



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0004703
(43) 공개일자 2022년01월11일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 5/0783</i> (2010.01) <i>A61K 35/17</i> (2014.01)
 <i>A61P 35/00</i> (2006.01) <i>C07K 14/705</i> (2006.01)
 <i>C07K 14/725</i> (2006.01) <i>C07K 14/73</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 5/0636</i> (2013.01)
 <i>A61K 35/17</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7038746
 (22) 출원일자(국제) 2020년04월30일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2021년11월26일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2020/030818
 (87) 국제공개번호 WO 2020/223537
 국제공개일자 2020년11월05일
 (30) 우선권주장
 62/841,753 2019년05월01일 미국(US)
 62/841,748 2019년05월01일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 팩트 파마, 인크.
 미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 코
 포레이트 드라이브 2 세컨드 플로어</p> <p>(72) 발명자
 센니노, 바바라
 미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 코
 포레이트 드라이브 2 팩트 파마, 인크. 내
 자코비, 카일
 미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 코
 포레이트 드라이브 2 팩트 파마, 인크. 내
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 양영준, 이상남</p> |
|---|---|

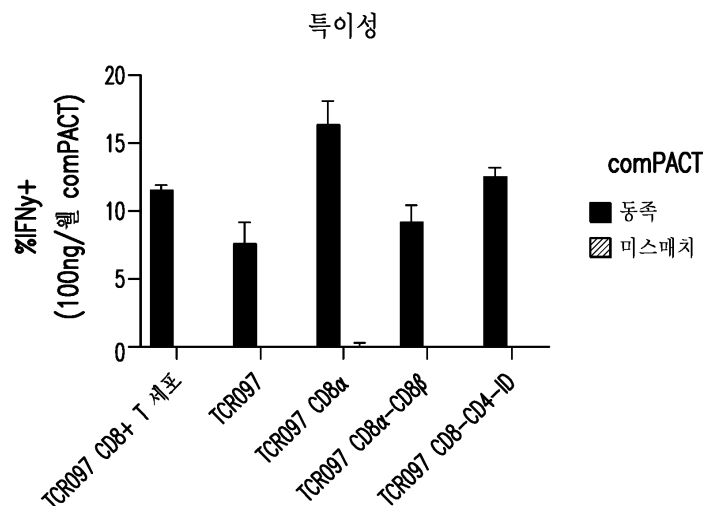
전체 청구항 수 : 총 130 항

(54) 발명의 명칭 CD8 조작된 T 세포 요법을 사용한 암의 치료를 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 CD8 발현 구축물로의 네오TCR 기반 세포 요법을 포함하는 조성물 및 이를 사용한 암의 치료 방법에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 외인성 T 세포 수용체 (TCR), 및 외인성 CD8을 포함하는 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 외인성 CD8은 적어도 1종의 단량체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 외인성 CD8의 적어도 1종의 단량체는 세포외 도메인, 막형단 도메인, 세포내 도메인, 그의 단편, 또는 이들의 조합을 포함한다.

대표도 - 도17b



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 14/70514 (2013.01)

C07K 14/70517 (2013.01)

C07K 2319/50 (2013.01)

C12N 2501/2307 (2013.01)

C12N 2501/2315 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

맨들-캐쉬맨, 스테파니

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 코
포레이트 드라이브 2 팩트 파마, 인크. 내

뒤브뢰유, 마이클, 엠.

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 코
포레이트 드라이브 2 팩트 파마, 인크. 내

가농, 존

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 코
포레이트 드라이브 2 팩트 파마, 인크. 내

프랜주소프, 알렉스

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 코
포레이트 드라이브 2 팩트 파마, 인크. 내

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 세포:

- a. 외인성 T 세포 수용체 (TCR); 및
- b. 외인성 CD8.

청구항 2

제1항에 있어서, 외인성 CD8이 적어도 1종의 단량체를 포함하는 것인 세포.

청구항 3

제2항에 있어서, 외인성 CD8의 적어도 1종의 단량체가 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 세포내 도메인, 그의 단편, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 세포.

청구항 4

제3항에 있어서, 세포외 도메인이 CD8 α 세포외 도메인 또는 CD8 β 세포외 도메인을 포함하는 것인 세포.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 막횡단 도메인이 CD8 α 막횡단 도메인 또는 CD8 β 막횡단 도메인을 포함하는 것인 세포.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인이 CD8 α 세포내 도메인 또는 CD8 β 세포내 도메인을 포함하는 것인 세포.

청구항 7

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인이 CD4 세포내 도메인을 포함하는 것인 세포.

청구항 8

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1종의 단량체가 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인을 포함하는 것인 세포.

청구항 9

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1종의 단량체가 CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인을 포함하는 것인 세포.

청구항 10

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1종의 단량체가 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인을 포함하는 것인 세포.

청구항 11

제2항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1종의 단량체가 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함하는 것인 세포.

청구항 12

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1종의 단량체가 신호 펩티드를 포함하는 것인 세포.

청구항 13

제12항에 있어서, 신호 펩티드가 CD8 신호 펩티드인 세포.

청구항 14

제3항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 도메인이 서열식별번호: 140, 또는 서열식별번호: 145에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 세포.

청구항 15

제3항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인이 서열식별번호: 141, 또는 서열식별번호: 146에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 세포.

청구항 16

제3항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인이 서열식별번호: 142, 서열식별번호: 147, 또는 서열식별번호: 148에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 세포.

청구항 17

제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 신호 펩티드가 서열식별번호: 139, 또는 서열식별번호: 144에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 세포.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 CD8이 2A 서열을 포함하는 것인 세포.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 CD8이 링커를 포함하는 것인 세포.

청구항 20

제19항에 있어서, 링커가 서열식별번호: 137에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 세포.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 CD8이 프로테아제 절단 부위를 포함하는 것인 세포.

청구항 22

제21항에 있어서, 프로테아제 절단 부위가 푸린 절단 부위인 세포.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 TCR이 환자 유래 TCR인 세포.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 TCR이 신호 서열, 제1 및 제2 2A 서열, 및 TCR 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인 세포.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 TCR이 암 항원을 인식하는 것인 세포.

청구항 26

제25항에 있어서, 암 항원이 신생항원인 세포.

청구항 27

제25항에 있어서, 암 항원이 환자 특이적 항원인 세포.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 1차 세포인 세포.

청구항 29

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 환자-유래 세포인 세포.

청구항 30

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 림프구인 세포.

청구항 31

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 T 세포인 세포.

청구항 32

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 어린 T 세포인 세포.

청구항 33

제32항에 있어서, 세포가 CD45RA+, CD62L+, CD28+, CD95-, CCR7+, 및 CD27+인 세포.

청구항 34

제32항에 있어서, 세포가 CD45RA+, CD62L+, CD28+, CD95+, CD27+, CCR7+인 세포.

