여하기 위해 사용될 수 있다. 숙주 세포에 폴리뉴클레오타이드를 전달하기 위한 공지된 방법은, 예를 들어, 양이온성 중합체, 지질-유사 분자, 특정 상업적 제품, 예를 들어, 생체내-JET PEI의 사용을 포함한다. 다른 방법은 생체의 형질도입, 주사, 전기천공법, DEAE-텍스트란, 음과처리 부하, 리포좀-매개 형질감염, 수용체-매개 형질도입, 미량주사 충격, 트랜스포존-매개 전달 등을 포함한다. 숙주 세포를 형질감염 또는 형질도입하는 또한 추가적인 방법은 본 명세서에 추가로 상세하기 기재된 벡터를 사용한다.

[0099] 임의의 앞서 언급한 실시형태에서, 숙주 세포(예를 들어, 면역 세포)는 신호전달 또는 다른 관련된 활성화에 연루된 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 내인성 유전자의 발현을 감소시키거나 또는 제거하도록 변형된 "보편적 공여자" 세포일 수 있다. 예시적인 유전자 녹아웃은 PD-1, LAG-3, CTLA4, TIM3, HLA 분자, TCR 분자 등을 암호화하는 것을 포함한다. 이론에 의해 구속되는 일 없이, 소정의 내인성으로 발현된 면역 세포 단백질은 숙주 면역 세포(예를 들어, HLA 대립유전자)의 제거를 초래할 수 있거나, 또는 변형된 세포(예를 들어, PD-1, LAG-3, CTLA4)의 면역 활성을 하향조절할 수 있거나, 또는 본 개시내용의 이중성으로 발현된 결합 단백질(예를 들어, 비-MAGE-A1 항원에 결합하고 이에 의해 MAGE-A1 항원을 발현시키는 세포의 변형된 세포 결합을 방해하는 내인성 TCR)의 결합 활성을 방해할 수 있는, 숙주 면역 세포를 받는 동종이계 숙주에 의해 이물질로서 인식될 수 있다. 따라서, 이러한 내인성 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 감소시키거나 또는 제거하는 것은 동종이계 숙주 내에서 변형된 세포의 활성, 내성 및 지속성을 개선시킬 수 있고, 그리고 (예를 들어, HLA 유형과 상관없이 임의의 수용자에게) 투여를 위한 보편적, "표준 재고(off-the-shelf)" 세포를 허용한다.

[0100] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 숙주 세포(예를 들어, 변형된 면역 세포)는 PD-1, LAG-3, CTLA4, TIM3, HLA 성분(예를 들어, $\alpha 1$ 마크로글로불린, $\alpha 2$ 마크로글로불린, $\alpha 3$ 마크로글로불린, $\beta 1$ 마이크로글로불린 또는 $\beta 2$ 마이크로글로불린을 암호화하는 유전자), 또는 TCR 성분(예를 들어, TCR 가변 영역 또는 TCR 불변 영역을 암호화하는 유전자)을 암호화하는 유전자 중 하나 이상의 염색체 녹아웃 유전자를 포함한다(예를 들어, 문헌 [Torikai *et al.*, *Nature Sci. Rep.* 6:21757 (2016); Torikai *et al.*, *Blood* 119(24):5697 (2012); 및 Torikai *et al.*, *Blood* 122(8):1341 (2013)], 이의 유전자 편집 기법 및 조성물은 본 명세서에 그의 전문이 참고로 편입됨). 본 명세서에서 사용되는 용어 "염색체 유전자 녹아웃(knockout)"은 기능성으로 활성화된 내인성 폴리펩타이드 산물의 변형된 세포에 의해 생산을 방지하는 변형된 세포의 유전자 변형을 지칭한다. 염색체 유전자 녹아웃을 초래하는 변형은, 예를 들어, 도입된 넌센스 돌연변이(조숙 정지 코돈의 형성을 포함), 미스센스 돌연변이, 유전자 결실 및 가닥 파손뿐만 아니라 변형된 세포에서 내인성 유전자 발현을 저해하는 저해 핵산 분자의 이중성 발현을 포함할 수 있다.

[0101] 염색체 유전자 녹아웃은 면역 세포의 염색체 편집에 의해 도입될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 염색체 유전자 녹아웃은 면역 세포의 염색체 편집에 의해 생성된다. 염색체 편집은, 예를 들어, 엔도뉴클레아제를 이용하여 수행될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "엔도뉴클레아제"는 폴리뉴클레오타이드 쇄 내의 포스포다이에스터 결합의 절단을 촉매할 수 있는 효소를 지칭한다. 소정의 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 표적화된 유전자를 절단할

수 있고, 이에 의해 표적화된 유전자를 비활성화 또는 "넉아웃"할 수 있다. 엔도뉴클레아제는 천연 유래, 재조합, 유전자 변형된 또는 융합 엔도뉴클레아제일 수 있다. 엔도뉴클레아제에 의해 야기되는 핵산 가닥 파손은 상동성 재조합 또는 비상동성 말단 결합(NHEJ)의 별개의 메커니즘을 통해 통상적으로 수선된다. 상동성 재조합 동안, 공여자 핵산 분자는 표적 유전자를 비활성화하도록 유전자 "넉인(knock-in)"을 위해 사용될 수 있다. NHEJ는 절단 부위에서 DNA 서열에 대한 변화, 예를 들어, 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 치환, 결실 또는 첨가를 종종 초래하는 오류 유발 수선 과정이다. NHEJ는 표적 유전자를 "넉아웃"하기 위해 사용될 수 있다. 엔도뉴클레아제를 이용하여 면역 세포에서 유전자 또는 유전자 발현을 붕괴시키거나 또는 넉아웃하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 2015/066262; WO 2013/074916; 및 WO 2014/059173에 기재되어 있으며; 이들 각각으로부터의 방법은 참고로 편입된다. 엔도뉴클레아제의 예는 아연 핑거 뉴클레아제, TALE-뉴클레아제, CRISPR-Cas 뉴클레아제 및 메가뉴클레아제를 포함한다.

[0102] 본 명세서에서 사용되는 "아연 핑거 뉴클레아제"(zinc finger nuclease: ZFN)는 비-특이적 DNA 절단 도메인, 예컨대 FokI 엔도뉴클레아제에 융합된 아연 핑거 DNA-결합 도메인을 포함하는 융합 단백질을 지칭한다. 약 30개의 아미노산의 각각의 아연 핑거 모티프는 DNA의 약 3개의 염기쌍에 결합하고, 특정 잔기에서 아미노산은 삼중 서열 특이성을 변경시키도록 변화될 수 있다(예를 들어, 문헌[Desjarlais *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:2256-2260, 1993; Wolfe *et al.*, *J. Mol. Biol.* 285:1917-1934, 1999] 참조). 다중 아연 핑거 모티프는 목적하는 DNA 서열, 예컨대 약 9개 내지 약 18개의 염기쌍 범위의 길이를 갖는 영역에 대한 결합 특이성을 생성하기 위해 직렬로 연결될 수 있다. 배경기술의 방법에 의해, ZFN은 게놈에서 부위-특이적 DNA 이중 가닥 파손(DSB)의 형성을 촉매함으로써 게놈 편집을 매개하고, DSB 부위에서 게놈에 상동성인 측접 서열을 포함하는 이식 유전자의 표적화된 통합은 상동 직접 수선(homology directed repair)에 의해 용이하게 된다. 대안적으로, ZFN에 의해 생성되는 DSB는 절단 부위에서 뉴클레오타이드의 삽입 또는 결실을 초래하는 오류 유발 세포 수선 경로인 비-상동성 말단 결합(NHEJ)에 의한 수선을 통해 표적 유전자의 넉아웃을 초래할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 유전자 넉아웃은 ZFN 분자를 이용하여 만들어진 삽입, 결실, 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0103] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "전사 활성체-유사 효과기 뉴클레아제"(TALEN)는 TALE DNA-결합 도메인 및 DNA 절단 도메인을 포함하는 융합 단백질, 예컨대 FokI 엔도뉴클레아제를 지칭한다. "TALE DNA 결합 도메인" 또는 "TALE"은 각각 분기하는 12번째 및 13번째 아미노산을 갖는 고도로 보존된 33 내지 35개의 아미노산 서열을 일반적으로 갖는, 하나 이상의 TALE 반복 도메인/단위로 구성된다. TALE 반복 도메인은 표적 DNA 서열에 대한 TALE의 결합에 연루된다. 반복 가변 2잔기(Repeat Variable Di-residue: RVD)로서 지칭되는 분기 아미노산 잔기는 특정 뉴클레오타이드 인식과 상관 관계가 있다. 12 및 13번 위치에서 HD 서열이 사이토키닌(C)에 대한 결합을 야기하고, NG가 T에, NI가 A에 결합하고, NN이 G 또는 A에 결합하며, 그리고 NG가 T에 결합하고 그리고 비정규(비전형적) RVD가 또한 공지되도록, 이들 TALE의 DNA 인식을 위한 천연(정규) 암호가 결정되었다(예를 들어, 미국 특허 공개 제2011/0301073호를 참조하며, 이 비전형적 RVD는 그의 전문이 본 명세서에 참고로 편입됨). TALEN은 T 세포의 게놈에서 부위-특이적 이중-가닥 파손(DSB)을 지시하기 위해 사용될 수 있다. 비상동성 말단 결합(NHEJ)은 어닐링에 대한 서열 중복이 거의 없거나 또는 전혀 없는 이중 가닥 파손의 측면 둘 다를로부터 DNA를 결합함으로써, 유전자 발현을 넉아웃하는 오류를 도입한다. 대안적으로, 상동성 관련 수선은 DSB 부위에서 이식유전자를 도입할 수 있으며, 단, 상동성 측접 서열이 이식유전자에 존재한다. 소정의 실시형태에서, 유전자 넉아웃은 삽입, 결실, 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하며, TALEN 분자를 이용하여 만들어진다.

[0104] 본 명세서에서 사용되는, "주기적인 간격으로 분포하는 짧은 회문구조 반복부(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)/Cas"(CRISPR/Cas) 뉴클레아제 시스템은 염기쌍 상보성을 통해 게놈 내의 표적 부위(프로토스페이서로서 알려짐)를 인식하기 위해, 그리고 이어서, 짧은 보존된 프로토스페이서 결합 모티프(PAM)가 상보성 표적 부위의 3' 바로 다음이라면 DNA를 절단하기 위해 CRISPR RNA (crRNA)-가이드된 Cas 뉴클레아제를 사용하는 시스템을 지칭한다. CRISPR/Cas 시스템은 Cas 뉴클레아제의 서열 및 구조에 기반하여 3가지 유형(즉, I형, II형 및 III형)으로 분류된다. I형 및 III형에서 crRNA-가이드된 감시 복합체는 다중 Cas 서브유닛이 필요하다. 가장 잘 연구된 II형 시스템은 적어도 3가지 성분을 포함한다: RNA-가이드 Cas9 뉴클레아제, crRNA, 및 트랜스-작용성 crRNA(tracrRNA). tracrRNA는 이중가닥 형성 영역을 포함한다. crRNA 및 tracrRNA는 Cas9 뉴클레아제와 상호작용하고 그리고 crRNA 상의 스페이서와 PAM으로부터 상류의 표적 DNA 상의 프로토스페이서 사이의 왓슨-크릭 염기쌍을 통해 표적 DNA 상의 특정 부위로 Cas9/crRNA:tracrRNA 복합체를 가이드할 수 있는 이중가닥을 형성한다. Cas9 뉴클레아제는 crRNA 스페이서에 의해 정해진 영역 내에서 이중-가닥 파손을 절단한다. NHEJ에 의한 수선은 표적화된 좌위의 발현을 붕괴시키는 삽입 및/또는 결실을 초래한다. 대안적으로, 상동성 측접 서열을 갖는 이식유전자는 상동 직접 수선을 통해 DSB의 부위에 도입될 수 있다. crRNA 및 tracrRNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA 또는 gRNA)로 조작될 수 있다(예를 들어, 문헌[Jinek *et al.*, *Science* 337:816-21, 2012] 참

조). 추가로, 표적 부위에 상보성인 가이드 RNA의 영역은 목적하는 서열을 표적화하도록 변경되거나 또는 프로그램될 수 있다(문헌[Xie *et al.*, PLOS One 9:e100448, 2014]; 미국 특허 출원 공개 제2014/0068797호, 미국 특허 출원 공개 제2014/0186843호; 미국 특허 출원 제8,697,359호 및 국제 특허 출원 WO 2015/071474; 이들 각각의 기법 및 조성물은 참고로 편입된다). 소정의 실시형태에서, 유전자 녹아웃은 삽입, 결실, 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하며, CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템을 이용하여 만들어진다.

- [0105] "호밍 엔도뉴클레아제"로서 지칭되는 본 명세서에서 사용되는 "메가뉴클레아제"는 거대 인식 부위(약 12 내지 약 40개 염기쌍의 이중 가닥 DNA 서열)를 특징으로 하는 엔도데옥시리보뉴클레아제를 지칭한다. 메가뉴클레아제는 서열 및 구조 모티프에 기반하여 5가지 패밀리로 나눌 수 있다: LAGLIDADG, GIY-YIG, HNH, His-Cys 박스 및 PD-(D/E)XK. 예시적인 메가뉴클레아제는 I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII 및 I-TevIII을 포함하며, 이의 인식 서열은 공지되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,420,032호 및 제6,833,252호; 문헌[Belfort *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388, 1997; Dujon *et al.*, *Gene* 82:115-118, 1989; Perler *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 22:1125-1127, 1994; Jasin, *Trends Genet.* 12:224-228, 1996; Gimble *et al.*, *J. Mol. Biol.* 263:163-180, 1996; Argast *et al.*, *J. Mol. Biol.* 280:345-353, 1998] 참조).
- [0106] 소정의 실시형태에서, 천연 유래 메가뉴클레아제는 PD-1, LAG3, TIM3, CTLA4, HLA-암호화 유전자, 또는 TCR 성분-암호화 유전자로부터 선택된 표적의 부위-특이적 게놈 변형을 촉진시키기 위해 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서, 표적 유전자에 대해 신규한 결합 특이성을 갖는 조작된 메가뉴클레아제는 부위-특이적 게놈 변형을 위해 사용된다(예를 들어, 문헌[Porteus *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 23:967-73, 2005; Sussman *et al.*, *J. Mol. Biol.* 342:31-41, 2004; Epinat *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 31:2952-62, 2003; Chevalier *et al.*, *Molec. Cell* 10:895-905, 2002; Ashworth *et al.*, *Nature* 441:656-659, 2006; Paques *et al.*, *Curr. Gene Ther.* 7:49-66, 2007]; 미국 특허 공개 제2007/0117128호; 미국 특허 제2006/0206949호; 미국 특허 제2006/0153826호; 미국 특허 제2006/0078552호; 및 미국 특허 제2004/0002092호).
- [0107] 소정의 실시형태에서, 염색체 유전자 녹아웃은 종양 연관 항원에 특이적으로 결합하는 항원-특이적 수용체를 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 변형된 세포에 도입되는 저해 핵산 분자를 포함하되, 저해 핵산 분자는 표적-특이적 저해제를 암호화하고 그리고 암호화된 표적-특이적 저해제는 변형된 세포에서(즉, PD-1, TIM3, LAG3, CTLA4, HLA 성분, TCR 성분 또는 이들의 임의의 조합의) 내인성 유전자 발현을 저해한다.
- [0108] 염색체 유전자 녹아웃은 녹아웃 절차 또는 제제의 사용 후에 변형된 세포의 DNA 서열분석에 의해 직접적으로 확인될 수 있다. 염색체 유전자 녹아웃은 녹아웃 후에 유전자 발현의 부재(예를 들어, 유전자에 의해 암호화된 mRNA 또는 폴리펩타이드 산물의 부재)로부터 추론될 수 있다.
- [0109] 일부 실시형태에서, 변형된 세포는 본 개시내용의 결합 단백질을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 CD4⁺ T 세포(예를 들어, 펩타이드 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 CD8⁺ T 세포로부터의 MAGE-A1-특이적 TCR)이다. 일부 실시형태에서, 변형된 CD4⁺ T 세포의 이중성으로 암호화된 TCR은 고친화도 TCR이다. 특정 실시형태에서, 변형된 CD4⁺ T 세포의 이중성으로 암호화된 TCR은 CD8과 독립적으로 또는 CD8의 부재하에 세포 표면 상에서 펩타이드:항원 HLA 복합체에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0110] 추가 실시형태에서, 변형된 CD4⁺ T 세포는 CD8 공수용체의 적어도 세포의 부분을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 실시예에 나타내는 바와 같이, CD4⁺ T 세포에 의한 본 개시내용의 MAGE-A1-특이적 결합 단백질과 CD8 공수용체의 적어도 세포의 부분의 공동 발현은 CD4⁺ T 세포에 대해 새로운 또는 개선된 기능성(예를 들어, 개선된 사이토카인 방출, MAGE-A1:HLA-발현 표적 세포에 결합될 때 CTL 반응)을 부여할 수 있다. CD8 공수용체 α-쇄의 아미노산 서열은 서열번호 143에서 제공된다. CD8 공수용체 β-쇄의 5가지 상이한 아이소폼의 아미노산 서열은 각각 서열번호 144 내지 148에 제공된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 변형된 CD4⁺ T 세포는 전장 CD8 공수용체 수용체 β-쇄를 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드, 전장 CD8 공수용체 α-쇄를 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드, 또는 둘 다를 추가로 포함한다. CD8-암호화 폴리뉴클레오타이드는, 일부 실시형태에서, 일 수 있다.
- [0111] 또한 변형된 CD4⁺ T 세포를 제조하는 방법이 제공되되, 상기 방법은 펩타이드 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 CD8⁺ T 세포로부터의 TCR을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 CD4⁺ T 세포에 형질도입하는 단계를 포함

한다. 소정의 실시형태에서, $CD4^+$ T 세포를 변형시키기 위해 사용되는 TCR-암호화 폴리뉴클레오타이드는 천연 유래 $CD8^+$ T 세포로부터 유래된다(즉, TCR은 천연 유래 TCR이다). 본 방법의 추가적인 실시형태는 일부 실시형태에서 $CD8^+$ T 세포로부터의 $CD8\alpha$ 및 $CD8\beta$ 를 포함할 수 있는 $CD8$ 공수용체의 적어도 세포의 부분을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 $CD4^+$ T 세포에 형질도입하는 것을 포함한다.