청구항 35

제32항에 있어서, 세포가 CD45RO+, CD62L+, CD28+, CD95+, CCR7+, CD27+, CD127+인 세포.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 존속을 증진시키고/거나 기억 세포 분화를 증진시키는 유전자 변형을 추가로 포함하는 세포.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 살해 활성이 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 살해 활성과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 세포.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 항원예의 TCR의 결합 시 세포의 증식이 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 증식과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 세포.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 세포에 의한 항원예의 TCR의 결합 시 전염증성 시토카인의 분비가 외인성 CD8을 갖지 않는 세포에 의한 분비와 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 세포.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 LCK 친화도가 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 LCK 친화도와 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 세포.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 존속이 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 존속과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 세포.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 종양 침윤 능력이 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 종양 침윤 능력과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 세포.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 TCR이 CD8-의존성 TCR인 세포.

청구항 44

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 TCR이 CD8-비의존성 TCR인 세포.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 CD8이 CD8 구축물 1, CD8 구축물 2, CD8 구축물 3, 또는 CD8 구축물 4에 의해 코딩되는 것인 세포.

청구항 46

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 CD8이 하기를 포함하는 것인 세포:

- a. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인;
- b. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인;
- c. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는
- d. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인.

청구항 47

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 CD8이 하기를 포함하는 것인 세포:

- a. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142);
- b. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포외 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147);
- c. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는
- d. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148).

청구항 48

하기 단계를 포함하는, 세포를 변형시키는 방법:

- a. 세포 내로 상동성 재조합 (HR) 주형 핵산 서열을 도입하며, 여기서 HR 주형은 하기를 포함하는 것인 단계:
 - i. 제1 및 제2 표적 핵산 서열에 대해 상동성인 제1 및 제2 상동성 아암;
 - ii. 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 TCR 유전자 서열;
 - iii. 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 CD8 유전자 서열; 및

b. HR 주형 핵산을 세포의 내인성 로커스 내로 제조합하는 단계.

청구항 49

제48항에 있어서, HR 주형이 CD8 유전자 서열의 상류에 위치한 제1 2A-코딩 서열, CD8 유전자 서열의 하류 및 TCR 유전자 서열의 상류에 위치한 제2 2A-코딩 서열, 및 TCR 유전자 서열의 하류에 위치한 제3 2A-코딩 서열을 포함하며; 여기서 제1, 제2, 및 제3 2A-코딩 서열이 동일한 아미노산 서열을 코딩하고, 서로에 대해 코돈-분기된 것인 방법.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, HR 주형이 제1, 제2, 및/또는 제3 2A-코딩 서열의 바로 상류에 위치한 아미노산 서열 Gly Ser Gly를 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 51

제49항 또는 제50항에 있어서, HR 주형이 제1, 제2, 및/또는 제3 2A-코딩 서열의 상류에 위치한 푸린 절단 부위를 코딩하는 서열을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제48항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, HR 주형이 TCR 유전자 서열 및/또는 CD8 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 신호 서열을 코딩하는 서열을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 53

제48항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, HR 주형이 제3 2A-코딩 서열 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 제2 TCR 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, HR 주형이 하기를 포함하는 것인 방법:

- 제1 TCR 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 제1 신호 서열을 코딩하는 서열; 및
- 제2 TCR 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 제2 신호 서열을 코딩하는 서열.

청구항 55

제48항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, HR 주형이 제1 CD8 유전자 서열 및 제2 2A-코딩 서열 사이에 위치한 제2 CD8 유전자 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 2A 코딩 서열이 제1 및 제2 CD8 유전자 서열 사이에 위치하는 것인 방법.

청구항 57

제55항 또는 제56항에 있어서, 아미노산 서열 Gly Ser Gly를 코딩하는 서열이 제1 및 제2 CD8 유전자 서열 사이에 위치하는 것인 방법.

청구항 58

제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 푸린 절단 부위를 코딩하는 서열이 제1 및 제2 CD8 유전자 서열 사이에 위치하는 것인 방법.

청구항 59

제48항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, CD8 유전자 서열이 세포외 도메인을 코딩하는 서열, 세포내 도메인을 코딩하는 서열, 세포내 도메인을 코딩하는 서열, 그의 단편, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 세포외 도메인을 코딩하는 서열이 CD8 α 세포외 도메인 또는 CD8 β 세포외 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서, 막횡단 도메인을 코딩하는 서열이 CD8 α 막횡단 도메인 또는 CD8 β 막횡단 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 62

제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인을 코딩하는 서열이 CD8 α 세포내 도메인 또는 CD8 β 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 63

제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인을 코딩하는 서열이 CD4 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 64

제59항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, CD8 유전자 서열이 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 65

제59항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, CD8 유전자 서열이 CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 66

제59항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, CD8 유전자 서열이 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 67

제59항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, CD8 유전자 서열이 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 68

제55항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, HR 주형이 하기를 포함하는 것인 방법:

- a. 제1 CD8 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 제1 신호 서열을 코딩하는 서열; 및
- b. 제2 CD8 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 제2 신호 서열을 코딩하는 서열.

청구항 69

제52항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 신호 서열이 CD8 신호 서열, 인간 성장 호르몬 신호 서열, 그의 단편, 또는 이들의 조합인 방법.

청구항 70

제48항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, HR 주형의 제1 및 제2 상동성 아암이 각각 약 300개 염기 내지 약 2,000개 염기의 길이인 방법.

청구항 71

제48항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, HR 주형의 제1 및 제2 상동성 아암이 각각 약 600개 염기 내지 약

2,000개 염기의 길이인 방법.

청구항 72

제48항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 TCR이 환자 유래 TCR인 방법.

청구항 73

제48항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 TCR이 신호 서열, 제1 및 제2 2A 서열, 및 TCR 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 74

제48항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 TCR이 암 항원을 인식하는 것인 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 암 항원이 신생항원인 방법.

청구항 76

제74항에 있어서, 암 항원이 환자 특이적 항원인 방법.

청구항 77

제48항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, HR 주형이 비-바이러스성인 방법.

청구항 78

제48항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, HR 주형이 원형 DNA인 방법.

청구항 79

제48항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, HR 주형이 선형 DNA인 방법.

청구항 80

제48항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 도입이 전기천공을 통해 일어나는 것인 방법.

청구항 81

제48항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합이 하기를 포함하는 것인 방법:

- a. 뉴클레아제에 의한 내인성 로커스의 절단; 및
- b. 상동성 지정 복구에 의한 내인성 로커스 내로의 HR 주형 핵산 서열의 재조합.

청구항 82

제81항에 있어서, 뉴클레아제가 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문구조 반복부 (CRISPR) 패밀리의 뉴클레아제, 또는 그의 유도체인 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, gRNA를 추가로 포함하는 방법.

청구항 84

제48항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 프로세스가 세포를 배양하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, 배양이 적어도 1종의 시토카인의 존재 하에서 수행되는 것인 방법.

청구항 86

제84항 또는 제85항에 있어서, 배양이 IL2, IL7, IL15, 또는 이들의 임의의 조합의 존재 하에서 수행되는 것인 방법.

청구항 87

제84항 또는 제85항에 있어서, 배양이 IL7 및 IL15의 존재 하에서 수행되는 것인 방법.