[0112] 조성물

[0113] 또한 본 명세서에서 본 명세서에 개시된 바와 같은 변형된 세포 및 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)이 제공된다. 적합한 부형제는 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤 등 및 이들의 조합물을 포함한다. 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 용합 단백질 또는 숙주 세포를 포함하는 조성물은 적합한 주입 배지를 추가로 포함한다. 적합한 주입 배지는 임의의 등장성 배지 제형일 수 있으며, 전형적으로 정상 식염수, 노르모솔 R(Normosol R)(애보트(Abbott)) 또는 플라즈마-라이트 A(Plasma-Lyte A)(박터(Baxter)), 수 중 5% 텍스트로스, 링거 락테이트가 이용될 수 있다. 주입 배지는 인간 혈청 알부민 또는 다른 인간 혈청 성분으로 보충될 수 있다. 본 명세서에 기재된 조성물은 단위-용량 또는 다회-용량 용기, 예컨대 밀봉된 앰플 또는 바이알로 제공될 수 있다. 이러한 용기는 환자에게 주입까지 제형의 안정성을 보존하기 위해 냉동될 수 있다.

[0114] 조성물의 "유효량"은 본 명세서에 기재된 바와 같이 목적하는 임상 결과 또는 유리한 치료를 달성하기 위한 투약량으로 그리고 필요한 시간 동안의 충분한 양을 지칭한다. 유효량은 1회 이상의 투여로 전달될 수 있다. 질환 또는 질환 상태를 갖는 것으로 이미 알려지거나 또는 확인된 대상체에게 투여된다면, 용어 "치료적 양"은 치료와 관련하여 사용될 수 있는 반면, "예방적 유효량"은 예방적 과정으로서 질환 또는 질환 상태(예를 들어, 재발)의 여지가 있거나 또는 발생할 위험에 있는 대상체에게 유효량을 투여하는 것을 기재하기 위해 사용될 수 있다.

[0115] 조성물은 의학 분야의 당업자에 의해 결정된 바와 같이 치료될(또는 예방될) 질환 또는 병태에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 조성물의 적절한 용량 및 적합한 지속기간 및 투여 빈도는 환자의 건강 상태, 환자의 크기(즉, 체중, 질량 또는 체표면적), 환자 병태의 유형 및 중증도, 활성 성분의 특정 형태 및 투여 방법과 같은 인자에 의해 결정될 것이다. 일반적으로, 적절한 용량 및 치료 요법은 치료적 및/또는 예방적 이점(예컨대 개선된 임상 결과, 예컨대 더 빈번한 완전 또는 부분적 관해, 또는 더 긴 무 질환 및/또는 전반적 생존, 또는 증상 중증도의 감소를 포함하여, 본 명세서에 기재됨)을 제공하기에 충분한 양으로 조성물(들)을 제공한다. 예방적 사용을 위해, 용량은 질환 또는 장애와 관련된 질환을 예방하거나, 질환의 개시를 지연시키거나 또는 질환의 중증도를 감소시키는 데 충분하여야 한다. 본 명세서에 기재된 방법에 따라 투여되는 조성물의 예방적 이점은 전임상(시험관내 및 생체내 연구를 포함) 및 임상 연구를 수행함으로써 그리고 적절한 통계적, 생물학적 및 임상적 방법 및 기법으로부터 얻은 데이터를 분석함으로써 결정될 수 있다.

[0116] 치료적 유효량은 치료되는 인간 또는 비인간 포유류에서 임상적으로 바람직한 결과를 생산할 수 있는 입양 전달에서 사용되는 (인간 MAGE-A1에 특이적인 결합 단백질 또는 고친화도 재조합 TCR을 발현시키는) 숙주 세포의 양(즉, 통계적으로 유의한 방식으로 MAGE-A1(예를 들어, 세포독성 T 세포 반응)을 과발현시키는 세포에 대해 특정 T 세포 면역 반응을 유도하거나 또는 향상시키는 충분한 양)이다. 임의의 한 명의 환자에 대한 투약량은 환자의 크기, 체중, 체표면적, 연령, 투여될 특정 요법, 성별, 투여 시간 및 경로, 일반적 건강상태 및 동시에 투여 중인 다른 약물을 포함하는 다수의 인자에 의존한다. 용량은 다를 것이지만, 숙주 세포의 본 명세서에 기재된 바와 같은 재조합 발현 벡터를 포함하는 투여를 위한 바람직한 용량은 약 10^7 개의 세포/ m^2 , 약 5×10^7 개의 세포/ m^2 , 약 10^8 개의 세포/ m^2 , 약 5×10^8 개의 세포/ m^2 , 약 10^9 개의 세포/ m^2 , 약 5×10^9 개의 세포/ m^2 , 약 10^{10} 개의 세포/ m^2 , 약 5×10^{10} 개의 세포/ m^2 , 또는 약 10^{11} 개의 세포/ m^2 이다. 소정의 실시형태에서, 단위 용량은 약 10^7 개의 세포/ m^2 내지 약 10^{11} 개의 세포/ m^2 의 용량으로 본 명세서에 기재된 바와 같은 변형된 세포를 포함한다.

[0117] 소정의 실시형태에서, 단위 용량은 (i) 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95%의 조작된 $CD4^+$ T 세포를 포함하는 조성물을, (ii) 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 조작된 $CD8^+$ T 세포를 포함하는 조성물과 약 1:1 비로 조합하여 포함한다. 추가 실시형태에서, 단위 용량은 미경험 T 세포의 감소된 양을 함유하거나 또는 실질적

으로 함유하지 않는다(즉, 비슷한 수의 PBMC를 갖는 환자 샘플에 비해 단위 용량에 존재하는 미경험 T 세포 집단의 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만 또는 약 1% 미만을 가짐).

[0118] 일부 실시형태에서, 단위 용량은 (i) 적어도 약 50%의 조작된 CD4⁺ T 세포를 포함하는 조성물을, (ii) 적어도 약 50%의 조작된 CD8⁺ T 세포를 포함하는 조성물과 약 1:1 비로 조합하여 포함하되, 단위 용량은 감소된 양의 미경험 T 세포를 함유하거나 또는 이를 실질적으로 함유하지 않는다. 추가 실시형태에서, 단위 용량은 (i) 적어도 약 60%의 변형된 CD4⁺ T 세포를 포함하는 조성물을, (ii) 적어도 약 60%의 변형된 CD8⁺ T 세포를 포함하는 조성물과 약 1:1 비로 조합하여 포함하되, 단위 용량은 감소된 양의 미경험 T 세포를 함유하거나 또는 이를 실질적으로 함유하지 않는다. 또한 추가 실시형태에서, 단위 용량은 (i) 적어도 약 70%의 변형된 CD4⁺ T 세포를 포함하는 조성물을, (ii) 적어도 약 70%의 변형된 CD8⁺ T 세포를 포함하는 조성물과 약 1:1 비로 조합하여 포함하되, 단위 용량은 감소된 양의 미경험 T 세포를 함유하거나 또는 이를 실질적으로 함유하지 않는다. 일부 실시형태에서, 단위 용량은 (i) 적어도 약 80%의 변형된 CD4⁺ T 세포를 포함하는 조성물을, (ii) 적어도 약 80%의 변형된 CD8⁺ T 세포를 포함하는 조성물과 약 1:1 비로 조합하여 포함하되, 단위 용량은 감소된 양의 미경험 T 세포를 함유하거나 또는 이를 실질적으로 함유하지 않는다. 일부 실시형태에서, 단위 용량은 (i) 적어도 약 85%의 변형된 CD4⁺ T 세포를 포함하는 조성물을, (ii) 적어도 약 85%의 변형된 CD8⁺ T 세포를 포함하는 조성물과 약 1:1 비로 조합하여 포함하되, 단위 용량은 감소된 양의 미경험 T 세포를 함유하거나 또는 이를 실질적으로 함유하지 않는다. 일부 실시형태에서, 단위 용량은 (i) 적어도 약 90%의 변형된 CD4⁺ T 세포를 포함하는 조성물을, (ii) 적어도 약 90%의 변형된 CD8⁺ T 세포를 포함하는 조성물과 약 1:1 비로 조합하여 포함하되, 단위 용량은 감소된 양의 미경험 T 세포를 함유하거나 또는 이를 실질적으로 함유하지 않는다.

[0119] 본 명세서에 기재된 임의의 실시형태에서, 단위 용량은 동일하거나 또는 거의 동일한 수의 변형된 CD45RA⁻ CD3⁺ CD8⁺ 및 변형된 CD45RA⁻ CD3⁺ CD4⁺ T_H 세포를 포함한다.

[0120] 예를 들어, 제형의 비경구 또는 정맥내 투여를 포함하는, 다양한 치료 요법에서 본 명세서에 기재된 특정 조성물을 이용하기 위한 적합한 투약 및 치료 요법의 개발. 대상 조성물이 비경구로 투여된다면, 조성물은 또한 멸균 수용액 또는 유성 용액 또는 현탁액을 포함할 수 있다. 적합한 비독성의 비경구로 허용 가능한 희석제 또는 용매는 물, 링거 용액, 등장성 염 용액, 1,3-부탄다이올, 에탄올, 프로필렌 글리콜 또는 물과의 혼합물 중의 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 수용액 또는 현탁액은 1종 이상의 완충제, 예컨대 아세트산나트륨, 시트르산나트륨, 붕산나트륨 또는 타르타르산나트륨을 추가로 포함할 수 있다. 물론, 임의의 투약량 단위 제형을 제조하는데 사용되는 임의의 물질은 약제학적으로 순수하고 사용되는 양에서 실질적으로 비독성이어야 한다. 추가로, 활성 화합물은 지속 방출 제제 및 제형에 혼입될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 투약량 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 단일 투약량으로서 적합한 물리적으로 별개의 단위를 지칭하며; 각각의 단위는 미리 결정된 양의 변형된 세포 또는 적절한 약제학적 담체와 함께 목적하는 효과를 생산하도록 계산된 활성 화합물을 함유할 수 있다.

[0121] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 조성물의 투여는 전달 경로 또는 방식과 상관 없이 대상체에게 조성물을 전달하는 것을 지칭한다. 투여는 지속적으로 또는 간헐적으로, 그리고 비경구로 달성될 수 있다. 투여는 인식된 병태, 질환 또는 질환 상태를 갖는 것으로 이미 확인된 대상체를 치료하기 위한, 또는 이러한 병태, 질환 또는 질환 상태의 여지가 있거나 또는 발생할 위험에 있는 대상체를 치료하기 위한 것일 수 있다. 보조 요법과의 공동 투여는 임의의 순서로 그리고 임의의 투약 스케줄로 다중 제제의 동시 및/또는 순차적 전달을 포함할 수 있다(예를 들어, 하나 이상의 사이토카인으로 변형된 세포; 면역억제 요법, 예컨대 갈시뉴린 저해제, 코티코스테로이드, 미세소관 저해제, 저용량의 마이코페놀산 프로드러그, HDAC 저해제, DNA 저메틸화제 또는 이들의 임의의 조합).

[0122] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 복수의 용량의 변형된 세포는 대상체에게 투여되며, 이는 약 2 내지 약 4주의 투여 사이의 간격으로 투여될 수 있다.

[0123] 치료 방법

- [0124] 소정의 양상에서, 본 개시내용은 치료가 필요한 인간 대상체에게 본 명세서에 개시된 바와 같은 변형된 세포, 조성물 또는 단위 용량(또는 이들의 임의의 조합)을 투여함으로써 MAGE-A1 발현(예를 들어, 비정상적 MAGE-A1 발현)을 특징으로 하는 과증식성 장애 또는 병태를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0125] MAGE-A1 발현과 관련된 병태는 MAGE-A1 세포 또는 분자 사건의 저활성, 과활성 또는 부적절한 활성이 존재하는 임의의 장애 또는 병태를 포함하고, 정상 세포에 비해 보통의 높은(통계학적 유의도에 의한) 수준의 MAGE-A1 발현 또는 병에 걸린 세포(예를 들어, 골수종 세포)에서 부적절한(즉, 주어진 세포 유형의 건강한 세포에서 생기지 않는) 발현의 결과일 수 있다. 이러한 장애 또는 병태를 갖는 대상체는 본 명세서에 기재된 실시형태의 조성물 또는 방법에 의한 치료가 유리할 것이다. 따라서 비정상적 MAGE-A1 발현과 관련된 일부 병태는 급성뿐만 아니라 만성 장애 및 질환, 예컨대 특정 장애의 성향이 있는 병리적 병태를 포함할 수 있다.
- [0126] MAGE-A1 발현과 관련된 병태의 일부 예는 종양, 신생물, 암, 악성종양 등을 포함하는 대상체에서 활성화된 그리고/또는 증식성 세포(이는 또한 전사적으로 과반응성일 수 있음)의 상태를 지칭하는 증식성 장애 또는 과증식성 장애를 포함한다. 활성화된 또는 증식성 세포에 추가로, 과증식성 장애는 또한 괴사에 의하든 또는 세포자멸사에 의하든, 세포사 과정의 이상 또는 조절장애를 포함할 수 있다. 세포사 과정의 이러한 이상은 암(1차, 2차 악성종양뿐만 아니라 전이를 포함) 또는 다른 병태를 포함하는, 다양한 병태와 관련될 수 있다.
- [0127] 대상체에서 과증식성 장애 또는 악성종양 병태의 존재는, 예를 들어 신생물, 종양, 비접촉 저해되거나 또는 종양발생적으로 형질전환된 세포 등(예를 들어, 고형암, 림프종 및 백혈병, 예컨대 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 등을 포함하는 혈액학적 암)을 포함하는, 대상체에서 이형성, 암성 및/또는 형질전환된 세포의 존재를 지칭하며, 이들은 당업계에 공지되어 있고, 이의 진단 및 분류를 위한 기준은 확립되어 있다(예를 들어, 문헌[Hanahan and Weinberg, *Cell* 144:646, 2011; Hanahan and Weinberg, *Cell* 100:57, 2000; Cavallo et al., *Canc. Immunol. Immunother.* 60:319, 2011; Kyrigideis et al., *J. Carcinog.* 9:3, 2010] 참조). 소정의 실시형태에서, 이러한 암 세포는 임의의 이들 유형의 암을 개시하고 연속적으로 이식할 수 있는 암 줄기 세포를 포함하는, 급성 골수성 백혈병, B-세포 림프아구성 백혈병, T-세포 림프아구성 백혈병, 또는 골수종의 세포일 수 있다(예를 들어, 문헌[Park et al., *Molec. Therap.* 17:219, 2009] 참조).
- [0128] 소정의 실시형태에서, 과증식성 장애, 예컨대 혈액학적 악성종양 또는 고형암을 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 치료가 필요한 인간 대상체에게 본 개시내용의 변형된 세포, 조성물 또는 단위 용량을 투여하는 단계를 포함한다. 예시적인 혈액학적 악성종양은 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 호산구성 백혈병(CEL), 골수이형성 증후군(MDS), 비호지킨 림프종(NHL) 또는 다발성 골수종(MM)을 포함한다.
- [0129] 추가 실시형태에서, 과증식성 장애를 치료하기 위한 방법이 제공되며, 예컨대 고형암은 비소세포 폐암(NSCLC), 삼중 음성 유방암(TNBC), 난소암, 악성 흑색종, 결장암, 결장직장 선암종, 결장직장암, 담관암, 방광암, 뼈 및 연조직 암종, 뇌 종양, 유방암, 자궁경부암, 테스토이드 종양, 배아암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 위 선암종, 다형성 교모세포종, 부인과 종양, 두경부 편평 세포 암종, 간암, 폐암, 악성종피종, 골육종, 췌장암, 췌관 선암종, 원발성 성상세포종, 원발성 갑상선암, 전립선암, 신장암, 신세포 암종, 횡문근육종, 피부암, 연조직 육종, 고환 생식세포 종양, 요로 상피 세포암, 자궁 육종, 또는 자궁암으로부터 선택된다.
- [0130] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 용어 "치료하다" 및 "치료"는 대상체(즉, 인간 또는 비인간 동물)일 수 있는 환자, 숙주)의 질환, 장애 또는 병태의 의학적 관리를 지칭한다(예를 들어, 문헌[Stedman's Medical Dictionary] 참조). 일반적으로, 적절한 용량 및 치료 요법은 치료적 또는 예방적 이점을 제공하기에 충분한 양으로 인간 MAGE-A1 또는 이를 발현시키는 숙주 세포, 및 선택적으로 보조 요법(예를 들어, 사이토카인, 예컨대 IL-2, IL-15, IL-21 또는 이들의 임의의 조합)에 특이적인 결합 단백질 또는 고친화도 재조합 TCR 중 하나 이상을 제공한다. 치료적 치료 또는 예방적 또는 방지적 방법으로부터 초래되는 치료적 또는 예방적 이점은, 예를 들어 개선된 임상 결과를 포함하되, 목적은 목적하는 생리학적 변화 또는 장애를 예방하거나 또는 지연시키거나 또는 달리 감소시키거나(예를 들어, 비처리 대조군에 비해 통계적으로 유의한 방식으로 감소), 또는 이러한 질환 또는 장애의 확장 또는 중증도를 지연시키거나 또는 달리 감소시키는 것이다. 대상체를 치료하는 것으로부터의 유리한 또는 목적하는 임상적 결과는 치료될 질환 또는 장애로부터 초래되거나 또는 이와 관련된 증상의 경감, 감소 또는 완화; 증상의 감소된 발생; 개선된 삶의 질; 더 긴 무 질환 상태(즉, 대상체가 질환의 진단이 만들어진 것에 기반하여 증상을 제공하는 가능성 또는 경향의 감소); 질환 정도의 감소; 안정화된(즉, 악화되지 않은) 질환 상태; 질환 진행의 지연 또는 늦춤; 질환 상태의 개선 또는 완화; 및 검출 가능하든 또는 검출 가능하지 않든 관해(부분적이든 또는 전체적이든); 또는 전반적 생존을 포함한다.