청구항 88

제48항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 존속을 증진시키고/거나 기억 세포 분화를 증진시키는 유전자 변형을 추가로 포함하는 방법.

청구항 89

제48항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 1차 세포인 방법.

청구항 90

제48항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 환자-유래 세포인 방법.

청구항 91

제48항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 림프구인 방법.

청구항 92

제48항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 T 세포인 방법.

청구항 93

제48항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 어린 T 세포인 방법.

청구항 94

제93항에 있어서, 세포가 CD45RA+, CD62L+, CD28+, CD95-, CCR7+, 및 CD27+인 방법.

청구항 95

제93항에 있어서, 세포가 CD45RA+, CD62L+, CD28+, CD95+, CD27+, CCR7+인 방법.

청구항 96

제93항에 있어서, 세포가 CD45RO+, CD62L+, CD28+, CD95+, CCR7+, CD27+, CD127+인 방법.

청구항 97

제48항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 살해 활성이 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 살해 활성과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 방법.

청구항 98

제48항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 항원예의 TCR의 결합 시 세포의 증식이 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 증식과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 방법.

청구항 99

제48항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 세포에 의한 항원예의 TCR의 결합 시 전염증성 시토카인의 분비가 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포에 의한 분비와 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 방법.

청구항 100

제48항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 LCK 친화도가 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 LCK 친화도와 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 방법.

청구항 101

제48항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 존속이 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 존속과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 방법.

청구항 102

제48항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 종양 침윤 능력이 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 종양 침윤 능력과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 방법.

청구항 103

제48항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, TCR 유전자가 CD8-의존성 TCR을 코딩하는 것인 방법.

청구항 104

제48항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, TCR 유전자가 CD8-비의존성 TCR을 코딩하는 것인 방법.

청구항 105

제48항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, CD8 유전자 서열이 CD8 구축물 1, CD8 구축물 2, CD8 구축물 3, 또는 CD8 구축물 4에 의해 코딩되는 것인 방법.

청구항 106

제48항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, CD8 유전자 서열이 하기를 포함하는 것인 방법:

- a. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인;
- b. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인;
- c. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는
- d. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD4 세포내 도메인.

청구항 107

제48항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, CD8 유전자 서열이 하기를 포함하는 것인 방법:

- a. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142);
- b. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포외 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147);
- c. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는
- d. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148).

청구항 108

제48항 내지 제107항 중 어느 한 항의 방법에 의해 변형된 세포.

청구항 109

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 세포 또는 제108항의 세포의 유효량을 포함하는 조성물.

청구항 110

제109항에 있어서, 조성물이 제약상 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 제약 조성물인 조성물.

청구항 111

제109항 또는 제110항에 있어서, 조성물이 암의 치료를 위해 이를 필요로 하는 환자에게 투여되는 것인 조성물.

청구항 112

제109항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 동결보존제를 포함하는 것인 조성물.

청구항 113

제109항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 혈청 알부민을 포함하는 것인 조성물.

청구항 114

제109항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 플라스마-라이트(Plasma-Lyte) A, HSA, 및 크리오스토르(CryoStor) CS10을 포함하는 것인 조성물.

청구항 115

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 세포, 제108항의 세포, 또는 제109항 내지 제114항 중 어느 한 항의 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 116

제115항에 있어서, 세포의 치료 유효량을 투여하기 전에, 비-골수소멸성 림프구고갈 레지넨이 대상체에게 투여되는 것인 방법.

청구항 117

제115항 또는 제116항에 있어서, 암이 고형 종양인 방법.

청구항 118

제115항 또는 제116항에 있어서, 암이 액상 종양인 방법.

청구항 119

제117항에 있어서, 고형 종양이 흑색종, 흉부암, 폐암, 난소암, 유방암, 췌장암, 두경부암, 전립선암, 부인과암, 중추 신경계암, 피부암, HPV+ 암, 식도암, 갑상선암, 위암, 간세포암, 담관암종, 신세포암, 고환암, 육종, 및 결합조직암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 120

제118항에 있어서, 액상 종양이 소포성 림프종, 백혈병, 및 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 121

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 세포, 제48항 내지 제107항 중 어느 한 항의 방법을 수행하기 위한 시약, 제108항의 세포, 또는 제109항 내지 제114항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 키트.

청구항 122

제121항에 있어서, 키트가 암을 치료하는 것에 대한 서면 지시서를 추가로 포함하는 것인 키트.

청구항 123

하기를 포함하는 세포:

a. 외인성 T 세포 수용체 (TCR); 및

b. 하기를 포함하는 외인성 CD8:

i. CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인;

ii. CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포의 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인;

iii. CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는

iv. CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인.

청구항 124

하기를 포함하는 세포:

a. 외인성 T 세포 수용체 (TCR); 및

b. 하기를 포함하는 외인성 CD8:

i. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142);

ii. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포의 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147);

iii. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는

iv. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148).

청구항 125

하기 단계를 포함하는, 세포를 변형시키는 방법으로서:

a. 세포 내로 상동성 재조합 (HR) 주형 핵산 서열을 도입하며, 여기서 HR 주형은 하기를 포함하는 것인 단계:

i. 제1 및 제2 표적 핵산 서열에 대해 상동성인 제1 및 제2 상동성 아암;

ii. 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 TCR 유전자 서열;

iii. 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 CD8 유전자 서열; 및

b. HR 주형 핵산을 세포의 내인성 로커스 내로 재조합하는 단계,

여기서 CD8 유전자 서열은 하기를 포함하는 것인 방법:

i. CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인;

ii. CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포의 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인;

iii. CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 β 세포내 도메인; 또는

iv. CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인.

청구항 126

하기 단계를 포함하는, 세포를 변형시키는 방법으로서:

a. 세포 내로 상동성 재조합 (HR) 주형 핵산 서열을 도입하며, 여기서 HR 주형은 하기를 포함하는 것인 단계:

i. 제1 및 제2 표적 핵산 서열에 대해 상동성인 제1 및 제2 상동성 아암;

ii. 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 TCR 유전자 서열;

iii. 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 CD8 유전자 서열; 및

b. HR 주형 핵산을 세포의 내인성 로커스 내로 재조합하는 단계,

여기서 CD8 유전자 서열은 하기를 포함하는 것인 방법:

i. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142);

ii. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포외 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147);

iii. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는

iv. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148).

청구항 127

세포를 포함하는 조성물로서, 여기서 세포는 외인성 T 세포 수용체 (TCR) 및 외인성 CD8을 포함하며, 여기서 외인성 CD8은 하기를 포함하는 것인 조성물:

a. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인;

b. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인,

c. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는

d. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인.

청구항 128

세포를 포함하는 조성물로서, 여기서 세포는 외인성 T 세포 수용체 (TCR) 및 외인성 CD8을 포함하며, 여기서 외인성 CD8은 하기를 포함하는 것인 조성물:

a. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142);

b. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포외 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147);

c. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는

d. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148).

청구항 129

치료 유효량의 세포를 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 여기서 세포는 외인성 T 세포 수용체 (TCR) 및 외인성 CD8을 포함하며, 여기서 외인성 CD8은 하기

를 포함하는 것인 방법:

- a. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인;
- b. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인,
- c. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는
- d. CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인.

청구항 130

치료 유효량의 세포를 투여하는 것을 포함하는 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 여기서 세포는 외인성 T 세포 수용체 (TCR) 및 외인성 CD8을 포함하며, 여기서 외인성 CD8은 하기를 포함하는 것인 방법:

- a. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142);
- b. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포외 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147);
- c. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는
- d. CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148).

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 5월 1일에 출원된 미국 가출원 번호 62/841,748, 및 2019년 5월 1일에 출원된 미국 가출원 번호 62/841,753에 대해 우선권을 주장하며, 이들의 내용은 그 전문이 포함되고, 그에 대한 우선권이 주장된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되었고, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2020년 4월 30일에 생성된 상기 ASCII 사본은 087520_0145_SL.txt로 명명되고, 120,294 바이트의 크기이다.

배경 기술

[0005] T 세포의 활성화는 T 세포 수용체 (TCR) 및 그의 공수용체 분자를 통한 신호전달을 요구한다. CD4 및 CD8은 펩티드-주요 조직적합성 (pMHC) 리간드 및 TCR 사이의 상호작용을 안정화시킴으로써 TCR 신호전달을 증진시키는 공수용체로서 역할을 하는 T 헬퍼 세포 및 세포독성 T 림프구 상에 발현되는 막 단백질이다 (Li QJ, et al. (2004) CD4 enhances T cell sensitivity to antigen by coordinating Lck accumulation at the immunological synapse. Nat Immunol 5:791-799; Holler PD, Kranz DM (2003) Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation. Immunity 18:255-264). 구체적으로, CD4 및 CD8 공수용체는 신호전달의 개시에 필수적인데, 이는 이들이 TCR-pMHC 복합체에 대한 키나제의 동원을 용이하게 하기 때문이다. 더욱이, 연구는 CD4 및 CD8 공수용체가 둘 다 그의 리간드에 대한 T 세포 민감도를 증강시키지만, 단지 CD8만이 TCR-pMHC 상호작용의 안정화에 있어서 역할을 함을 보였다.

[0006] 더욱이, 천연 발생 MHC-I TCR은 공동 CD8 공-수용체가 펩티드-MHC 결합을 안정화시키는 것을 도울 것이 요구되는 것으로 추정되지만, 보다 높은 친화도 TCR은 CD8-비의존성 표적 결합 및 T 세포 활성화를 유도한다. 따라서, CD4 T 세포는, 고 친화도 네오TCR(NeoTCR)로 조작되는 경우, 펩티드-MHC-I 표적을 인식하고 이펙터 T

세포 기능을 촉발시킬 수 있다. 그러나, 보다 낮은 친화도 TCR은 T 세포 활성화를 촉발시키기 위해 CD8 공-수용체에 의존한다.

[0007] 따라서, CD8 공-수용체 발현을 갖도록 조작된 네오TCR 세포 요법은 TCR-pMHC 상호작용을 안정화시키고, 이러한 CD8 공-수용체에 의존하는 저 친화도 TCR을 포함하는 네오TCR 세포 요법의 효능을 증가시킬 수 있다.

발명의 내용

[0008] 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 외인성 T 세포 수용체 (TCR), 및 외인성 CD8을 포함하는 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 외인성 CD8은 적어도 1종의 단량체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 외인성 CD8의 적어도 1종의 단량체는 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 세포내 도메인, 그의 단편, 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포외 도메인은 CD8 α 세포외 도메인 또는 CD8 β 세포외 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD8 α 막횡단 도메인 또는 CD8 β 막횡단 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD8 α 세포내 도메인 또는 CD8 β 세포내 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD4 세포내 도메인을 포함한다.

[0009] 특정 실시양태에서, 적어도 1종의 단량체는 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 1종의 단량체는 CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 1종의 단량체는 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 1종의 단량체는 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 1종의 단량체는 신호 펩티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 신호 펩티드는 CD8 신호 펩티드이다.

[0010] 특정 실시양태에서, 세포외 도메인은 서열식별번호(SEQ ID NO): 140, 또는 서열식별번호: 145에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열식별번호: 141, 또는 서열식별번호: 146에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포내 도메인은 서열식별번호: 142, 서열식별번호: 147, 또는 서열식별번호: 148에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 신호 펩티드는 서열식별번호: 139, 또는 서열식별번호: 144에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0011] 특정 실시양태에서, 외인성 CD8은 2A 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 외인성 CD8은 링커를 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커는 서열식별번호: 137에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 외인성 CD8은 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 프로테아제 절단 부위는 푸린 절단 부위이다.

[0012] 특정 실시양태에서, 외인성 TCR은 환자 유래 TCR이다. 특정 실시양태에서, 외인성 TCR은 신호 서열, 제1 및 제2 2A 서열, 및 TCR 폴리펩티드 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 외인성 TCR은 암 항원을 인식한다. 특정 실시양태에서, 암 항원은 신생항원이다. 특정 실시양태에서, 암 항원은 환자 특이적 항원이다.

[0013] 특정 실시양태에서, 세포는 1차 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 환자-유래 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 림프구이다. 특정 실시양태에서, 세포는 T 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 어린 T 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 CD45RA+, CD62L+, CD28+, CD95-, CCR7+, 및 CD27+이다. 특정 실시양태에서, 세포는 CD45RA+, CD62L+, CD28+, CD95+, CD27+, CCR7+이다. 특정 실시양태에서, 세포는 CD45RO+, CD62L+, CD28+, CD95+, CCR7+, CD27+, CD127+이다.

[0014] 특정 실시양태에서, 세포는 세포 존속을 증진시키고/거나 기억 세포 분화를 증진시키는 유전자 변형을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포의 살해 활성은 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 살해 활성과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가된다. 특정 실시양태에서, 항원에의 TCR의 결합 시 세포의 증식은 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 증식과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가된다. 특정 실시양태에서, 세포에 의한 항원에의 TCR의 결합 시 전염증성 시토카인의 분비는 외인성 CD8을 갖지 않는 세포에 의한 분비와 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가된다. 특정 실시양태에서, 세포의 LCK 친화도는 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 LCK 친화도와 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가된다. 특정 실시양태에서, 세포의 존속은 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 존속과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가된다. 특정 실시양태에서, 세포의 종양 침윤 능력은 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 종양 침윤 능력과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가된다.

[0015] 특정 실시양태에서, 외인성 TCR은 CD8-의존성 TCR이다. 특정 실시양태에서, 외인성 TCR은 CD8-비의존성 TCR이다. 특정 실시양태에서, 외인성 CD8은 CD8 구축물 1, CD8 구축물 2, CD8 구축물 3, 또는 CD8 구축물 4에 의해 코딩된다. 특정 실시양태에서, 외인성 CD8은 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도

메인; CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 외인성 CD8은 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포외 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148)을 포함한다.