- [0131] "치료"는 또한 대상체가 치료를 받지 않는다면 예상된 생존에 비교할 때 연장된 생존을 의미할 수 있다. 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물이 필요한 대상체는 이미 질환 또는 장애를 갖는 대상체뿐만 아니라 질환 또는 장애를 갖거나 또는 발생할 위험에 있는 경향이 있는 대상체를 포함한다. 예방적 치료가 필요한 대상체는 질환, 병태 또는 장애가 예방될(즉, 질환 또는 장애의 발생 또는 재발 가능성이 감소되는) 대상체를 포함한다. 본 명세서에 기재된 조성물(및 조성물을 포함하는 제제) 및 방법에 의해 제공되는 임상적 이점은 실시예에 기재된 바와 같이 조성물의 투여가 유리하게 의도되는 시험관내 분석, 전임상 연구 및 임상 연구의 설계 및 실행에 의해 평가될 수 있다.
- [0132] 본 명세서에 개시된 방법의 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 클래스 I HLA-제한 방식으로 MAGE-A1에 대해 항원-특이적 T 세포 반응을 촉진시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 클래스 I HLA-제한 반응은 항원 처리와 연관된 수송체(transporter-associated with antigen processing: TAP)-독립적이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법에 따라 투여된 변형된 세포에 의해 촉진된 항원-특이적 T 세포 반응은 CD4+ 헬퍼 T 림프구(Th) 반응 및 CD8+ 세포독성 T 림프구(CTL) 반응 중 적어도 하나를 포함한다. 특정 실시형태에서, 현재 개시된 방법에 따라 유발된 CTL 반응은 비정상 MAGE-A1 발현을 갖는 세포(예를 들어, MAGE-A1+ 종양 세포)를 갖는 세포와 관련된다. CTL 면역 반응의 수준은 본 명세서에 기재된 수많은 면역학적 방법 중 어느 하나에 의해 결정되고 당 업계에서 일상적으로 실행될 수 있다. CTL 면역 반응의 수준은, 예를 들어, T 세포에 의해 발현된 본 명세서에 기재된 MAGE-A1-특이적 결합 단백질 중 어느 하나의 투여 전에 그리고 후에 결정될 수 있다. CTL 활성을 결정하기 위한 세포독성 분석은 당 업계에서 일상적으로 실행되는 몇몇 기법 및 방법 중 어느 하나를 이용하여 수행될 수 있다(예를 들어, 문헌[Henkart *et al.*, "Cytotoxic T-Lymphocytes" in *Fundamental Immunology*, Paul (ed.) (2003 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), 페이지 1127-50, 및 이에 인용된 참고문헌]).
- [0133] 항원-특이적 T 세포 반응은 적절한 내용에서 동족 항원(예를 들어, 면역적합성 항원-제시 세포에 의해 제시될 때 T 세포를 프라이밍하거나 또는 활성화하기 위해 사용되는 항원)에 노출되는 T 세포와 구조적으로 별개의 또는 부적절한 대조군 항원 대신에 노출되는 동일한 공급원 집단으로부터의 T 세포 사이에 만들어질 수 있는 임의의 본 명세서에 기재된 T 세포 기능성 매개변수(예를 들어, 증식, 사이토카인 방출, CTL 활성, 변경된 세포 표면 마커 표현형 등)에 따라 관찰된 T 세포 반응의 비교에 의해 전형적으로 결정된다. 대조군 항원에 대한 반응보다 통계학적 유의도가 더 큰 동족 항원에 대한 반응은 항원-특이성을 나타낸다.
- [0134] 생물학적 샘플은 본 명세서에 기재된 MAGE-A1-유래 항원 펩타이드에 대한 면역 반응의 존재 및 수준을 결정하기 위해 대상체로부터 얻을 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "생물학적 샘플"은 혈액 샘플(이로부터의 혈청 또는 혈장이 준비될 수 있음), 생검 표본, 체액(예를 들어, 폐 세척, 복수, 점막 세척, 활액), 골수, 림프절, 조직 외식편, 기관 배양물 또는 대상체 또는 생물학적 공급원으로부터의 임의의 다른 조직 또는 세포 제제일 수 있다. 생물학적 샘플은 또한 임의의 면역원성 조성물을 받기 전에 대상체로부터 얻을 수 있는데, 이의 생물학적 샘플은 기준(즉, 사전 면역화) 데이터를 확립하기 위한 대조군으로서 유용하다.
- [0135] 본 개시내용의 변형된 세포는, 소정의 실시형태에서, 입양 세포 요법에서 유용하다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 변형된 세포는 생체외에서 변형되고(예를 들어, 본 개시내용의 재조합 발현 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드), 이어서, 이것이 필요한 대상체에게 투여된다. 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 동종이계 세포, 동질유전자 세포 또는 자가 세포(즉, 변형된 세포를 투여한 대상체에 대해)이다. 임의의 본 명세서에 개시된 방법에서, 변형된 세포는 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, CD4- CD8- 이중 음성 T 세포, γ δ T 세포, 자연 살해 세포, 수지상 세포, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 변형된 인간 면역 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 T 세포이고, 예를 들어, 미경험 T 세포, 중심 기억 T 세포, 효과기 기억 T 세포 또는 이들의 임의의 조합이다.
- [0136] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법에서 사용되는 변형된 세포는 CD4+ T 세포이다. 일부 이러한 실시형태에서, 변형된 CD4+ T 세포는 CD8 공수용체의 적어도 세포의 부분을 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 선택적으로 완전한 CD8 α -쇄, 완전한 CD8 β -쇄, 또는 둘 다를 암호화한다. 이러한 방법은, 소정의 실시형태에서, 대상체에게 세포 표면, 예컨대 본 개시내용에 따른 CD8+ 변형된 T 세포 상에서 MAGE-A1 펩타이드:HLA 복합체에 특이적으로 결합할 수 있는 CD8+ T 세포를 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0137] 본 명세서에 개시된 치료 또는 예방 방법은 변형된 세포, 또는 병용 요법을 투여하거나 또는 투약하는 임의의 적절한 방법을 포함할 수 있다. 예를 들어, 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 복수의 용량의 변형된 세포는 대상체에게 투여되며, 이는 약 2 내지 약 4주의 투여 사이의 간격으로 투여될 수 있다. 추가로, 본 개시내용의 치료 또는 예방 방법은 본 명세서에 개시된 단위 용량, 세포 또는 조성물의 투여 전에 또는 후에

추가적인 치료를 포함할 수 있는 치료 과정 또는 요법의 부분으로서 대상체에게 투여될 수 있다. 추가 실시형태에서, 사이토카인은 순차적으로 투여되며, 단, 대상체는 사이토카인 투여 전에 적어도 3 또는 4회 제조합 숙주 세포가 투여된다. 소정의 실시형태에서, 사이토카인은 피하에 투여된다(예를 들어, IL-2, IL-15, IL-21). 또한 추가 실시형태에서, 치료 중인 대상체는 면역억제성 요법, 예컨대 칼시뉴린 저해제, 코티코스테로이드, 미세소관 저해제, 저용량의 마이코페놀산 프로드러그 또는 이들의 임의의 조합물을 추가로 받고 있다. 또한 추가 실시형태에서, 치료 중인 대상체는 골수 비파괴성(non-myeloablative) 또는 골수제거성(myeloablative) 조혈모세포 이식을 받되, 치료는 골수 비파괴성 조혈모세포 이식의 적어도 2개월 내지 적어도 3개월 후에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체는 DNA 저메틸화제 및 HDAC 저해제 중 하나 이상이 투여되었고, 이 중 하나 또는 둘 다는 MAGE-A1 발현을 향상시킴으로써(문헌[Weon, J.L. and P.R. Potts, *Curr Opin Cell Biol*, 2015. 37: p. 1-8] 참조) MAGE-A1를 표적화하는 입양 세포 요법을 향상시킬 수 있다.

[0138] 본 개시내용에 따른 방법은, 소정의 실시형태에서, 병용 요법에서 질환 또는 장애를 치료하기 위해 1종 이상의 추가적인 제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 예를 들어, 소정의 실시형태에서, 병용 요법은 면역관문 저해제와 함께 변형된 세포를 (일제히, 동시에 또는 순차적으로) 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 병용 요법은 자극 면역관문 제제의 작용제와 함께 변형된 세포를 투여하는 것을 포함한다. 추가 실시형태에서, 병용 요법은 2차 요법, 예컨대 화학치료제, 방사선 요법, 수술, 항체 또는 이들의 임의의 조합과 함께 변형된 세포를 투여하는 것을 포함한다.

[0139] 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역 억제제" 또는 "면역억제 제제"는 면역 반응을 제어하거나 또는 억제하는 데 도움을 주는 저해 신호를 제공하는 하나 이상의 세포, 단백질, 분자, 화합물 또는 복합체를 지칭한다. 예를 들어, 면역 억제제는 면역 자극을 부분적으로 또는 전체적으로 차단하거나; 면역 활성화를 감소시키거나, 방지하거나 또는 지연시키거나; 또는 면역 억제를 증가시키거나, 활성화시키거나 또는 상향조절하는 해당 분자를 포함한다. (예를 들어, 면역관문 저해제로) 표적화하기 위한 예시적인 면역억제제는 PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, CTLA4, B7-H3, B7-H4, CD244/2B4, HVEM, BTLA, CD160, TIM3, GAL9, KIR, PVR1G (CD112R), PVRL2, 아데노신, A2aR, 면역억제성 사이토카인(예를 들어, IL-10, IL-4, IL-1RA, IL-35), IDO, 알기나제, VISTA, TIGIT, LAIR1, CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5, Treg 세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0140] 면역 억제제 저해제(또한 면역관문 저해제로서 지칭됨)는 화합물, 항체, 항체 단편 또는 융합 폴리펩타이드(예를 들어, Fc 융합, 예컨대 CTLA4-Fc 또는 LAG3-Fc), 안티센스 분자, 리보자임 또는 RNAi 분자 또는 저분자량 유기 분자일 수 있다. 본 명세서에 개시된 임의의 실시형태에서, 방법은 단일로 또는 임의의 조합으로 다음의 면역 억제 성분 중 어느 하나의 1종 이상의 저해제와 함께 변형된 세포를 포함할 수 있다.

[0141] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 PD-1 저해제, 예를 들어 PD-1-특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 예컨대 피달리주맙, 니블루맙, 펌브롤리주맙, MEDI0680(이전에 AMP-514), AMP-224, BMS-936558 또는 이들의 임의의 조합과 병용하여 사용된다. 추가 실시형태에서, 본 개시내용의 변형된 세포는 PD-L1 특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 예컨대 BMS-936559, 두발루맙(MEDI4736), 아테졸리주맙(RG7446), 아벨루맙(MSB0010718C), MPDL3280A, 또는 이들의 임의의 조합과 병용하여 사용된다.

[0142] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 변형된 세포는 LAG3 저해제, 예컨대 LAG525, IMP321, IMP701, 9H12, BMS-986016 또는 이들의 임의의 조합과 병용하여 사용된다.

[0143] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 CTLA4의 저해제와 병용하여 사용된다. 특정 실시형태에서, 변형된 세포는 CTLA4 특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 예컨대 이필리무맙, 트레멜리무맙, CTLA4-Ig 융합 단백질(예를 들어, 아바타셉트, 벨라타셉트) 또는 이들의 임의의 조합물과 병용하여 사용된다.

[0144] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 B7-H3 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 예컨대 에노블리투주맙(MGA271), 376.96 또는 둘 다와 병용하여 사용된다. B7-H4 항체 결합 단편은, 예를 들어, 문헌[Dangaj et al., *Cancer Res.* 73:4820, 2013]에 기재된 바와 같은 scFv 또는 이의 융합 단백질뿐만 아니라 미국 특허 제 9,574,000호 및 국제 특허 출원 WO /201640724A1 및 WO 2013/025779A1에 기재된 것일 수 있다.

[0145] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 CD244의 저해제와 병용하여 사용된다.

[0146] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 BLTA, HVEM, CD160 또는 이들의 임의의 조합물의 저해제와 병용하여 사용된다. 항 CD-160 항체는, 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 2010/084158에 기재되어 있다.

[0147] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 TIM3의 저해제와 병용하여 사용된다.

- [0148] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 Ga19의 저해제와 병용하여 사용된다.
- [0149] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 아데노신 신호전달의 저해제, 예컨대 데코이 아데노신 수용체와 병용하여 사용된다.
- [0150] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 A2aR의 저해제와 병용하여 사용된다.
- [0151] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 KIR의 저해제, 예컨대 릴리루맵(BMS-986015)과 병용하여 사용된다.
- [0152] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 저해 사이토카인의 저해제(전형적으로, TGFβ 이외의 사이토카인) 또는 Treg 발생 또는 활성과 병용하여 사용된다.
- [0153] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 IDO 저해제, 예컨대 레보-1-메틸 트립토판, 에파카도스테트(INCB024360; Liu *et al.*, *Blood* 115:3520-30, 2010), 엡셀렌(Terentis *et al.*, *Biochem.* 49:591-600, 2010), 인독시모드, NLG919(Mautino *et al.*, American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013; Apr 6-10, 2013), 1-메틸-트립토판(1-MT)-티라-과자민 또는 이들의 임의의 조합물과 병용하여 사용된다.
- [0154] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 알기나제 저해제, 예컨대 N(오메가)-나이트로-L-알기닌 메틸 에스터(L-NAME), N-오메가-하이드록시-노르-1-알기닌(노르-NOHA), L-NOHA, 2(S)-아미노-6-보로노헥산산(ABH), S-(2-보로노에틸)-L-시스테인(BEC) 또는 이들의 임의의 조합물과 병용하여 사용된다.
- [0155] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 VISTA의 저해제, 예컨대 CA-170(매사추세츠주 렉싱턴에 소재한 큐리스(Curis))과 병용하여 사용된다.
- [0156] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 TIGIT의 저해제, 예를 들어, COM902(캐나다 온타리오주 토론토에 소재한 컴퓨젠사(Compugen)), CD155의 저해제, 예를 들어, COM701(컴퓨젠사), 또는 둘 다와 병용하여 사용된다.
- [0157] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 PVRIG, PVRL2 또는 둘 다의 저해제와 병용하여 사용된다. 항-PVRIG 항체는, 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 2016/134333에 기재되어 있다. 항-PVRL2 항체는, 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 2017/021526에 기재되어 있다.
- [0158] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 LAIR1 저해제와 병용하여 사용된다.
- [0159] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5, 또는 이들의 임의의 조합물의 저해제와 병용하여 사용된다.
- [0160] 소정의 실시형태에서, 변형된 세포는 자극 면역관문 분자의 활성을 증가시키는(즉, 작용제인) 제제와 병용하여 사용된다. 예를 들어, 변형된 세포는 CD137(4-1BB) 작용제(예를 들어, 우렐루맵), CD134(OX-40) 작용제(예를 들어, MEDI6469, MEDI6383 또는 MEDI0562), 레날리도마이드, 포말리도마이드, CD27 작용제(예를 들어, CDX-1127), CD28 작용제(예를 들어, TGN1412, CD80 또는 CD86), CD40 작용제(예를 들어, CP-870,893, rhuCD40L 또는 SGN-40), CD122 작용제(예를 들어, IL-2) GITR의 작용제(예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 2016/054638 에 기재된 인간화된 단클론성 항체), ICOS의 작용제(CD278)(예를 들어, GSK3359609, mAb 88.2, JTX-2011, Icos 145-1, Icos 314-8, 또는 이들의 임의의 조합물)와 병용하여 사용될 수 있다. 본 명세서에 개시된 임의의 실시형태에서, 방법은 단일로 또는 임의의 조합으로 임의의 앞서 언급한 것을 포함하는 자극 면역관문 분자의 1종 이상의 작용제와 함께 변형된 세포를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0161] 소정의 실시형태에서, 병용 요법은 비염증 고형 종양, 방사선 치료, 수술, 화학치료제, 사이토카인, RNAi, 또는 이들의 임의의 조합에 의해 발현되는 암 항원에 특이적인 항체 또는 이의 항원 결합 단편 중 하나 이상을 포함하는 변형된 세포 및 2차 요법을 포함한다.
- [0162] 소정의 실시형태에서, 병용 요법 방법은 변형된 세포를 투여하는 단계 및 방사선 치료 또는 수술을 추가로 투여하는 단계를 포함한다. 방사선 요법은 당업계에 잘 공지되어 있고, X-선 요법, 예컨대 감마-조사, 및 방사성약물 요법을 포함한다. 대상체에서 주어진 암을 치료하는 데 적절한 수술 및 수술적 기법은 당업자에게 잘 공지되어 있다.
- [0163] 소정의 실시형태에서, 병용 요법 방법은 변형된 세포를 투여하는 단계 및 화학치료제를 추가로 투여하는 단계를 포함한다. 화학치료제는 염색질 기능의 저해제, 토포아이스오머라제 저해제, 미세소관 저해 약물, DNA 손상제, 대사길항물질(예컨대 엽산 길항제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체 및 당변형 유사체), DNA 합성 저해제, DNA 상호작용제(예컨대 끼어들기 약물) 및 DNA 수선 저해제를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 예시적인 화학치료