[0016] 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 세포 내로 상동성 재조합 (HR) 주형 핵산 서열을 도입하며, 여기서 HR 주형은 제1 및 제2 표적 핵산 서열에 대해 상동성인 제1 및 제2 상동성 아암, 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 TCR 유전자 서열, 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 CD8 유전자 서열을 포함하는 것인 단계, 및 HR 주형 핵산을 세포의 내인성 로커스 내로 재조합하는 단계를 포함하는, 세포를 변형시키는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, HR 주형은 CD8 유전자 서열의 상류에 위치한 제1 2A-코딩 서열, CD8 유전자 서열의 하류 및 TCR 유전자 서열의 상류에 위치한 제2 2A-코딩 서열, 및 TCR 유전자 서열의 하류에 위치한 제3 2A-코딩 서열을 포함하며; 여기서 제1, 제2, 및 제3 2A-코딩 서열은 동일한 아미노산 서열을 코딩하고, 서로에 대해 코돈-분기된다. 특정 실시양태에서, HR 주형은 제1, 제2, 및/또는 제3 2A-코딩 서열의 바로 상류에 위치한 아미노산 서열 Gly Ser Gly를 코딩하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, HR 주형은 제1, 제2, 및/또는 제3 2A-코딩 서열의 상류에 위치한 푸린 절단 부위를 코딩하는 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, HR 주형은 TCR 유전자 서열 및/또는 CD8 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 신호 서열을 코딩하는 서열을 추가로 포함한다.

[0017] 특정 실시양태에서, HR 주형은 제3 2A-코딩 서열 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 제2 TCR 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, HR 주형은 제1 TCR 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 제1 신호 서열을 코딩하는 서열, 및 제2 TCR 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 제2 신호 서열을 코딩하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, HR 주형은 제1 CD8 유전자 서열 및 제2 2A-코딩 서열 사이에 위치한 제2 CD8 유전자 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 2A 코딩 서열은 제1 및 제2 CD8 유전자 서열 사이에 위치한다. 특정 실시양태에서, 아미노산 서열 Gly Ser Gly를 코딩하는 서열은 제1 및 제2 CD8 유전자 서열 사이에 위치한다. 특정 실시양태에서, 푸린 절단 부위를 코딩하는 서열은 제1 및 제2 CD8 유전자 서열 사이에 위치한다.

[0018] 특정 실시양태에서, CD8 유전자 서열은 세포외 도메인을 코딩하는 서열, 세포내 도메인을 코딩하는 서열, 세포내 도메인을 코딩하는 서열, 그의 단편, 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포외 도메인을 코딩하는 서열은 CD8 α 세포외 도메인 또는 CD8 β 세포외 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 막횡단 도메인을 코딩하는 서열은 CD8 α 막횡단 도메인 또는 CD8 β 막횡단 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포내 도메인을 코딩하는 서열은 CD8 α 세포내 도메인 또는 CD8 β 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포내 도메인을 코딩하는 서열은 CD4 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0019] 특정 실시양태에서, CD8 유전자 서열은 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 유전자 서열은 CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 유전자 서열은 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 유전자 서열은 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0020] 특정 실시양태에서, HR 주형은 제1 CD8 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 제1 신호 서열을 코딩하는 서열, 및 제2 CD8 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 제2 신호 서열을 코딩하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 신호 서열은 CD8 신호 서열, 인간 성장 호르몬 신호 서열, 그의 단편, 또는 이들의 조합이다. 특정 실시양태에서, HR 주형의 제1 및 제2 상동성 아암은 각각 약 300개 염기 내지 약 2,000개 염기의 길이이다. 특정 실시양태에서, HR 주형의 제1 및 제2 상동성 아암은 각각 약 600개 염기 내지 약 2,000개 염기의 길이이다.

- [0021] 특정 실시양태에서, 외인성 TCR은 환자 유래 TCR이다. 특정 실시양태에서, 외인성 TCR은 신호 서열, 제1 및 제2 2A 서열, 및 TCR 폴리펩티드 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 외인성 TCR은 암 항원을 인식한다. 특정 실시양태에서, 암 항원은 신생항원이다. 특정 실시양태에서, 암 항원은 환자 특이적 항원이다. 특정 실시양태에서, HR 주형은 비-바이러스성이다. 특정 실시양태에서, HR 주형은 원형 DNA이다. 특정 실시양태에서, HR 주형은 선형 DNA이다. 특정 실시양태에서, 도입은 전기천공을 통해 일어난다.
- [0022] 특정 실시양태에서, 재조합은 뉴클레아제에 의한 내인성 로커스의 절단, 및 상동성 지정 복구에 의한 내인성 로커스 내로의 HR 주형 핵산 서열의 재조합을 포함한다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제는 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문구조 반복부 (CRISPR) 패밀리 뉴클레아제, 또는 그의 유도체이다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제는 gRNA를 추가로 포함한다.
- [0023] 특정 실시양태에서, 방법은 세포를 배양하는 것을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 배양은 적어도 1종의 시토키인의 존재 하에서 수행된다. 특정 실시양태에서, 배양은 IL2, IL7, IL15, 또는 이들의 임의의 조합의 존재 하에서 수행된다. 특정 실시양태에서, 배양은 IL7 및 IL15의 존재 하에서 수행된다. 특정 실시양태에서, 방법은 세포 존속을 증진시키고/거나 기억 세포 분화를 증진시키는 유전자 변형을 포함한다.
- [0024] 특정 실시양태에서, 세포는 1차 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 환자-유래 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 림프구이다. 특정 실시양태에서, 세포는 T 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 어린 T 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 CD45RA+, CD62L+, CD28+, CD95-, CCR7+, 및 CD27+이다. 특정 실시양태에서, 세포는 CD45RA+, CD62L+, CD28+, CD95+, CD27+, CCR7+이다. 특정 실시양태에서, 세포는 CD45RO+, CD62L+, CD28+, CD95+, CCR7+, CD27+, CD127+이다.
- [0025] 특정 실시양태에서, 세포의 살해 활성은 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 살해 활성과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가된다. 특정 실시양태에서, 항원에의 TCR의 결합 시 세포의 증식은 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 증식과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가된다. 특정 실시양태에서, 세포에 의한 항원에의 TCR의 결합 시 전염증성 시토키인의 분비는 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포에 의한 분비와 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가된다. 특정 실시양태에서, 세포의 LCK 친화도는 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 LCK 친화도와 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가된다. 세포의 존속이 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 존속과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 제43항 내지 제95항 중 어느 한 항의 방법. 특정 실시양태에서, 세포의 종양 침윤 능력은 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 종양 침윤 능력과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가된다.
- [0026] 특정 실시양태에서, TCR 유전자는 CD8-의존성 TCR을 코딩한다. 특정 실시양태에서, TCR 유전자는 CD8-비의존성 TCR을 코딩한다. 특정 실시양태에서, CD8 유전자 서열은 CD8 구축물 1, CD8 구축물 2, CD8 구축물 3, 또는 CD8 구축물 4에 의해 코딩된다. 특정 실시양태에서, CD8 유전자 서열은 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인; CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD4 세포내 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 유전자 서열은 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포외 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148)을 포함한다.
- [0027] 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 본원에 개시된 임의의 방법에 의해 변형된 세포를 제공한다.
- [0028] 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 본원에 개시된 세포의 유효량을 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 제약상 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 제약 조성물이다. 특정 실시양태에서, 조성물은 암의 치료를 위해 이를 필요로 하는 환자에게 투여된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 동결보존제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 혈청 알부민을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 플라스마-라이트

(Plasma-Lyte) A, HSA, 및 크리오스토르(CryoStor) CS10을 포함한다.