제는, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 다음의 그룹을 포함한다: 항대사물질/항암제, 예컨대 피리미딘 유사체 (5-플루오로유라실, 플록수리딘, 카펙시타빈, 겐시타빈 및 사이타라빈) 및 퓨린 유사체, 엽산 길항제 및 관련된 저해제(머캅토티urin, 티오구아닌, 펜토스타틴 및 2-클로로데옥시아데노신(클라드리빈)); 빈카 알칼로이드와 같은 천연 산물을 포함하는 항증식성/항유사분열제(빈블라스틴, 빈크리스틴 및 비노렐빈), 미세소관 교란물질, 예컨대 탁산(파클리탁셀, 도세탁셀), 빈크리스틴, 빈블라스틴, 노코다졸, 에포틸론 및 나벨빈, 에피도포도필로톡신(에토포사이드, 테니포사이드), DNA 손상제(악티노마이신, 암사크린, 안트라사이클린, 블레오마이신, 부셀판, 캄토테신, 카보플라틴, 클로람부실, 시스플라틴, 사이클로포스파마이드, 사이톡산, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 헥사메틸멜라민옥살리플라틴, 이포스파마이드, 멜팔란, 메클로르에타민, 미토마이신, 미톡산트론, 나이트로소유레아, 플리카마이신, 프로카바진, 탁솔, 탁소텔, 테모졸라마이드, 테니포사이드, 트라이에틸렌티오포스포아마이드 및 에토포사이드(VP 16)); 항생제, 예컨대 닥티노마이신(악티노마이신 D), 다우노루비신, 독소루비신(아드리아마이신), 이다루비신, 안트라사이클린, 미톡산트론, 블레오마이신, 플리카마이신(미트라마이신) 및 미토마이신; 효소(L-아스파라긴을 전신으로 대사하고 그 자체의 아스파라긴을 합성하는 능력을 갖지 않는 세포를 부족하게 하는 L-아스파라기나제); 항혈소판제; 항증식성/항유사분열 알킬화제, 예컨대 질소 머스터드(메클로르에타민, 사이클로포스파마이드 및 유사체, 멜팔란, 클로람부실), 에틸렌이민 및 메틸멜라민(헥사메틸멜라민 및 티오테파), 알킬 설포네이트-부셀판, 니트로소유레아(카무스틴(BCNU) 및 유사체, 스트렙토조신), 트라젠 - 다카르바진(DTIC); 항증식성/항유사분열 항대사물질, 예컨대 엽산 유사체(메토티렉세이트); 백금 배위 복합체(시스플라틴, 카보플라틴), 프로카바진, 하이드록시유레아, 미토탄, 아미노글루테티마이드; 호르몬, 호르몬 유사체(에스트로겐, 타목시펜, 고세렐린, 비칼루타마이드, 닐루타마이드) 및 아로마타제 저해제(레트로졸, 아나스트로졸); 항응고제(헤파린, 합성 헤파린 염 및 트롬빈의 다른 저해제); 피브린 용해제(예컨대 조직 플라스미노겐 활성화제, 스트렙토키나제 및 유로키나제), 아스피린, 다이피리다몰, 티클로피딘, 클로피도그렐, 압식시맙; 향이동제; 항분비제(브레벨딘); 면역억제성(사이클로스포린, 타크롤리무스(FK-506), 시롤리무스(라파마이신), 아자티오프린, 마이코페놀레이트 모페틸); 항혈관신생 화합물(TNP470, 게니스테인) 및 성장 인자 저해제(혈관내피성장인자(VEGF) 저해제, 섬유아세포 성장인자(FGF) 저해제); 안지오텐신 수용체 차단제; 산화질소 공여자; 안티-센스 올리고뉴클레오타이드; 항체(트라스투주맙, 리툽시맙); 키메라 항원 수용체; 세포 주기 저해제 및 분화 유도제(트레티노인); mTOR 저해제, 토포아이스머라제 저해제(독소루비신(아드리아마이신), 암사크린, 캄토테신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 에니포사이드, 에피루비신, 에토포사이드, 이다루비신, 이리노테칸(CPT-11) 및 미톡산트론, 토포테칸, 이리노테칸), 코티코스테로이드(코티손, 텍사메타손, 하이드로코티손, 메틸페드니솔론, 프레드니손 및 프레니솔론); 성장 인자 신호 전달도입 키나제 저해제; 미토콘드리아 기능장애 유도제, 독소, 예컨대 콜레라 독소, 리신, 슈도모나스 외독소, 백일해균 아데닐레이트 사이클라제 독소 또는 디프테리아 독소, 및 카스파제 활성화제; 및 염색질 교란물질.

[0164] 사이토카인은 항암 활성화에 대해 숙주 면역 반응을 조작하기 위해 점진적으로 사용된다. 예를 들어, 문헌[Floros & Tarhini, *Semin. Oncol.* 42(4):539-548, 2015] 참조. 면역 항암 또는 항종양 반응을 촉진시키는 데 유용한 사이토카인은 단일로 또는 본 개시내용의 변형된 세포와 병용하여, 예를 들어, IFN- α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-24 및 GM-CSF를 포함한다.

[0165] 실시예

[0166] 실시예 1

[0167] 암 에피토프에 특이적인 고친화도 TCR의 생성

[0168] 입양 세포 요법에서 사용하기 위한 고친화도 TCR의 생성은 흥선 선택으로 인해 어려우며, 자기-항원(예를 들어, MART1 및 MAGE-A1)에 대해 고친화도를 갖는 TCR이 제거되고, 따라서 외래 항원에 특이적인 TCR에 비해 상대적으로 희귀하다(예를 들어, 도 1A 및 도 1B). 도 2a 및 도 2b에 나타낸 바와 같이, 새로운 선별 및 농축 과정은 MAGE-A1에 특이적인 고친화도 TCR을 동정하기 위해 개발되었다. 간략하게, 12명의 건강한 공여자의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터의 CD8+ T 세포를 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-21의 존재하에 펩타이드-펄스 자가 DC로 1회 그리고 펩타이드-펄스 자가 PBMC로 2회 자극하여, 다클론성 MAGE-A1-특이적 CD8+ T 세포주를 얻었다. 모든 공여자로 부터의 자극된 세포주를 풀링하고 나서, 제한된 농도의 MAGE-A1 펩타이드:MHC 다량체를 이용하여 몇회 분류하였고, 고친화도 T 세포 클론의 농축 집단을 생산하였다. 집단으로부터의 TCR β 유전자를 풀링한 그리고 개개의 pMHC 부류에서 TCR의 빈도에 대해 서열분석하였다.

[0169] 도 3은 MAGE-A1 항원에 특이적인 TCR β CDR3을 발현시키는 T 세포를 농축시킨 일련의 pMHC 분류로부터의 예시적 데이터를 나타낸다. 고친화도 클론을 MAGE-A1:MHC에 강하게 결합된 풀로부터 동정하였고, 이는 더 낮은 EC₅₀과

상관관계가 있었다(도 4A, 도 4B).

[0170]

실시예 2

[0171]

MAGE-A1-특이적 TCR의 시험관내 기능성

[0172]

실시예 1의 방법을 이용하여 생성된 고친화도 MAGE-A1-특이적 CD8⁺ T 세포 클론 "MA2"(도 5a)를 추가 검사를 위해 선택하였다. 도 5b에 나타난 바와 같이, MA2⁺ CD8⁺ T 세포는 MAGE-A1-발현 HAL-A*0201⁺ U266 다발성 골수종 세포와 함께 공동배양하였을 때(10:1의 효과기 대 표적(E:T) 비, 4시간) 사이토카인을 선택적으로 생산하였다. 표준 4시간, Cr⁵¹-방출 분석에서, MA2⁺ T 세포는 외인성 IFN- γ 및 MAGE-A1 펩타이드의 존재 또는 부재하에 표적 세포를 사멸시킬 수 있었다(도 5c).

[0173]

실시예 3

[0174]

MAGE-A1-특이적 CD8 TCR은 CD8과 독립적으로 사랑체에 결합한다

[0175]

CD8⁺ TCR은 클래스 I HLA 분자에 의해 제시되는 항원을 인식하는 반면, CD4⁺ TCR은 클래스 II HLA과 관련하여 제시된 항원을 인식한다. 고친화도 MA2 TCR이 CD8과 독립적으로 MAGE-A1:HLA I에 결합할 수 있는지의 여부를 시험하기 위해, CD4⁺ T 세포에 MA2 TCR을 형질도입하였다(예를 들어, 도 6a 및 도 6b의 개략적 다이어그램 참조). 도 7a 및 도 7b에 나타난 바와 같이, CD4⁺ T 세포에 MA2 CD8⁺ T 세포와 비슷한 친화도(대략 친화도로 B_{max}의 대략 5배 차이)로 MAGE-A1:HLA 사랑체에 결합된 MA2 TCR을 형질도입하였다. 그러나, 도 7c에 나타난 바와 같이, 형질도입된 CD4⁺ T 세포는 시험관내 세포를 사멸시키지 않았다.

[0176]

실시예 4

[0177]

MAGE-A1-특이적 CD8 TCR 및 CD8 공수용체를 발현시키는 조작된 CD4⁺ T 세포의 기능성 시험

[0178]

다음에, 고친화도 CD8-TCR-발현 CD4⁺ T 세포의 기능성을 개선시키는 CD8⁺ 공수용체의 능력을 연구하였다(예를 들어, 도 6a). 도 8a의 다이어그램에 도시한 바와 같이, CD4⁺ T 세포를 고친화도 클래스-I-제한된 MAGE-A1-특이적 TCR과 CD8 공수용체 둘 다로 형질도입하였다. 도 8b는 외인성 CD8 TCR과 CD8 공수용체 둘 다를 형질도입한 더 큰 비율의 CD4⁺ T 세포가 외인성 CD8 TCR을 단독으로 형질도입한 CD4⁺ T 세포에 비해 항원에 반응하여 사이토카인을 생산하였다는 것을 나타낸다. 도 8c는 이중으로 형질도입된 CD4⁺ T 세포가 놀랍게도 동일한 고친화도 TCR을 발현시키는 CD8⁺ T 세포와 비슷한 비율로 MEL526 표적 세포에 대해 세포용해성 활성을 나타내었다는 것을 나타낸다. 도 8d에 나타난 바와 같이, 이중으로 형질도입된 CD4⁺ T 세포는 또한 CD8이 없는 MA2⁺ CD4⁺ 세포보다 항원에 의한 자극 후 더 강하게 증식하였다.

[0179]

이들 데이터는 본 개시내용의 고친화도 MAGE-A1-특이적 TCR, 및 이를 발현시키는 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포가 MAGE-A1-발현 암 세포를 표적화하고 사멸시키는 데 유용하며 MAGE-A1-발현 질환에 대해 세포 면역요법에서의 용도를 가진다는 것을 나타낸다.

[0180]

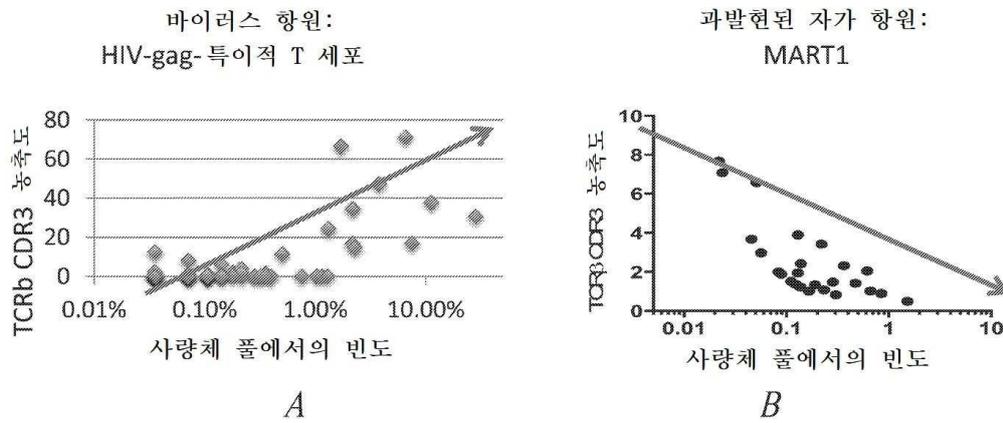
상기 기재한 다양한 실시형태는 추가 실시형태를 제공하도록 조합될 수 있다. 본 명세서에 언급되고/되거나 출원 데이터 시트에 열거된(만약에 있다면, 2017년 3월 15일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/471,956호를 포함) 미국 특허, 미국 특허 출원 공개, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및 비특허 간행물 모두는 그들이 전문이 본 명세서에 참고로 편입된다. 또한 추가 실시형태를 제공하기 위해 다양한 특허, 출원 및 간행물의 개념을 사용하는 것이 필요하다면, 실시형태의 양상은 변형될 수 있다.

[0181]

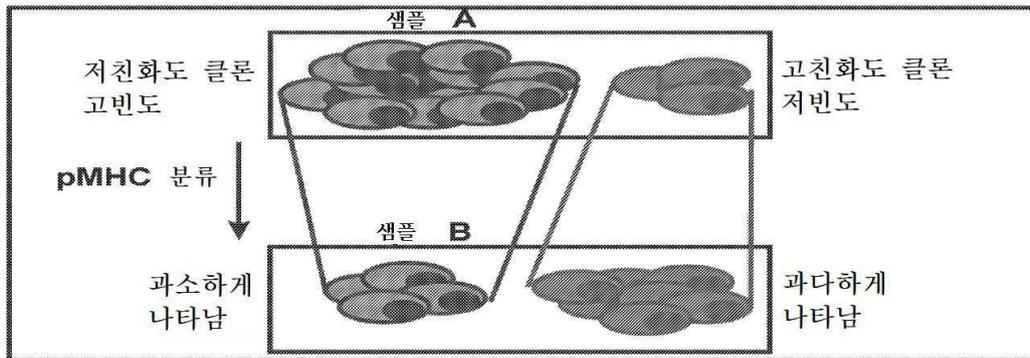
이들 및 다른 변화는 상기 상세한 설명에 비추어 실시형태로 만들어질 수 있다. 일반적으로, 다음의 청구범위, 사용되는 용어는 본 명세서 및 청구범위에 개시된 구체적 실시형태로 청구범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 되지만, 이러한 청구범위가 자격을 부여하는 동등물의 완전한 범주와 함께 모든 가능한 실시형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 청구범위는 본 개시내용에 의해 제한되지 않는다.