- [0029] 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 본원에 개시된 세포 또는 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0030] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 세포의 치료 유효량을 투여하기 전에, 비-골수소멸성 림프구고갈 레지멘이 대상체에게 투여된다. 특정 실시양태에서, 암은 고형 종양이다. 특정 실시양태에서, 암은 액상 종양이다. 특정 실시양태에서, 고형 종양은 흑색종, 흉부암, 폐암, 난소암, 유방암, 췌장암, 두경부암, 전립선암, 부인과암, 중추 신경계암, 피부암, HPV+ 암, 식도암, 갑상선암, 위암, 간세포암, 담관암종, 신세포암, 고환암, 육종, 및 결장직장암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 액상 종양은 소포성 림프종, 백혈병, 및 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0031] 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 본원에 개시된 세포, 본원에 개시된 방법을 수행하기 위한 시약, 또는 본원에 개시된 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 특정 실시양태에서, 키트는 암을 치료하는 것에 대한 서면 지시서를 추가로 포함한다.
- [0032] 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 외인성 T 세포 수용체 (TCR); 및 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포의 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함하는 외인성 CD8을 포함하는 세포를 제공한다.
- [0033] 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 외인성 T 세포 수용체 (TCR); 및 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포의 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148)을 포함하는 외인성 CD8을 포함하는 세포를 제공한다.
- [0034] 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 세포 내로 상동성 재조합 (HR) 주형 핵산 서열을 도입하며, 여기서 HR 주형은 제1 및 제2 표적 핵산 서열에 대해 상동성인 제1 및 제2 상동성 아암; 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 TCR 유전자 서열; 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 CD8 유전자 서열을 포함하는 것인 단계; 및 HR 주형 핵산을 세포의 내인성 로커스 내로 재조합하는 단계를 포함하는, 세포를 변형시키는 방법으로서, 여기서 CD8 유전자 서열은 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포의 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 β 세포내 도메인; 또는 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함하는 것인 방법을 제공한다.
- [0035] 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 세포 내로 상동성 재조합 (HR) 주형 핵산 서열을 도입하며, 여기서 HR 주형은 제1 및 제2 표적 핵산 서열에 대해 상동성인 제1 및 제2 상동성 아암; 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 TCR 유전자 서열; 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 CD8 유전자 서열을 포함하는 것인 단계; 및 HR 주형 핵산을 세포의 내인성 로커스 내로 재조합하는 단계를 포함하는, 세포를 변형시키는 방법으로서, 여기서 CD8 유전자 서열은 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포의 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148)을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

- [0036] 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 세포를 포함하는 조성물로서, 여기서 세포는 외인성 T 세포 수용체 (TCR) 및 외인성 CD8을 포함하며, 여기서 외인성 CD8은 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포의 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함하는 것인 조성물을 제공한다.
- [0037] 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 세포를 포함하는 조성물로서, 여기서 세포는 외인성 T 세포 수용체 (TCR) 및 외인성 CD8을 포함하며, 여기서 외인성 CD8은 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포의 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148)을 포함하는 것인 조성물을 제공한다.
- [0038] 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 치료 유효량의 세포를 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 여기서 세포는 외인성 T 세포 수용체 (TCR) 및 외인성 CD8을 포함하며, 여기서 외인성 CD8은 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포의 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함하는 것인 방법을 제공한다.
- [0039] 특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 치료 유효량의 세포를 투여하는 것을 포함하는 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 여기서 세포는 외인성 T 세포 수용체 (TCR) 및 외인성 CD8을 포함하며, 여기서 외인성 CD8은 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포의 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148)을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0040] **도 1a-1c.** **도 1a-1c**는 네오TCR 산물을 제조하는데 사용될 수 있는 네오E(NeoE) TCR 카세트 및 유전자 편집 방법의 예를 나타낸다. **도 1a**는 신생항원-특이적 TCR 구축물 (네오TCR)을 TCR α 로커스 내로 통합하는데 사용된 일반적인 표적화 전략을 나타내는 개략도를 나타낸다. **도 1b** 및 **1c**는 네오TCR을 TCR α 로커스 내로 통합하는데 사용된 신생항원-특이적 TCR 구축물 디자인을 나타내며, 여기서 카세트는 신호 서열 ("SS"), 프로테아제 절단 부위 ("P"), 및 2A 펩티드 ("2A")를 갖는 것으로 나타내어진다. **도 1b**는 표적 TCR α 로커스 (내인성 TRAC, 상부 패널) 및 그의 CRISPR Cas9 표적 부위 (수평 줄무늬, 절단 부위는 화살표에 의해 표시됨), 및 통합 전에 좌측 및 우측 상동성 아암 (각각 "LHA" 및 "RHA") 사이에 위치한 네오TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 갖는 원형 플라스미드 HR 주형 (하부 패널)을 나타낸다. **도 1c**는 TCR α 로커스에서의 통합된 네오TCR (상부 패널), 전사되고 스플라이싱된 네오TCR mRNA (중간 패널), 및 발현된 네오TCR의 번역 및 프로세싱 (하부 패널)을 나타낸다.
- 도 2a-2d.** **도 2a-2d**는 CD8 구축물 1, 2, 3, 및 4를 코딩하는데 사용된 원형 플라스미드를 나타낸다. **도 2a**는 CD8 산물 1을 제조하는데 사용된 CD8 구축물 1을 나타낸다. **도 2b**는 CD8 산물 2를 제조하는데 사용된 CD8 구축물 2를 나타낸다. **도 2c**는 CD8 산물 3을 제조하는데 사용된 CD8 구축물 3을 나타낸다. **도 2d**는 CD8 산물 4를 제조하는데 사용된 CD8 구축물 4를 나타낸다. **도 2a-2d**에 나타내어진 바와 같이, SS는 신호 서열을 나타낸다. **도 6, 7, 8, 및 9**에 기재된 바와 같이, SS는 HGH일 수 있지만; 적절한 트래피킹을 위해 필요에 따라 다른 신호

서열이 사용될 수 있다. 도 2a-2d에 나타내어진 바와 같이, P는 프로테아제 절단 부위를 나타낸다. 도 6, 7, 8, 및 9에 기재된 바와 같이, P는 푸린일 수 있지만; 본원에 기재된 절단 작용을 제공하기 위해 적절한 경우 다른 프로테아제 절단 부위가 사용될 수 있다. 도 2a-2d에 나타내어진 바와 같이, 2A는 2A 펩티드를 나타낸다. 도 6, 7, 8, 및 9에 기재된 바와 같이, 2A는 P2A 펩티드일 수 있지만; 다른 2A 펩티드가 사용될 수 있다.