도면

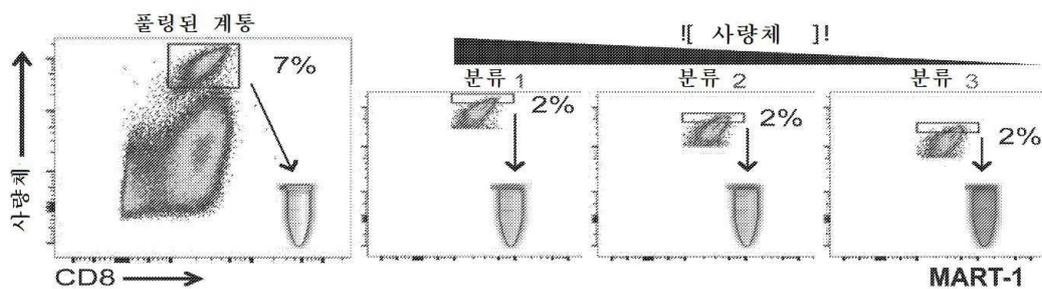
도면1



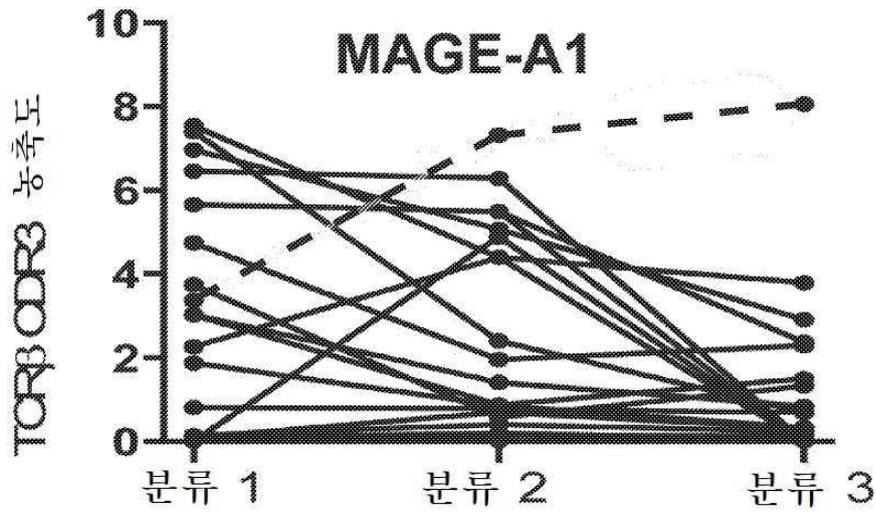
도면2a



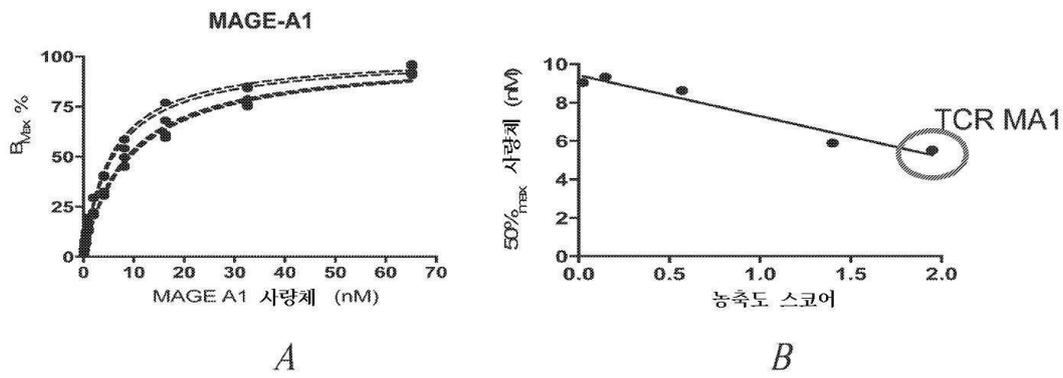
도면2b



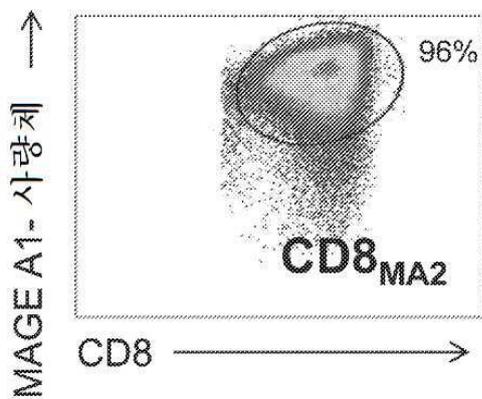
도면3



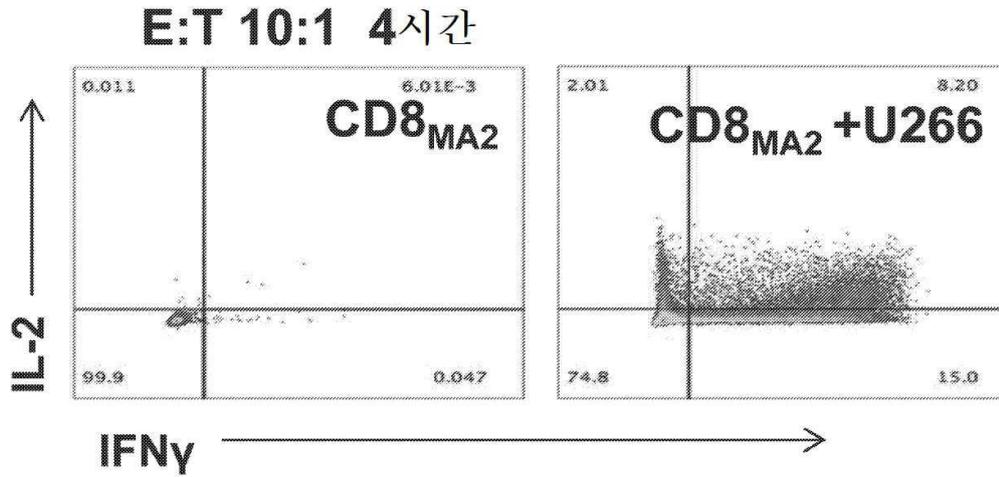
도면4



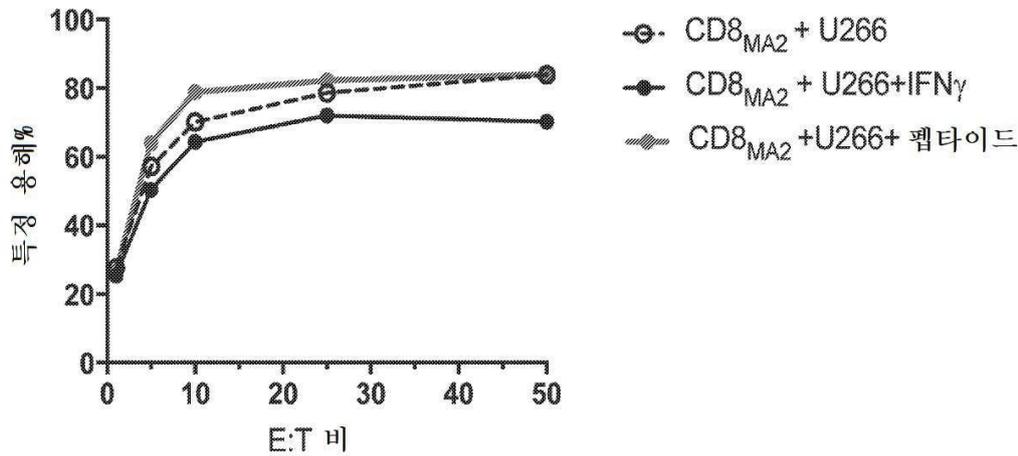
도면5a



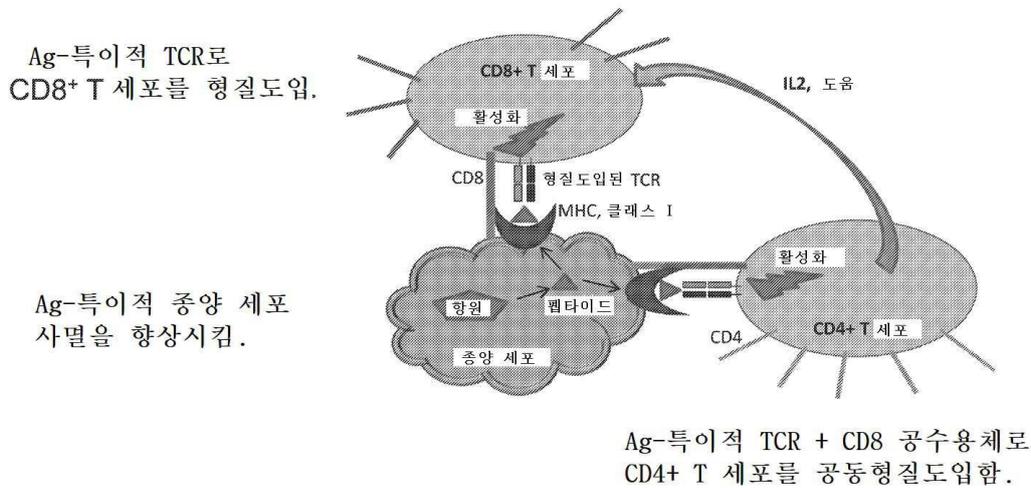
도면5b



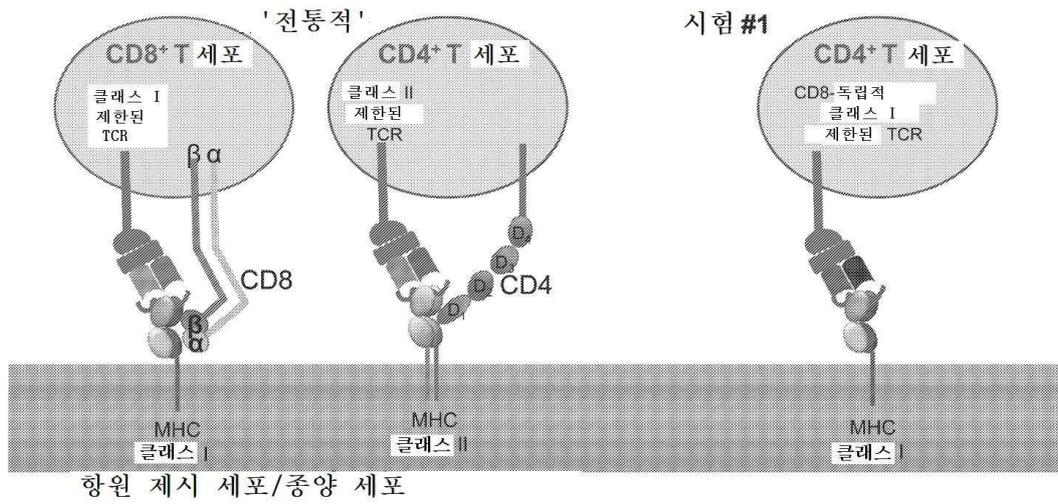
도면5c



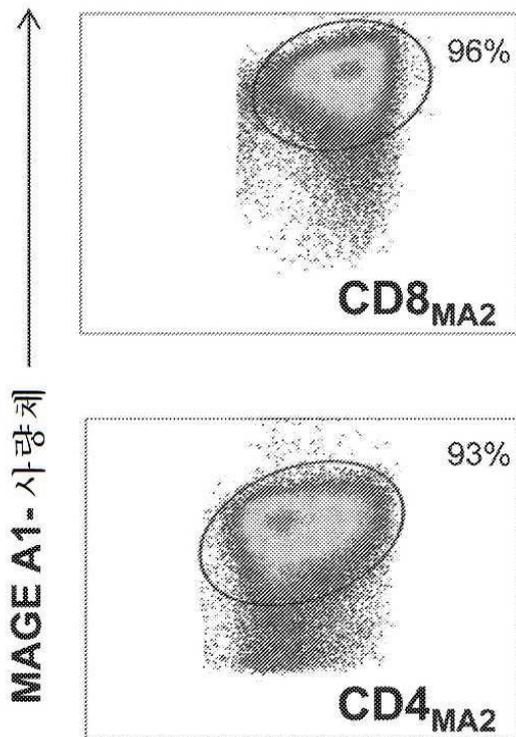
도면6a



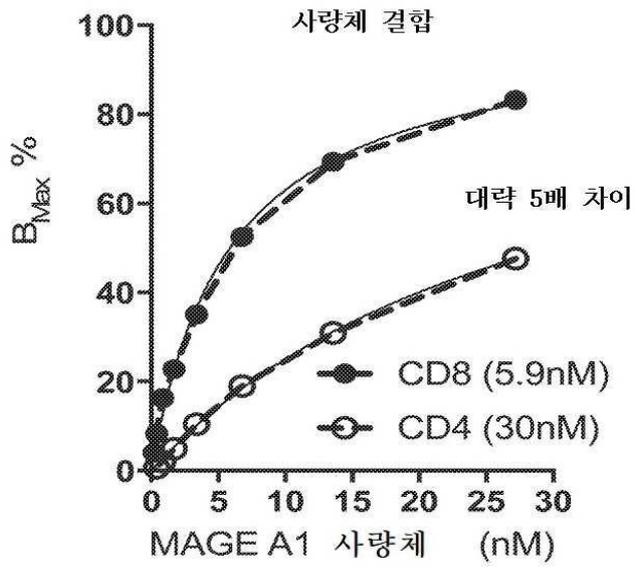
도면6b



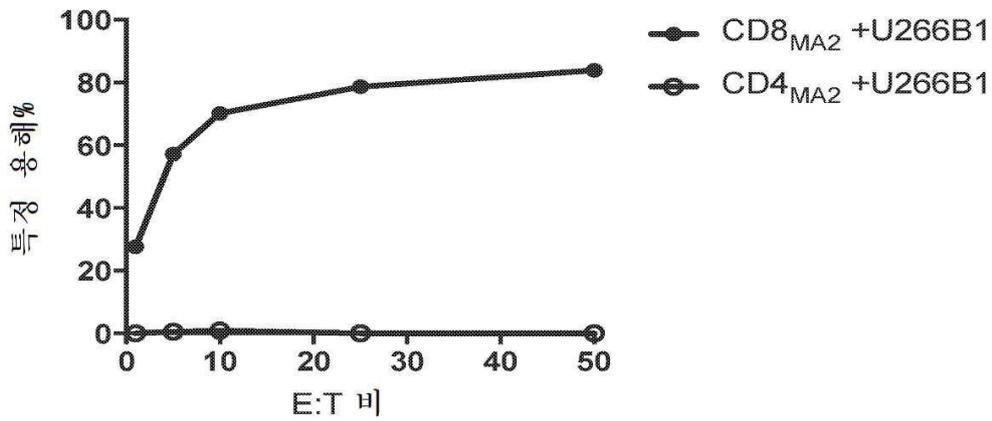
도면7a



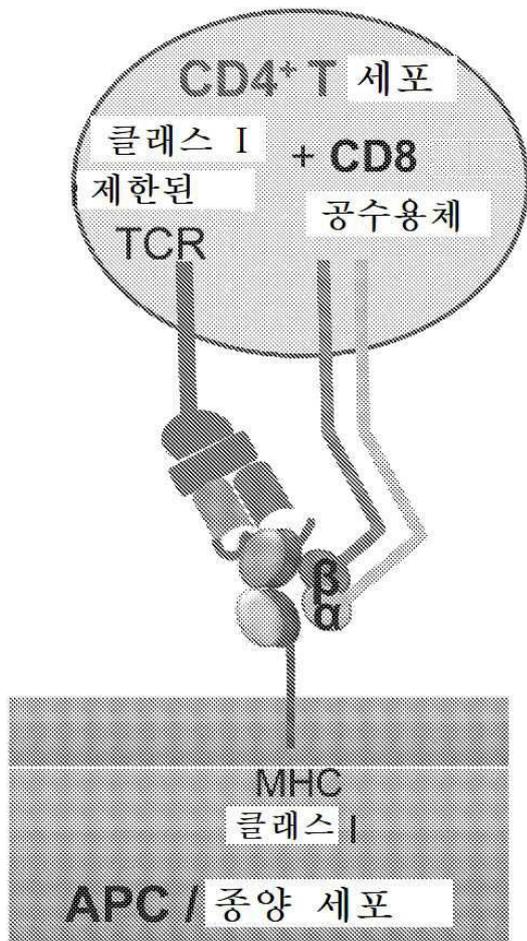
도면7b



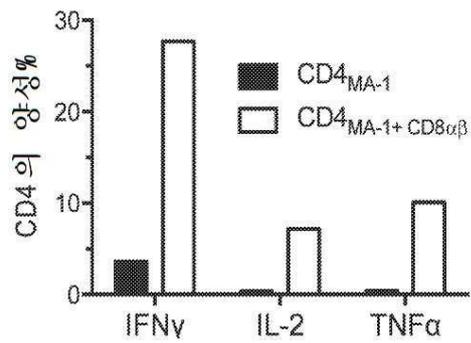
도면7c



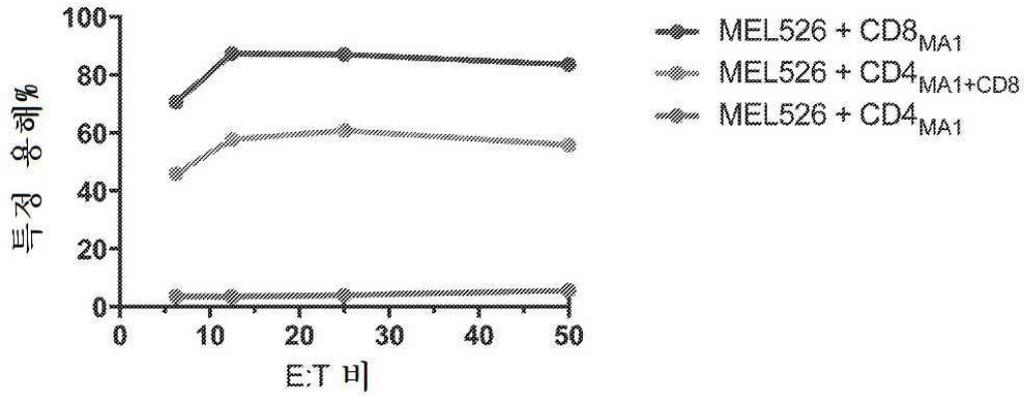
도면8a



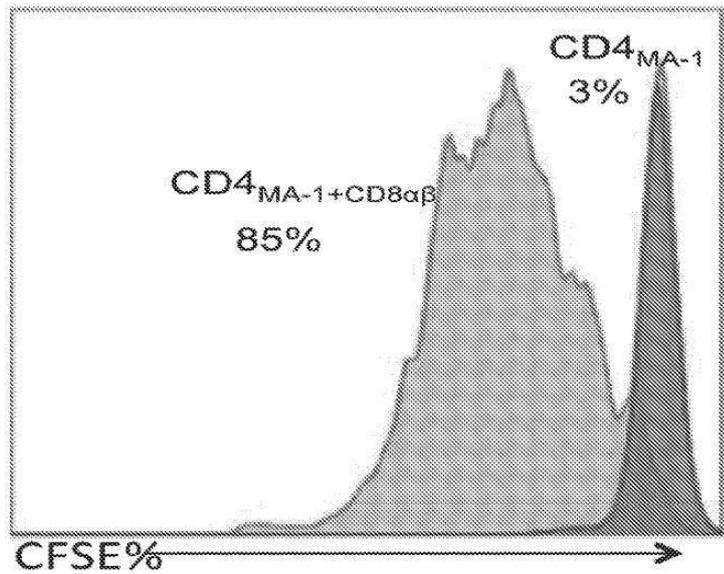
도면8b



도면8c



도면8d



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Fred Hutchinson Cancer Research Center
- <120> HIGH AFFINITY MAGE-A1 SPECIFIC TCRS AND USES THEREOF
- <130> WO/2018/170338
- <140> PCT/US2018/022759
- <141> 2018-03-15
- <150> US 62/471,956
- <151> 2017-03-15
- <160> 148

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence beta chain variable domain
(amino acid)

<400> 1

Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val

1	5	10	15												
Gly	Leu	Val	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Gln	Ser	Ser	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys
	20	25	30												
Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Phe	Leu	Glu	Cys	Val	Gln	Asp	Met	Asp	His
	35	40	45												
Glu	Asn	Met	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu
	50	55	60												
Ile	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Asp	Val	Lys	Met	Lys	Glu	Lys	Gly	Asp	Ile	Pro
65	70	75	80												

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

<210> 2

<211> 177

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence beta chain constant domain

(amino acid)

<400> 2

Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro

1 5 10 15

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu

20 25 30

Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn

35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys

50 55 60

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu

65 70 75 80

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys

85 90 95

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp

100 105 110

Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg

115 120 125

Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser

130 135 140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe

<210> 3

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence alpha chain variable domain

(amino acid)

<400> 3

Met Lys Pro Thr Leu Ile Ser Val Leu Val Ile Ile Phe Ile Leu Arg

1 5 10 15
 Gly Thr Arg Ala Gln Arg Val Thr Gln Pro Glu Lys Leu Leu Ser Val
 20 25 30
 Phe Lys Gly Ala Pro Val Glu Leu Lys Cys Asn Tyr Ser Tyr Ser Gly
 35 40 45
 Ser Pro Glu Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Ser Arg Gln Arg Leu Gln
 50 55 60
 Leu Leu Leu Arg His Ile Ser Arg Glu Ser Ile Lys Gly Phe Thr Ala
 65 70 75 80

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

<210> 4

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence alpha chain constant domain

(amino acid)

<400> 4

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 20 25 30
 Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys
 35 40 45

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 50 55 60
 Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
 65 70 75 80
 Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
 85 90 95
 Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
 100 105 110
 Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
 115 120 125
 Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 130 135 140

<210> 5

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence beta chain variable domain

(amino acid)

<400> 5

Met Gly Phe Arg Leu Leu Cys Cys Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Gly Pro Val Asp Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr
 20 25 30
 Ala Thr Gly Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp
 35 40 45
 Leu Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe
 50 55 60
 Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu
 65 70 75 80
 Glu Arg Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn
 85 90 95

Leu Ser Ser Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser
 100 105 110
 Ser Gln Gly Asp Glu Lys Leu Phe Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Ser
 115 120 125
 Val Leu
 130
 <210> 6
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence beta chain constant domain
 (amino acid)
 <400> 6
 Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
 1 5 10 15
 Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 20 25 30
 Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 35 40 45
 Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
 50 55 60
 Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
 65 70 75 80
 Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
 85 90 95
 Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
 100 105 110

 Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
 115 120 125
 Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
 130 135 140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
 145 150 155 160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
 165 170 175

Phe

<210> 7

<

211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence alpha chain variable domain

(amino acid)

<400> 7

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser
 20 25 30

Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser
 35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu
 50 55 60

Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln
 65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg
 85 90 95

Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu
 100 105 110

Ser Ile Asp Ala Arg Leu Met Phe Gly Asp Gly Thr Gln Leu Val Val
 115 120 125

Lys Pro

130

<210> 8

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence alpha chain constant domain

(amino acid)

<400> 8

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

1 5 10 15

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr

20 25 30

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys

35 40 45

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala

50 55 60

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser

65 70 75 80

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp

85 90 95

Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe

100 105 110

Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala

115 120 125

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

130 135 140

<210> 9

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence beta chain variable domain

(amino acid)

<400> 9

Met Leu Cys Ser Leu Leu Ala Leu Leu Leu Gly Thr Phe Phe Gly Val
 1 5 10 15
 Arg Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val
 20 25 30
 Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro
 35 40 45
 Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu
 50 55 60
 Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn
 65 70 75 80
 Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys
 85 90 95

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Leu Ser Thr
 100 105 110
 Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr
 115 120 125

<210> 10

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence beta chain constant domain

(amino acid)

<400> 10

Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser
 1 5 10 15
 Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
 20 25 30
 Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
 35 40 45
 Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu
 50 55 60

115 120 125
 Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

130 135 140

<210> 13

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence beta chain variable domain

(amino acid)

<400> 13

Met Leu Cys Ser Leu Leu Ala Leu Leu Leu Gly Thr Phe Phe Gly Val

1 5 10 15
 Arg Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

20 25 30
 Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

35 40 45
 Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

50 55 60
 Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn

65 70 75 80

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys
 85 90 95

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Val
 100 105 110

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

Val

<210> 14

<211> 177

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence beta chain constant domain
(amino acid)

<400> 14

Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
 1 5 10 15
 Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 20 25 30
 Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 35 40 45
 Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
 50 55 60
 Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu

 65 70 75 80
 Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
 85 90 95
 Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
 100 105 110
 Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
 115 120 125
 Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
 130 135 140

 Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
 145 150 155 160
 Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
 165 170 175
 Phe

<210> 15

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence alpha chain variable domain

(amino acid)

<400> 15

Met Thr Arg Val Ser Leu Leu Trp Ala Val Val Val Ser Thr Cys Leu
 1 5 10 15

Glu Ser Gly Met Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser
 20 25 30

Val Gln Glu Ala Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser
 35 40 45

Glu Asn Asn Tyr Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln
 50 55 60

Met Ile Leu Val Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr
 65 70 75 80

Glu Asn Arg Phe Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Asp Ser Gln Leu Gly Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ala Phe Gly Glu Gly Ala Arg Leu Met Phe Gly Asp Gly Thr Gln Leu
 115 120 125

Val Val Lys Pro
 130

<210> 16

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence alpha chain constant domain

(amino acid)

<400> 16

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

1 5 10 15

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 20 25 30

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys
 35 40 45
 Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 50 55 60
 Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
 65 70 75 80

 Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
 85 90 95
 Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
 100 105 110
 Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
 115 120 125
 Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 130 135 140
 <210> 17
 <211> 129
 <212> PRT
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence beta chain variable domain
 (amino acid)
 <400> 17
 Met Leu Cys Ser Leu Leu Ala Leu Leu Leu Gly Thr Phe Phe Gly Val
 1 5 10 15
 Arg Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val
 20 25 30
 Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro
 35 40 45
 Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu

 50 55 60
 Phe Tyr Ser Ile Gly Ile Asp Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn
 65 70 75 80

130 135 140
 Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val
 145 150 155 160
 Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser
 165 170 175

Arg Gly

<210> 19

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<

223> Synthetic sequence alpha chain variable domain

(amino acid)

<400> 19

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

50 55 60
 Met Met Leu Gln Lys Gly Gly Glu Glu Lys Ser His Glu Lys Ile Thr
 65 70 75 80
 Ala Lys Leu Asp Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala
 85 90 95
 Ser Gln Pro Ser His Ala Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ala Pro Thr
 100 105 110
 Tyr Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Gln Gly Asn Leu Ile Phe Gly Lys Gly
 115 120 125

Thr Lys Leu Ser Val Lys Pro
 130 135

<210> 20

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence alpha chain constant domain
(amino acid)

<400> 20

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

1 5 10 15

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr

 20 25 30

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys

 35 40 45

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala

50 55 60

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser

65 70 75 80

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp

 85 90 95

Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe

 100 105 110

Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala

 115 120 125

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

 130 135 140

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.1 beta chain CDR1 domain
(amino acid)

<400> 21

Met Asp His Glu Asn

1 5

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.1 beta chain CDR2 domain

(amino acid)

<400> 22

Ser Tyr Asp Val Lys Met

1 5

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.1 beta chain CDR3 domain

(amino acid)

<400> 23

Cys Ala Ser Asn Asn Arg Asp Ser Tyr Asn Ser Pro Leu His Phe

1 5 10 15

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.1 alpha chain CDR1 domain

(amino acid)

<400> 24

Tyr Ser Gly Ser Pro Glu

1 5

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.1 alpha chain CDR2 domain

(amino acid)

<400> 25

His Ile Ser Arg

1

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.1 alpha chain CDR3 domain

(amino acid)

<400> 26

Cys Ala Leu Arg Ser Gly Gly Tyr Gln Lys Val Thr Phe

1 5 10

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.2b beta chain CDR1 domain

(amino acid)

<400> 27

Ser Gly Asp Leu Ser

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.2b beta chain CDR2 domain

(amino acid)

<400> 28

Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu

1 5

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.2b beta chain CDR3 domain

(amino acid)

<400> 29

Cys Ala Ser Ser Gln Gly Asp Glu Lys Leu Phe Phe

1 5 10

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.2b alpha chain CDR1 domain

(amino acid)

<400> 30

Asp Ser Ser Ser Thr Tyr

1 5
<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence 1388.2b alpha chain CDR2 domain
(amino acid)
<400> 31
Ile Phe Ser Asn Met Asp Met

1 5
<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence 1388.2b alpha chain CDR3 domain
(amino acid)
<400> 32
Cys Ala Glu Ser Ile Asp Ala Arg Leu Met Phe

1 5 10
<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence 1388.3 beta chain CDR1 domain
(amino acid)
<400> 33
Gly Thr Ser Asn Pro Asn

1 5
<210> 34
<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 beta chain CDR2 domain
(amino acid)

<400> 34

Ser Val Gly Ile Gly

1 5

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 beta chain CDR3 domain
(amino acid)

<400> 35

Cys Ala Leu Ser Thr Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 alpha chain CDR1 domain

(amino acid)

<400> 36

Thr Ser Glu Asn Asn Tyr Tyr

1 5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 alpha chain CDR2 domain
(amino acid)

<400> 37

Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn

1 5

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 alpha chain CDR3 domain
(amino acid)

<400> 38

Cys Ala Phe Met Lys Ser His Ser Gly Tyr Ile Phe

1 5 10

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.1b beta chain CDR1 domain
(amino acid)

<400> 39

Gly Thr Ser Asn Pro Asn

1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.1b beta chain CDR2 domain
(amino acid)

<400> 40

Ser Val Gly Ile Gly

1 5

<210> 41

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.1b beta chain CDR3
domain (amino acid)

<400> 41

Cys Ala Trp Ser Val Ala Val Asn Thr Glu Ala Phe Phe

1 5 10

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.1b alpha chain CDR1
domain (amino acid)

<400> 42

Thr Ser Glu Asn Asn Tyr Tyr

1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.1b alpha chain CDR2

domain (amino acid)

<400> 43

Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn

1 5

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.1b alpha chain CDR3

domain (amino acid)

<400> 44

Cys Ala Phe Gly Glu Gly Ala Arg Leu Met Phe

1 5 10

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.2 beta chain CDR1 domain

(amino acid)

<400> 45

Gly Thr Ser Asn Pro Asn

1 5

<210> 46

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.2 beta chain CDR2 domain

(amino acid)

<400> 46

Ser Ile Gly Ile Asp

1 5

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.2 beta chain CDR3 domain

(amino acid)

<400> 47

Cys Ala Trp Ser Val Thr Arg His Asn Glu Gln Phe Phe

1 5 10

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.2 alpha chain CDR1 domain

(amino acid)

<400> 48

Lys Thr Leu Tyr Gly

1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.2 alpha chain CDR2 domain

(amino acid)

<400> 49

Leu Gln Lys Gly Gly Glu Glu

1 5

<210> 50

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.2 alpha chain CDR3 domain

(amino acid)

<400> 50

Cys Gly Ala Ala Pro Thr Tyr Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Gln Gly Asn

1 5 10 15

Leu Ile Phe

<210> 51

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 18648.2 alpha chain CDR3 domain

(amino acid)

<400> 51

Cys Ala Leu Arg Gly Leu Asn Tyr Gly Gln Asn Phe Val Phe

1 5 10

<210> 52

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.1 beta chain variable

domain

<400> 52

atgggaatca ggctcctctg tcgtgtggcc tttgtttcc tggctgtagg cctcgtagat 60
 gtgaaagtaa cccagagctc gagatatcta gtcaaaagga cgggagagaa agttttctg 120
 gaatgtgtcc aggatatgga ccatgaaaat atgttctggt atcgacaaga cccaggtctg 180
 gggctacggc tgatctatct ccatatgat gttaaaatga aagaaaaagg agatattcct 240
 gaggggtaca gtgtctctag agagaagaag gagcgcttct ccctgattct ggagtccgcc 300

agcaccaacc agacatctat gtacctctgc gccagcaaca acagagacag ctacaacagc 360
 cccctccact ttgggaacgg gaccaggctc actgtgacg 399

<210> 53

<211> 531

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.1 beta chain constant

domain (Native NA)

<400> 53

gaggacctga acaaagtgtt cccccagag gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag 60
 atcagccaca cccagaaagc caccctcgtg tgctggcca ccggcttttt ccccgaccac 120
 gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa gaggtgcact ccggcgtgtg caccgatccc 180
 cagcctctga aagaacagcc cgccctgaac gacagccggt actgcctgtc cagcagactg 240
 agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc cggaaccact tcagatgcca ggtgcagttc 300

tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggacagag ccaagcccgt gacacagatc 360
 gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgcggcttta cctccgtgtc ctatcagcag 420
 ggcgtgctga gcccaccat cctgtacgag atcctgtctgg gcaaggccac actgtacgcc 480
 gtgctggtgt ctgccctggt gctgatggcc atggtcaagc ggaaggactt c 531

<210> 54

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.1 alpha chain variable

domain (Native NA)

<400> 54

atgaagccca cccatctctc agtgetttgtg ataatatitaa tactcagagg aacaagagcc 60
 cagagagtga ctacgccga gaagctctc tctgtcttta aaggggcccc agtggagctg 120
 aagtgcaact attcctattc tgggagtcct gaactcttct ggtatgtcca gtactccaga 180
 caacgcctcc agttactctt gagacacatc tctagagaga gcatcaaagg cttcactgct 240
 gaccttaaca aaggcgagac atctttccac ctgaagaaac catttgctca agaggaagac 300

tcagccatgt attactgcgc cctgagaagc ggcggctacc agaaggtgac ctttgaact 360
ggaacaaagc tccaagtcac ccca 384
<210> 55
<211> 426
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic sequence 1388.1 alpha chain constant
domain (Native NA)
<400> 55
gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag 60
tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaatg tgtcacaag taaggattct 120
gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac 180
agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc 240
attattccag aagacacctt cttcccagc ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc 300
gagaaaagct ttgaaacaga tacgaaccta aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc 360

cgaatcctcc tectgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgtgcg gctgtgtgtec 420
agctga 426
<210> 56
<211> 399
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence 1388.1 beta chain variable
domain (Codon-optimized NA)
<400> 56
atgggaatta gactgctgtg ccgggtggcc ttctgcttcc tggtctgtgg actggtggac 60
gtgaaagtga cccagagcag cagatactc gtgaagcggc ccggcgagaa ggtgttctg 120
gaatgcgtgc aggacatgga ccacgagaat atgttctggt acagacagga ccccgctg 180

ggcctcgggc tgatctactt cagctacgac gtgaagatga aggaaaagg cgacatcccc 240
gagggctaca gcgtgtccag agagaagaaa gagcggttca gcctgatcct ggaaagcgcc 300
agcaccaacc agaccagcat gtacctgtgc gcctccaaca accgggacag ctacaacagc 360

cccctgact tcggcaacgg caccagactg accgtgacc 399

<210> 57

<211> 531

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.1 beta chain constant
domain (Codon-optimized NA)

<400> 57

gaggacctga acaaagtgtt cccccagag gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag 60

atcagccaca cccagaaagc caccctcgtg tgcttgcca cggcttttt ccccgaccac 120

gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa gaggtgact cggcgtgtg caccgatccc 180

cagcctctga aagaacagcc cgccctgaac gacagccggt actgcctgtc cagcagactg 240

agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc cggaaccact tcagatgcca ggtgcagttc 300

tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggacagag ccaagcccgt gacacagatc 360

gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgcggcttta cctccgtgtc ctatcagcag 420

ggcgtgctga gcgccacct cctgtacgag atcctgctgg gcaaggccac actgtacgcc 480

gtgctggtgt ctgccctggt gctgatggcc atggtcaagc ggaaggactt c 531

<210> 58

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.2b alpha chain variable
domain (Native NA)

<400> 58

atgaagacat ttgctggatt ttcttctctg tttttgtggc tgcagctgga ctgtatgagt 60

agaggagagg atgtggagca gagtcttttc ctgagtgtcc gagagggaga cagctccggt 120

ataaactgca cttacacaga cagctcctcc acctacttat actggtataa gcaagaacct 180

ggagcaggtc tccagttgct gacgtatatt ttttcaaata tggacatgaa acaagaccaa 240

agactcactg ttctattgaa taaaaggat aaacatctgt ctctgcgcat tgcagacacc 300

cagactgggg actcagctat ctacttctgt gcagagagta tcgatgccag actcatgttt 360
 ggagatggaa ctcagctggt ggtgaagccc 390

<210> 59
 <211> 426
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence 1388.1 alpha chain constant
 domain (Codon-optimized NA)

<400> 59
 gacatccaga accccgacct tgcagtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag 60
 agcgtgtgcc tgttcaccga cttcgacagc cagaccaacg tgtcccagag caaggacagc 120

gacgtgtaca tcaccgataa gtgcgtgctg gacatgcgga gcatggactt caagagcaac 180
 agcgcctggg cctgggtcaa caagagcgcac ttcgcctgcg ccaacgcctt caacaacagc 240
 attatccccg aggacacatt cttccaagc cccgagagca gctgacgct gaagctggtg 300
 gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg aacttcaga acctcagcgt gatcggttc 360
 cggatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc aacctgctga tgaccctgcg gctgtgttcc 420
 agctga 426

<210> 60
 <211> 390
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence 1388.2b beta chain variable
 domain (Native NA)

<400> 60
 atgggcttca ggetcctctg ctgtgtggcc ttttgtctcc tgggagcagg cccagtggat 60
 tctggagtca cacaacccc aaagcacctg atcacagcaa ctggacagcg agtgacgctg 120
 agatgctccc ctaggtctgg agacctctct gtgtactggt accaacagag cctggaccag 180
 ggctccagct tectcattca gtattataat ggagaagaga gagcaaaagg aacattctt 240
 gaacgattct ccgcacaaca gttcctgac ttgcactctg aactaacct gagctctctg 300

gagctggggg acfcagcttt gtatttctgt gccagcagcc aggggatga aaaactgttt 360

tttggcagtg gaaccagct ctctgtcttg 390

<210> 61

<211> 531

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.2b beta chain constant domain (Native NA)