도 3. 도 3a-3d는 CD8 산물 1, 2, 3, 및 4를 생성하는 CD8 구축물 1, 2, 3, 및 4 각각의 전사/스플라이싱 및 번역 프로세싱을 나타낸다. 도 3a-3d에 나타내어진 바와 같이, SS는 신호 서열을 나타낸다. 도 6, 7, 8, 및 9에 기재된 바와 같이, SS는 HGH일 수 있지만; 적절한 트래피킹을 위해 필요에 따라 다른 신호 서열이 사용될 수 있다. 도 3a-3d에 나타내어진 바와 같이, P는 프로테아제 절단 부위를 나타낸다. 도 6, 7, 8, 및 9에 기재된 바와 같이, P는 푸린일 수 있지만; 본원에 기재된 절단 작용을 제공하기 위해 적절한 경우 다른 프로테아제 절단 부위가 사용될 수 있다. 도 3a-3d에 나타내어진 바와 같이, 2A는 2A 펩티드를 나타낸다. 도 6, 7, 8, 및 9에 기재된 바와 같이, 2A는 P2A 펩티드일 수 있지만; 다른 2A 펩티드가 사용될 수 있다.

도 4a 및 4b. 도 4a는 CD8 산물 1 및 CD8 산물 2의 번역된 산물을 나타낸다. 도 4b는 CD8 산물 3 및 CD8 산물 4의 번역된 산물을 나타낸다.

도 5. 도 5는 도 1a-1c에 기재된 네오TCR 구축물의 예시적인 DNA 서열을 제공한다. 핵산의 보존적 치환은 동일한 번역된 산물을 생성하기 위해 전반에 걸쳐 사용될 수 있다. 더욱이, 아미노산이 기능의 변화 없이 치환될 수 있는 경우, 도 5에 제공된 핵산의 치환은 또한 번역된 단백질의 실질적으로 유사하거나 동일한 기능을 부여하는 치환된 아미노산을 달성하는데 사용될 수 있다.

도 6. 도 6은 도 2a, 3a, 및 4a에 기재된 CD8 구축물 1 (및 번역된 CD8 산물 1)의 예시적인 DNA 서열을 제공한다. 핵산의 보존적 치환은 동일한 번역된 산물을 생성하기 위해 전반에 걸쳐 사용될 수 있다. 더욱이, 아미노산이 기능의 변화 없이 치환될 수 있는 경우, 도 6에 제공된 핵산의 치환은 또한 번역된 단백질의 실질적으로 유사하거나 동일한 기능을 부여하는 치환된 아미노산을 달성하는데 사용될 수 있다.

도 7. 도 7은 도 2b, 3b, 및 4a에 기재된 CD8 구축물 2 (및 번역된 CD8 산물 2)의 예시적인 DNA 서열을 제공한다. 핵산의 보존적 치환은 동일한 번역된 산물을 생성하기 위해 전반에 걸쳐 사용될 수 있다. 더욱이, 아미노산이 기능의 변화 없이 치환될 수 있는 경우, 도 7에 제공된 핵산의 치환은 또한 번역된 단백질의 실질적으로 유사하거나 동일한 기능을 부여하는 치환된 아미노산을 달성하는데 사용될 수 있다.

도 8. 도 8은 도 2c, 3c, 및 4b에 기재된 CD8 구축물 3 (및 번역된 CD8 산물 3)의 예시적인 DNA 서열을 제공한다. 핵산의 보존적 치환은 동일한 번역된 산물을 생성하기 위해 전반에 걸쳐 사용될 수 있다. 더욱이, 아미노산이 기능의 변화 없이 치환될 수 있는 경우, 도 8에 제공된 핵산의 치환은 또한 번역된 단백질의 실질적으로 유사하거나 동일한 기능을 부여하는 치환된 아미노산을 달성하는데 사용될 수 있다.

도 9. 도 9는 도 2d, 3d, 및 4b에 기재된 CD8 구축물 4 (및 번역된 CD8 산물 4)의 예시적인 DNA 서열을 제공한다. 핵산의 보존적 치환은 동일한 번역된 산물을 생성하기 위해 전반에 걸쳐 사용될 수 있다. 더욱이, 아미노산이 기능의 변화 없이 치환될 수 있는 경우, 도 9에 제공된 핵산의 치환은 또한 번역된 단백질의 실질적으로 유사하거나 동일한 기능을 부여하는 치환된 아미노산을 달성하는데 사용될 수 있다.

도 10. 도 10은 CD8 산물 1, 2, 3, 및 4 각각의 예측된 LCK 활성화와 함께 CD8 산물 1, 2, 3, 및 4의 시각적 묘사를 제시한다.

도 11a-11d. 도 11a는 CD8 산물 1의 예시적인 발현 구축물을 제공한다. 도 11b는 CD8 산물 2의 예시적인 발현 구축물을 제공한다. 도 11c는 CD8 산물 3의 예시적인 발현 구축물을 제공한다. 도 11d는 CD8 산물 4의 예시적인 발현 구축물을 제공한다.

도 12. 도 12는 CD8 산물의 살해 능력을 나타내는 인큐사이트(Incucyte) 실험의 디자인을 도해한다.

도 13a 및 13b. 도 13a 및 13b는 CD4 T 세포의 집단에서 CD8 산물 4와 동일한 네오TCR을 갖는 네오TCR 산물에 비해 CD8 산물 4의 증가된 종양 살해 능력을 나타낸다. 구체적으로, CD8 산물 4 및 네오TCR 산물 둘 다는 TCR097을 발현한다. 그러나, CD8 산물 4는 또한 CD8 α 의 세포외 도메인 및 CD4의 세포내 도메인을 포함하는 CD8 구축물 4를 발현한다. 이펙터:표적 세포 비 (E:T 비)는 1:1 (도 13a) 또는 2:1 (도 13b)이었고, 각각은 세포주 당 유전자 편집에 대해 정규화되었다. 이 실험에 사용된 SW620 COX6C R20Q 이형접합성 종양 세포는 TCR097에 대한 동족 항원을 발현하는 세포주였다 (CD8 의존성 TCR). 이는 TCR097의 저 친화도 결합이 CD8 α 의 세포외 도메인 및 CD4의 세포내 도메인을 공동-발현시킴으로써 세이브될 수 있음을 나타낸다.

도 14. 도 14는 CD4 T 세포의 집단에서 CD8 산물 4와 동일한 네오TCR을 갖는 네오TCR 산물에 비해 CD8 산물 4의 증가된 종양 살해 능력을 나타낸다. 구체적으로, CD8 산물 4 및 네오TCR 산물 둘 다는 TCR097을 발현한다. 그러나, CD8 산물 4는 또한 CD8a의 세포외 도메인 및 CD4의 세포내 도메인을 포함하는 CD8 구축물 4를 발현한다. 이펙터:표적 세포 비 (E:T 비)는 1:1, 1:2, 또는 1:4이었고, 각각은 세포주 당 유전자 편집에 대해 정규화되었다. 이 실험에 사용된 SW620 COX6C R20Q 동형접합성 종양 세포는 TCR097에 대한 동족 항원을 발현하는 세포주였다. 도 13a 및 13b에 나타내어진 것에 비해 이 실험에서 증가된 살해를 볼 수 있는데, 이는 세포주가 동족 항원 발현에 대해 동형접합성이기 때문이며; 따라서, 비록 TCR97이 저 친화도 TCR이라 하더라도, 동족 항원의 증가된 양은 저 친화도 한계를 극복하였다.