<400> 61

gaggacctga acaaagtgtt cccccagag gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag 60

atcagccaca cccagaaagc caccctcgtg tgcttgcca ccgcttttt ccccgaccac 120

gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa gaggtgcact ccggcgtgtg caccgatccc 180

cagcctctga aagaacagcc cgccctgaac gacagccggt actgctgtc cagcagactg 240

agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc cggaaccact tcagatgcca ggtgcagttc 300

tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggacagag ccaagcccggt gacacagatc 360

gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgcggcttta cctcctgttc ctatcagcag 420

ggcgtgctga gcgccacat cctgtacgag atcctgctgg gcaaggccac actgtacgcc 480

gtgctggtgt ctgccctggt gctgatggcc atggtcaagc ggaaggactt c 531

<210> 62

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.2b alpha chain variable domain (Native NA)

<400> 62

atgaagacat ttgctggatt ttcgttcttg tttttgtggc tgcagctgga ctgtatgagt 60

agaggagagg atgtggagca gagtcttttc ctgagtgtcc gagagggaga cagctccggt 120

ataaactgca cttacacaga cagctcctcc acctacttat actggtataa gcaagaacct 180

ggagcaggtc tccagttgct gacgtatatt ttttcaaata tggacatgaa acaagaccaa 240

agactcactg ttctattgaa taaaaggat aaacatctgt ctctgcgat tgcagacacc 300

cagactgggg actcagctat ctacttctgt gcagagagta tcgatgccag actcatgttt 360
 ggagatggaa ctcagctggt ggtgaagccc 390

<210> 63

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.2b alpha chain constant
 domain (Native NA)

<400> 63

gatatccaga accctgacct tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag 60
 tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaatg tgtcacaag taaggattct 120
 gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac 180
 agtgtctgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc 240
 attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc 300

gagaaaagct ttgaaacaga tacgaacct aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc 360
 cgaatcctcc tectgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgctgcg gctgtggtec 420
 agctga 426

<210> 64

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.2b beta chain variable
 domain(Codon-optimized NA)

<400> 64

atgggcttca gactgctgtg ctgctggcc ttctgtctgc tgggagccgg cctgtggat 60
 agcggcgtga cacagacacc caagcacctg atcaccgcca ccggccagcg cgtgacactg 120

 agatgtagcc ctagaagcgg cgacctgagc gtgtactggt atcagcagag cctggaccag 180
 ggctgtcagt tctgatcca gtaactaac ggcgaggaac gggccaaggg caacatcctg 240
 gaacggttca gcgcccagca gttccccgat ctgcacagcg agctgaacct gagcagcctg 300
 gaactgggag acagcgcctt gtacttctgt gccagttctc agggcgacga gaagctgttc 360

ttcggcagcg gcacacagct gagcgtgctg 390

<210> 65

<211> 531

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.2b beta chain constant domain (Codon-optimized NA)

<400> 65

gaagatctga acaaggtgtt cccccagag gtggccgtgt tgcagccttc tgaggccgag 60

atcagccaca cccagaaagc caccctcgtg tgccctggcca ccggcttttt ccccgaccac 120

gtggaactgt cttgggtggg caacggcaaa gaggtgcact ccggcgtgtg caccgatccc 180

cagcctctga aagaacagcc cgccctgaac gacagccggt actgcctgtc cagcagactg 240

agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc cggaaccact tcagatgcca ggtgcagttc 300

tacggcctga gcgagaacga cgagtgacc caggacagag ccaagcccgt gaccagatc 360

gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgcggcttta ccagcgtgtc ctatcagcag 420

ggcgtgctga ggcaccat cctgtacgag atcctgtctgg gcaagccac cctgtacgcc 480

gtgctggtgt ctgccctggt gctgatggcc atggtcaagc ggaaggactt c 531

<210> 66

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.2b alpha chain variable domain (Codon-optimized NA)

<400> 66

atgaagacct tcgccggtt cagcttctg ttctgtggc tgcagctgga ctgcatgagc 60

agaggcgagg acgtggaaca gagcctgttt ctgtccgtgc gcgagggcga ctccagcgtg 120

atcaattgca cctacaccga cagcagcagc acctacctgt attggtacaa gcaggaacce 180

ggcgtggcc tgcagctgct gacctacatc ttcagcaaca tggacatgaa gcaggaccag 240

cggtgaccg tgctgctgaa caagaaggat aagcacctgt ccctgcggat ccccgatacc 300

cagacaggcg actccgcat ctacttttgc gccgagagca tcgacgcccg gctgatgttt 360

ggagatggca cccagctggt cgtgaagccc 390

<210> 67

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.2b alpha chain constant
domain (Codon-optimized NA)

<400> 67

gacatccaga accccgacct tgcagtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag 60

agcgtgtgcc tgttaccga cttcgacagc cagaccaacg tgtcccagag caaggacagc 120

gacgtgtaca tcaccgataa gtgcgtgctg gacatgcgga gcatggactt caagagcaac 180

agcgcctgg cctggtccaa caagagcgcac ttcgcctgcg ccaacgcctt caacaacagc 240

attatccccg aggacacatt cttcccaagc cccgagagca gctgcgacgt gaagctggtg 300

gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg aacttcaga acctcagcgt gatcggcttc 360

cggatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc aacctgctga tgaccctgcg gctgtggtcc 420

agctga 426

<210> 68

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 beta chain variable
domain (Native NA)

<400> 68

atgctctgct ctctccttgc cttctcctg ggcactttct ttggggtcag atctcagact 60

attcatcaat ggccagcgcac cctggtgcag cctgtgggca gcccgtctc tctggagtgc 120

actgtggagg gaacatcaaa cccaacctt tactggtacc gacaggctgc aggcaggggc 180

ctccagctgc tcttctactc cgttggtatt ggccagatca gctctgaggt gccccagaat 240

ctctcagcct ccagacccca ggaccggcag ttcacacctga gttctaagaa gctccttctc 300

agtgactctg gcttctatct ctgcgccctg agcaccagct acgagcagta cttcgggccg 360

ggcaccaggc tcacggtcac a 381

<210> 69

<211> 537

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 beta chain constant domain (Native NA)

<400> 69

```

gacctgaaaa acgtgttccc acccgaggtc gctgtgtttg agccatcaga agcagagatc    60
tcccacacc aaaaggccac actggtgtgc ctggccacag gcttctacc cgaccacgtg    120
gagctgagct ggtgggtgaa tgggaaggag gtgcacagtg gggtctgcac agaccgcag    180

ccctcaagg agcagcccgc cctcaatgac tccagatact gcctgagcag cgcctgagg    240
gtctcggcca cttctggca gaacccccgc aaccacttcc gctgtcaagt ccagtctac    300
gggctctcgg agaatgacga gtggaccacag gatagggccca aacctgtcac ccagatcgtc    360
agcgcagagg cctggggtag agcagactgt ggcttcacct ccgagtctta ccagcaaggg    420
gtcctgtctg ccaccatcct ctatgagatc ttgctagga aggccacctt gtatgccgtg    480
ctggtcagtg cctcgtgct gatggccatg gtcaagagaa aggattccag aggctag    537

```

<210> 70

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 alpha chain variable domain (Native NA)

<400> 70

```

atgacacgag ttagcttgct gtgggcagtc gtggtctcca cctgtcttga atccggcatg    60
gcccagacag tactcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gactgtgacc    120
ctgagttgca catatgacac cagtgagaat aattattatt tgttctggta caagcagcct    180
cccagcaggc agatgattct cgttattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaacg    240
gagaatcgtt tctctgtgaa cttccagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca    300
gactcacage tgggggacac tgcgatgtat tctctgtcct tcatgaagtc cactccgga    360

tacatctttg gaacaggcac caggctgaag gttttagca    399

```

<210> 71

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 alpha chain constant domain (Native NA)

<400> 71

```

gatattccaga accctgacct tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag      60
tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaatg tgtcacaag taaggattct      120
gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac      180
agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc      240

attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagt cctgtgatgt caagctggtc      300
gagaaaagct ttgaaacaga tacgaaccta aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc      360
cgaatcctcc tctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgtgcg gctgtggtcc      420
agctga                                             426
    
```

<210> 72

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 beta chain variable domain(Codon-optimized NA)

<400> 72

```

atgtgtgttt ctctgtggc cctgtgtctg ggcaccttct ttggagtgcg gagccagacc      60

atccaccagt ggctgtctac actggtgcag cctgtgggca gccctctgag cctggaatgt      120
accgtggaag gcaccagcaa cccaacctg tacttgtaca gacaggccgc tggcagaggc      180
ctgcagctgc tgttttacag cgtgggcac gcccagatca gcagcgaggt gccccagaat      240
ctgagcgcca gcagaccca ggaccggcag tttatcctga gcagcaagaa gctgtgtctg      300
agcgacagcg gcttctacct gtgtgccctg agcaccagct acgagcagta cttcgccca      360
ggcaccagac tgaccgtgac c                                             381
    
```

<210> 73

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 beta chain constant domain (Codon-optimized NA)

<400> 73

gacctgaaga acgtgttccc cccagaggtg gccgtgttcg agccttctga ggccgagatc 60
 agccacaccc agaaagccac cctcgtgtgt ctggccaccg gcttttaccg cgaccacgtg 120
 gaactgtcctt ggtgggtcaa cggcaaagag gtgcactccg gcgtgtgcac cgatccccag 180
 cctctgaaag aacagcccgc cctgaacgac agccggtact gcctgtccag cagactgaga 240
 gtgtccgcca ctttctggca gaacccccgg aaccacttca gatgccaggt gcagtcttac 300
 ggccctgagcg agaacgacga gtggacccag gacagagcca agcccgtgac ccagatcgtg 360

tctgccgaag cctggggcag agccgattgc ggctttacca gcgagagcta ccagcagggc 420
 gtgctgtctg ccaccatcct gtacgagatc ctgctgggaa aggccaccct gtacgccgtg 480
 ctggtgtctg ccctggtgct gatggccatg gtcaagcgga aggacagcag aggc 534

<210> 74

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 alpha chain variable domain (Codon-optimized NA)

<400> 74

atgaccggg tgtcactgct gtgggctgtg gtggtgtcca cctgtctgga aagcggcatg 60
 gccagaccg tgacacagtc ccagcctgag atgagcgtgc aggaagccga gacagtgacc 120
 ctgagctgca cctacgacac ctccgagaac aactactacc tgttttgta caagcagccc 180
 cccagccggc agatgatcct cgtgatcaga caggaagcct ataagcagca gaagccacc 240
 gagaacagat tcagcgtgaa cttccagaag gccccaaga gctttagcct gaagatcagc 300
 gacagccagc tgggcgacac cgccatgtac ttttgcgct ttatgaagtc ccacagcggc 360
 tacatcttcg gcaccggcac acggetgaaa gtgctggct 399

<210> 75

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 alpha chain constant domain (Codon-optimized NA)

<400> 75

```

gacatccaga accccgacct tgcagtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag      60
agcgtgtgcc tgttcaccga cttcgacagc cagaccaacg tgtcccagag caaggacagc     120
gacgtgtaca tcaccgataa gtgcgtgctg gacatgcgga gcatggactt caagagcaac     180
agcgccgtgg cctggtccaa caagagcgac ttcgcctgcg ccaacgcctt caacaacagc     240
attatccccg aggacacatt cttccaagc cccgagagca gctgcgacgt gaagctggtg     300
gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg aacttcaga acctcagcgt gatcggcttc     360
cggatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc aacctgctga tgaccctgcg gctgtggtcc     420

```

agctga 426

<210> 76

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.1b beta chain variable domain (Native NA)

<400> 76

```

atgctctgct ctctccttgc ctttctctg ggcactttct ttggggtcag atctcagact      60
attatcaat ggccagcgac cctggtgcag cctgtgggca gcccgtctc tctggagtgc     120
actgtggagg gaacatcaaa cccaacctt tactggtacc gacaggctgc aggcaggggc     180
ctccagctgc tcttctactc cgttggtatt ggccagatca gctctgaggt gccccagaat     240

ctctcagcct ccagaccca ggaccggcag ttcactctga gttctaagaa gctccttctc     300
agtgactctg gcttctatct ctgtgcctgg agtggttcgg tgaacctga agctttcttt     360
ggacaaggca ccagactcac agttgta                                     387

```

<210> 77

<211> 531

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.1b beta chain constant domain (Native NA)

<400> 77

```

gaggacctga acaaagtgtt cccccagag gtggccgtgt tgcagccttc tgaggccgag      60
atcagccaca ccagaaaagc caccctcgtg tgcttgcca ccggcttttt ccccgaccac      120

gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa gaggtgcact ccggcgtgtg caccgatccc      180
cagcctctga aagaacagcc cgccctgaac gacagccggt actgcctgtc cagcagactg      240
agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc cgaaccact tcagatgcca ggtgcagttc      300
tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggacagag ccaagcccgt gacacagatc      360
gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgcggcttta cctcctgttc ctatcagcag      420
ggcgtgctga gcgccacat cctgtacgag atcctgtctg gcaagccac actgtacgcc      480
gtgctggtgt ctgccttggg gctgatggcc atggtcaagc ggaaggactt c              531
    
```

<210> 78

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.1b alpha chain variable domain (Native NA)

<400> 78

```

atgacacgag ttagcttgct gtgggcagtc gtggtctcca cctgtcttga atccggcatg      60
gcccagacag tactcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gactgtgacc      120
ctgagttgca catatgacac cagtgagaat aattattatt tgttctggta caagcagcct      180
cccagcaggc agatgattct cgttattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaacg      240
gagaatcgtt tctctgtgaa cttccagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca      300

gactcacagc tgggggacac tgcgatgtat ttctgcccct tcggcgaggg cgccagactc      360
atgtttggag atggaactca gctggtggtg aagccc                                396
    
```

<210> 79

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.1b alpha chain constant domain (Native NA)

<400> 79

gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag 60
 tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaatg tgtcacaag taaggattct 120
 gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac 180

agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc 240
 attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagt cctgtgatgt caagctggtc 300
 gagaaaagct ttgaaacaga tacgaacct aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc 360
 cgaatcctcc tctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgctgcg gctgtggtcc 420
 agctga 426

<210> 80

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.1b beta chain variable domain (Codon-optimized NA)

<400> 80

atgctgtgtt ctctgtggc cctgctgctg ggcaccttct ttggagtgcg gagccagacc 60
 atccaccagt ggctgctac actggtgcag cctgtgggca gccctctgag cctggaatgt 120
 accgtggaag gcaccagcaa cccaacctg tactggtaca gacaggccgc tggcagaggc 180
 ctgcagctgc tgttttacag cgtgggcac ggccagatca gcagcgaggt gccccagaat 240
 ctgagcgcca gcagaccca ggaccggcag tttatcctga gcagcaagaa gctgctgctg 300
 agcgacagcg gcttctacct gtgcgcttgg agcgtggccg tgaacaccga ggcattcttt 360
 gggcagggca cccggctgac cgtggtg 387

<210> 81

<211> 531

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.1b beta chain constant domain (Codon-optimized NA)

<400> 81

```

gaagatctga acaaggtgtt cccccagag gtggcctgt tgcagccttc tgaggccgag      60
atcagccaca ccagaaaagc caccctcgtg tgccctggcca ccggttttt ccccgaccac      120
gtggaactgt ctgggtgggt caacggcaaa gaggtgcact ccggcgtgtg caccgatccc      180
cagcctctga aagaacagcc cgccctgaac gacagccggt actgcctgtc cagcagactg      240
agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc cggaaccact tcagatgcca ggtgcagttc      300

tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggacagag ccaagcccgt gaccagatc      360
gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgcggcttta ccagcgtgtc ctatcagcag      420
ggcgtgctgt ctgccacat cctgtacgag atcctgctgg gaaaggccac cctgtacgcc      480
gtgctggtgt ctgccctggt gctgatggcc atggtcaagc ggaaggactt c          531

```

<210> 82

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.1b alpha chain variable domain (Codon-optimized NA)

<400> 82

```

atgaccagag tgtctctgct gtgggctgtg gtggtgtcca cctgtctgga aagcggcatg      60

gccagaccg tgacacagtc ccagcctgag atgagcgtgc aggaagccga gacagtgacc      120
ctgagctgca cctacgacac cagcagaaac aactactacc tgttttgta caagcagccc      180
cccagccggc agatgatcct cgtgatcaga caggaagcct ataagcagca gaacccacc      240
gagaacagat tcagcgtgaa cttccagaag gccccaaga gcttcagcct gaagatcagc      300
gacagccagc tgggcgacac cgccatgtac ttttgcgct ttggcgaggg cgccagactg      360
atgtttggcg acggaacca gctggtcgtg aagccc          396

```

<210> 83

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.1b alpha chain constant domain (Codon-optimized NA)

<400> 83

```

gacatccaga accccgaccc tgcagtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag      60
agcgtgtgcc tgttcaccga cttcgacagc cagaccaacg tgtcccagag caaggacagc     120
gacgtgtaca tcaccgataa gtgcgtgctg gacatgcgga gcatggactt caagagcaac     180
agcgcctgtg cctggtccaa caagagcgcac ttcgcctgcg ccaacgcctt caacaacagc     240
attatccccg aggacacatt cttccaagc cccgagagca gctgcgacgt gaagctggtg     300
gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg aacttcaga acctcagcgt gatcggcttc     360

cggatcctgc tgetgaaggt ggccggcttc aacctgetga tgaccctgcg gctgtggtcc     420
agctga                                             426

```

<210> 84

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.2 beta chain variable domain (Native NA)

<400> 84

```

atgctctgct ctctccttgc ctttctcttg ggcacittct ttggggtcag atctcagact      60
attcatcaat ggccagcgcac cctggtgcag cctgtgggca gcccgtctc tctggagtgc     120
actgtggagg gaacatcaaa cccaacctc tactggtacc gacaggctgc aggcaggggc     180

ctccagctgc ttttctactc cattggtatt gaccagatca gctctgaggt gccccagaat     240
ctctcagcct ccagacccca ggaccggcag ttattctga gttctaagaa getcctctc     300
agtgactctg gcttctatct ctgtgcctgg agtgaacca ggcacaatga gcagttcttc     360
gggccagggc cacggctcac cgtgcta                                             387

```

<210> 85

<211> 537

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.2 beta chain constant

domain (Native NA)

<400> 85

gacctgaaaa acgtgttccc acccgaggtc gctgtgtttg agccatcaga agcagagatc 60
 tcccacacc aaaaggccac actggtgtgc ctggccacag gcttctacc cgaccacgtg 120
 gagctgagct ggtgggtgaa tgggaaggag gtgcacagtg gggctgcac agaccgcag 180
 cccctcaagg agcagcccgc cctcaatgac tccagatact gcctgagcag cgcctgagg 240
 gtctcggcca cttctggca gaacccccgc aaccacttcc gctgtcaagt ccagtctac 300
 gggctctcgg agaatgacga gtggaccacag gatagggcca aacctgtcac ccagatcgtc 360
 agcgcagagg cctggggtag agcagactgt ggcttcacct ccgagtctta ccagcaaggg 420
 gtctgtctg ccaccatcct ctatgagatc ttgctagga aggccacctt gtatgccgtg 480

ctggtcagtg cctcgtgct gatggccatg gtcaagagaa aggattccag aggctag 537

<210> 86

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.2 alpha chain variable

domain (Native NA)

<400> 86

atgctgtgca gcctgctggc cctgctgctg ggcaccttct tcgagcccag aaccagccaa 60
 gaactggagc agagtctca gtccttgatc gtccaagagg gaaagaatct caccataaac 120
 tgcacgtcat caaagacgtt atatggctta tactggtata agcaaaagta tggatgaaggt 180
 cttatcttct tgatgatgct acagaaaggt ggggaagaga aaagtcatga aaagataact 240
 gccaagtgg atgagaaaa gcagcaaagt tcctgcata tcacagcctc ccagcccagc 300
 catgcaggca tctacctctg tggagcagcc cctacatact cgaattatgg aggaagccaa 360
 ggaaatctca tctttgaaa aggactaaa ctctctgtta aacca 405

<210> 87

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.2 alpha chain constant

domain (Native NA)

<400> 87

gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag 60
tctgtctgcc tattcaccca ttttgattct caaacaatg tgtcacaag taaggattct 120

gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac 180
agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc 240
attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagt cctgtgatgt caagctggtc 300
gagaaaagct ttgaaacaga tacgaacct aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc 360
cgaatcctcc tctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgtgcg gctgtgttcc 420
agctga 426

<210> 88

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.2 beta chain variable

domain(Codon-optimized NA)

<400> 88

atgctgtgtt ctctgctggc tctgctgctg ggcaccttct ttggagtgcg gagccagacc 60
atccaccagt ggctgctac actggtgcag cctgtgggca gccctctgag cctggaatgt 120
accgtggaag gcaccagcaa cccaacctg tactggtaca gacaggccgc tggcagaggc 180
ctgcagctgc tgttttacag catcggcatc gaccagatca gcagcgaggt gccccagaac 240
ctgagcgcca gcagaccca ggaccggcag tttatcctga gcagcaagaa gctgctgctg 300
agcgacagcg gcttctacct gtgcgcttgg agcgtgacct ggcacaacga gcagttcttt 360

ggccctggca cccggtgac cgtgctg 387

<210> 89

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.2 beta chain constant

domain (Codon-optimized NA)

<400> 89

gacctgaaga acgtgttccc cccagagggtg gccgtgttcg agccttctga ggccgagatc 60
 agccacaccc agaagccac cctcgtgtgt ctggccaccg gcttttaccg cgaccacgtg 120
 gaactgtctt ggigggtcaa cggcaaagag gtgcactccg gcgtgtgcac cgatccccag 180
 cctctgaaag aacagcccgc cctgaacgac agccggtact gcctgtccag cagactgaga 240

gtgtccgcca ctttctggca gaacccccgg aaccacttca gatgccaggt gcagttctac 300
 ggcttgagcg agaacgacga gtggaccag gacagagcca agcccgtgac ccagatcgtg 360
 tctgccgaag cctggggcag agccgattgc ggctttacca gcgagagcta ccagcagggc 420
 gtgctgtctg ccaccatcct gtacgagatc ctgctgggaa aggccaccct gtacgccgtg 480
 ctggtgtctg ccctggtgct gatggccatg gtcaagcgga aggacagcag aggc 534

<210> 90

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.2 alpha chain variable domain (Codon-optimized NA)

<400> 90

atgctgtgca gcctgctggc cctgctgctg ggaacatfff tcgagccccg gaccagccag 60
 gaactggaac agagcccaca gagcctgatc gtgcaggaag gcaagaacct gaccatcaac 120
 tgcaccagct ccaagacact gtacggcctg tatttgtata agcagaagta cggcgagggc 180
 ctgatcttcc tgatgatgct gcagaagggc ggcgaggaaa agagccacga gaagatcacc 240
 gccaaagtgg acgagaagaa gcagcagtcc agcctgcaca tcaccgcctc ccagccttct 300
 cacgccggca tctatctgtg tggcgccgct ccacactaca gcaactatgg cggcagccag 360
 ggcaatctga tcttcggcaa gggcaccaag ctgagcgtga agccc 405

<210> 91

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17804.2 alpha chain constant domain (Codon-optimized NA)

<400> 91
gacatccaga accccgaccc tgcagtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag 60
agcgtgtgcc tgttaccga cttcgacagc cagaccaacg tgtcccagag caaggacagc 120
gacgtgtaca tcaccgataa gtgcgtgctg gacatgcgga gcatggactt caagagcaac 180
agcgcctgg cctggtccaa caagagcgac ttcgcctgcg ccaacgcctt caacaacagc 240
attatccccg aggacacatt ctteccaage cccgagagca gctgcgacgt gaagctggtg 300

gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg aacttcaga acctcagcgt gatcggcttc 360
cggatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc aacctgctga tgacctgcg gctgtggtcc 420
agctga 426

<210> 92
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic sequence 1388.1 beta chain CDR1 domain
(Codon-optimized NA)

<400> 92
atggaccacg agaat 15

<210> 93
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic sequence 1388.1 beta chain CDR2 domain
(Codon-optimized NA)

<400> 93
agctacgacg tgaagatg 18

<210> 94
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic sequence 1388.1 beta chain CDR3 domain

(Codon-optimized NA)

<400> 94

tgcgcctcca acaaccggga cagctacaac agccccctgc acttc 45

<210> 95

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.1 alpha chain CDR1 domain

(Codon-optimized NA)

<400> 95

tacagcggca gccccgag 18

<210> 96

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.1 alpha chain CDR2 domain

(Codon-optimized NA)

<400> 96

cacatcagca ga 12

<210> 97

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.1 alpha chain CDR3 domain

(Codon-optimized NA)

<400> 97

tgcgccctga gatccggcgg ctaccagaaa gtgacattt 39

<210> 98

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence 1388.2b beta chain CDR1 domain
 (Codon-optimized NA)
 <400> 98
 agcggcgacc tgagc 15
 <210> 99
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic sequence 1388.2b beta chain CDR2 domain
 (Codon-optimized NA)
 <400> 99
 tactacaacg gcgaggaa 18
 <210> 100
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence 1388.2b beta chain CDR3 domain
 (Codon-optimized NA)
 <400> 100
 tactacaacg gcgaggaa 18
 <210> 101
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence 1388.2b alpha chain CDR1
 domain (Codon-optimized NA)
 <400> 101
 gacagcagca gcacctac 18

<210> 102

<211>

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.2b alpha chain CDR2
domain (Codon-optimized NA)

<400> 102

atcttcagca acatggacat g 21

<210> 103

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.2b alpha chain CDR3
domain (Codon-optimized NA)

<400> 103

tgcgccgaga gcatcgacgc cgggtgatg ttt 33

<210> 104

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 beta chain CDR1 domain
(Codon-optimized NA)

<400> 104

ggcaccagca accccaac 18

<210> 105

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 1388.3 beta chain CDR2 domain

(Codon-optimized NA)

<400> 105
 agcgtgggca tcggc 15

<210> 106
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic sequence 1388.3 beta chain CDR3 domain
 (Codon-optimized NA)

<400> 106
 tgtgccctga gcaccagcta cgagcagtac ttc 33

<210> 107
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic sequence 1388.3 alpha chain CDR1 domain
 (Codon-optimized NA)

<400> 107
 acctccgaga acaactacta c 21

<210> 108
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic sequence 1388.3 alpha chain CDR2 domain

(Codon-optimized NA)

<400> 108
 caggaagcct ataagcagca gaac 24

<210> 109
 <211> 39
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence 1388.3 alpha chain CDR3 domain
 (Codon-optimized NA)
 <400> 109
 tgcgcccttta tgaagtccca cagcggctac atcttcggc 39
 <210> 110
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence 17084.1b beta chain CDR1 domain
 (Codon-optimized NA)

 <400> 110
 ggcaccagca accccaac 18
 <210> 111
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence 17084.1b beta chain CDR2 domain
 (Codon-optimized NA)
 <400> 111
 agcgtgggca tcggc 15
 <210> 112
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence 17084.1b beta chain CDR3 domain
 (Codon-optimized NA)
 <400> 112

tgcgcttgga gcgtggccgt gaacaccgag gcattcttt 39
 <210> 113
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence 17084.1b alpha chain CDR1
 domain (Codon-optimized NA)
 <400> 113
 accagcgaga acaactacta c 21
 <210> 114
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence 17084.1b alpha chain CDR2
 domain (Codon-optimized NA)
 <400> 114
 caggaagcct ataagcagca gaac 24
 <210> 115
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence 17084.1b alpha chain CDR3
 domain (Codon-optimized NA)
 <400> 115
 tgccctttg gcgagggcgc cagactgatg ttt 33
 <210> 116
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence 17084.2 beta chain CDR1 domain

(Codon-optimized NA)

<400> 116
ggcaccagca accccaac 18

<210> 117

<211>

15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17084.2 beta chain CDR2 domain
(Codon-optimized NA)

<400> 117
agcatcggca tcgac 15

<210> 118

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17084.2 beta chain CDR3 domain
(Codon-optimized NA)

<400> 118
tgcgcttggg gcgtgacccg gcacaacgag cagttcttt 39

<210> 119

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17084.2 alpha chain CDR1
domain (Codon-optimized NA)

<400> 119
aagacactgt acggc 15

<210> 120

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17084.2 alpha chain CDR2
domain (Codon-optimized NA)

<400> 120

ctgcagaagg gcggcgagga a

21

<210> 121

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence 17084.2 alpha chain CDR3
domain (Codon-optimized NA)

<400> 121

tgtggcgccg ctcccaccta cagcaactat ggcgccagcc agggcaatct gatcttc

57

<210> 122

<211> 309

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence Human MAGE-A1 (amino acid)

<400> 122

Met Ser Leu Glu Gln Arg Ser Leu His Cys Lys Pro Glu Glu Ala Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Ser Ser Pro Leu Val Leu Gly Thr Leu Glu Glu Val Pro Thr

35 40 45

Ala Gly Ser Thr Asp Pro Pro Gln Ser Pro Gln Gly Ala Ser Ala Phe

50 55 60

Pro Thr Thr Ile Asn Phe Thr Arg Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gly Ser

65 70 75 80

Ser Ser Arg Glu Glu Glu Gly Pro Ser Thr Ser Cys Ile Leu Glu Ser
 85 90 95

Leu Phe Arg Ala Val Ile Thr Lys Lys Val Ala Asp Leu Val Gly Phe
 100 105 110

Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met
 115 120 125

Leu Glu Ser Val Ile Lys Asn Tyr Lys His Cys Phe Pro Glu Ile Phe
 130 135 140

Gly Lys Ala Ser Glu Ser Leu Gln Leu Val Phe Gly Ile Asp Val Lys
 145 150 155 160

Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr Val Leu Val Thr Cys Leu Gly
 165 170 175

Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly Asp Asn Gln Ile Met Pro Lys Thr
 180 185 190

Gly Phe Leu Ile Ile Val Leu Val Met Ile Ala Met Glu Gly Gly His
 195 200 205

Ala Pro Glu Glu Glu Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Met Glu Val Tyr
 210 215 220

Asp Gly Arg Glu His Ser Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr
 225 230 235 240

Gln Asp Leu Val Gln Glu Lys Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Asp
 245 250 255

Ser Asp Pro Ala Arg Tyr Glu Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Ala
 260 265 270

Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu Glu Tyr Val Ile Lys Val Ser Ala
 275 280 285

Arg Val Arg Phe Phe Phe Pro Ser Leu Arg Glu Ala Ala Leu Arg Glu
 290 295 300

Glu Glu Glu Gly Val
 305

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence Human MAGE-A1 278-286

<400> 123

Lys Val Leu Glu Tyr Val Ile Lys Val

1 5

<210> 124

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence Porcine teschovirus-1 2A (P2A)

peptide

<400> 124

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 125

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence Foot-and-Mouth disease virus 2A

(F2A) peptide

<400> 125

Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala

1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

25

<210> 126

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence Equine rhinitis A virus (ERAV)

2A (E2A) peptide

<400> 126

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 127

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence Thosaasigna virus 2A (T2A)

peptide

<400> 127

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp

1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg

20

<210> 128

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence Porcine teschovirus-1 2A (P2A)

peptide (NA)

<400> 128

ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct 60

ggacct 66

<210> 129
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence Porcine teschovirus-1 2A (P2A)
 peptide (CO-NA)
 <400> 129
 ggttccggag ccacgaactt ctctctgtta aagcaagcag gagacgtgga agaaaacccc 60

 ggtccc 66
 <210> 130
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence Foot-and-Mouth disease virus 2A
 (F2A) peptide (NA)
 <400> 130
 ggaagcggag tgaacagac ttgaaat ttt gaccttctca agttggcggg agacgtggag 60
 tccaaccctg gacct 75
 <210> 131
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence Equine rhinitis A virus (ERAV)

 2A (E2A) peptide (NA)
 <400> 131
 ggaagcggac agtgactaa ttatgctctc ttgaaattgg ctggagatgt tgagagcaac 60
 cctggacct 69
 <210> 132
 <211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence Thoseaasigna virus 2A (T2A)
peptide (NA)

<400> 132

ggaagcggag agggcagagg aagtctgcta acatgcggtg acgtcgagga gaatcctgga 60

cct 63

<210> 133

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence Glycine-serine linker

<400> 133

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 134

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence Glycine-serine linker

<400> 134

Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Ser

<210> 135

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence sgRNA Forward Oligo:

TRAC_sgRNA_pLenti_F1

<400> 135

caccggagaa tcaaaatcgg tgaat 25

<210> 136

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence sgRNA Reverse Oligo:

TRAC_sgRNA_pLenti_R1

<400> 136

aaacattcac cgatTTTgat tctcc 25

<210> 137

<211> 24

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence sgRNA Forward Oligo:

PD1_sgRNA_F1

<400> 137

caccgcagtt gtgtgacacg gaag 24

<210> 138

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence sgRNA Reverse Oligo:

PD1_sgRNA_R1

<400> 138

aaaccttccg tgtcacacaa ctgc 24

<210> 139

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence sgRNA Forward Oligo:

CTLA4_sgRNA_F1

<400> 139

caccggcaaa ggtgagtgag acttt 25

<210> 140

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence sgRNA Reverse Oligo:

CTLA4_sgRNA_R1

<400> 140

aaacaaagtc tctctacct ttgcc 25

<210> 141

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence sgRNA Forward Oligo:

LAG3_sgRNA_F1

<400> 141

caccggtttc tgcagccgct ttggg 25

<210> 142

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence sgRNA Reverse Oligo:

LAG3_sgRNA_R2

<400> 142

aaaccccaaa gcggtgcag aaacc 25

<210> 143

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence CD8 co-receptor alpha chain

<400> 143

Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu

1 5 10 15

Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly

20 25 30

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

35 40 45

Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp

50 55 60

Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr

65 70 75 80

Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala

85 90 95

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu

100 105 110

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala

115 120 125

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg

130 135 140

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys

145 150 155 160

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu

165 170 175

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg

180 185 190

Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser Gly Asp Lys Pro Ser

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

Gln

225

<210> 147

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence CD8 co-receptor beta chain

isoform 4

<400> 147

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

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

Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro Thr Lys Lys Ser Thr
 115 120 125
 Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly
 130 135 140
 Pro Leu Cys Ser Pro Ile Thr Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Val Leu
 145 150 155 160
 Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Val Ala Ile His Leu Cys Cys Arg Arg
 165 170 175
 Arg Arg Ala Arg Leu Arg Phe Met Lys Gln Lys Phe Asn Ile Val Cys
 180 185 190

 Leu Lys Ile Ser Gly Phe Thr Thr Cys Cys Cys Phe Gln Ile Leu Gln
 195 200 205
 Ile Ser Arg Glu Tyr Gly Phe Gly Val Leu Leu Gln Lys Asp Ile Gly
 210 215 220
 Gln
 225
 <210> 148
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence CD8 co-receptor beta chain
 isoform 5
 <400> 148
 Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val
 1 5 10 15

 Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr
 20 25 30
 Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe
 35 40 45
 Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val
 50 55 60