도 15a 및 15b. 도 15a 및 15b는 CD4 T 세포 (도 15a 및 15b에서 상부 그래프) 또는 CD8 T 세포 (도 15a 및 15b에서 하부 그래프)의 집단에서 CD8 산물 4와 동일한 네오TCR을 갖는 네오TCR 산물에 비해 CD8 산물 4의 증가된 종양 살해 능력이 있음 및 CD8 산물 4가 CD8 T 세포에서 네오TCR 구축물 및 CD8 산물 4를 단순히 발현시키는 것보다 종양 살해에 있어서 더 효과적임을 나타내는 예시적인 대조군 실험을 제공한다. 도 15a는 2:1의 E:T 비를 나타내고, 도 15b는 1:1의 E:T 비를 나타낸다.

도 16. 도 16은 CD8 구축물 4의 표면 발현을 나타낸다. 피크 #1은 CD4+/CD8- T 세포 (TCR089를 발현함)에서의 네오TCR 산물이다. 피크 #2는 CD8+/CD4+ T 세포에서의 CD8 산물 4이다. 피크 #3은 CD8+/CD4- T 세포에서의 네오TCR 산물이다. 나타내어진 바와 같이, CD8 구축물 4는 네오TCR 산물처럼 적절하고 필적하는 표면 발현을 나타내었다. 다른 CD8 구축물로 유사한 결과가 달성되었다 (데이터는 나타내지 않음).

도 17a 및 17b. 도 17a 및 17b는 CD8 α 발현이 특이성을 유지하면서 CD4 T 세포 민감도를 신장시킴을 나타낸다. 도 17a는 CD8 구축물 1-4의 발현이 T 세포의 민감도를 증가시키고, 네오TCR에 대한 CD8 산물의 특이성을 변화시키지 않음을 나타낸다. 나타내어진 바와 같이, CD8 구축물의 공동-발현은 EC50을 감소시키며, 이는 네오TCR에 대한 증가된 민감도를 나타낸다. 도 17b는 CD8 산물 1-4가 네오TCR 097에 대한 동족 항원에 대해 특이적임을 나타내는데, 이는 단지 동족 항원의 존재 하에서 CD8 산물 1-4의 CD8 세포에 의한 INF γ 생산이 있기 때문이다 (즉, 미스매칭된 항원의 존재 하에서 CD8 산물 1-4의 CD8 세포에 의한 INF γ 생산 없음). 도 17a 및 17b에 나타내어진 것과 동일한 실험을 INF γ 대신 CD107a로 수행하였으며, INF γ 로의 결과를 확인하는 네오TCR에 대한 유지된 특이성과 함께 동일한 증가된 민감도가 보여졌다 (데이터는 나타내지 않음).

도 18. 도 18은 CD8 α 발현이 CD8-비의존성 네오TCR 중에서 CD4 T 세포 민감도를 신장시킴을 나타낸다. 도면은 CD8-비의존성 네오TCR089로부터의 데이터를 나타낸다. 이는 네오TCR이 CD8-비의존성인 경우에도, CD8 산물 4의 민감도의 증가가 있음을 나타낸다. 이는 민감도가 심지어 CD8-비의존성 TCR에 대해서도 증가될 수 있음을 발견하는 놀라운 결과였다. CD8 산물 1-3으로 유사한 결과가 달성되었다 (데이터는 나타내지 않음). 따라서, CD8-의존성 (예를 들어, 네오TCR097) 및 CD8-비의존성 (예를 들어, 네오TCR089)은 동일한 네오TCR을 발현하는 네오 TCR 산물에 비해 증가된 민감도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 하기 참고문헌은 통상의 기술자에게 본 개시된 대상에 사용된 많은 용어의 일반적 정의를 제공한다: 문헌 [Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994)]; [The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988)]; [The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991)]; 및 [Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)]. 본원에 사용된 하기 용어는 달리 특정되지 않는 한, 하기 그들에 주어진 의미를 갖는다.

본원에 기재된 본 발명의 측면 및 실시양태는 "포함하는", "이루어진", 및 "본질적으로 이루어진" 측면 및 실시양태를 포함함이 이해된다. 용어 "포함한다" 및 "포함하는"은 미국 특허법에서 그들에 주어진 넓은 의미를 갖는 것으로 의도되며, "포괄한다", "포괄하는" 등을 의미할 수 있다.

본원에 사용된 용어 "약" 또는 "대략"은 값이 측정되거나 결정되는 방법, 즉, 측정 시스템의 한계에 부분적으로 의존할 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정된 바와 같은 특정 값에 대한 허용되는 오차 범위 내를 의미한다. 예를 들어, "약"은 관련 기술분야의 관행에 따라, 3 또는 3 초과의 표준 편차 내를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 주어진 값의 최대 20%, 예를 들어, 최대 10%, 최대 5%, 또는 최대 1%의 범위를 의미할 수 있

다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 프로세스에 관하여, 상기 용어는 값의 한 자릿수 내, 예를 들어, 5배 내 또는 2배 내를 의미할 수 있다.

- [0045] 본원에 사용된 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 이들이 목적하는 항원-결합 활성을 나타내는 한, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 및 삼중-특이적 항체), 및 항체 단편 (예를 들어, 비스-Fab)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 항체 구조를 포괄한다. 본원에 사용된 "항체 단편"은 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 무손상 항체의 부분을 포함하는 무손상 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 비스-Fab; Fv; Fab; Fab, Fab'-SH; F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자 (예를 들어, scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0046] 용어 "암" 및 "종양"은 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 본원에 사용된 용어 "암" 또는 "종양"은 악성이든 양성이든 모든 신생물성 세포 성장 및 증식, 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다. 상기 용어는 또한 전형적으로 비조절된 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 상태를 지칭하거나 기재하기 위해 사용된다. 암은 방광, 뼈, 뇌, 유방, 연골, 신경아교, 식도, 나팔관, 담낭, 심장, 장, 신장, 간, 폐, 림프절, 신경 조직, 난소, 췌장, 전립선, 골격근, 피부, 척수, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 기관, 비뇨생식관, 요관, 요도, 자궁, 및 질로 이루어진 군으로부터 선택되는 기관, 또는 그의 조직 또는 세포 유형을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 세포 유형, 조직, 또는 기관에 영향을 미칠 수 있다. 암은 육종, 암종, 또는 형질세포종 (형질 세포의 악성 종양)과 같은 암을 포함한다. 암의 예는 본원에 기재된 것들을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 용어 "암" 또는 "종양" 및 "증식성 장애"는 본원에 사용된 바와 같이 상호 배타적이지 않다.
- [0047] "CD8"은 면역계 내의 효율적인 세포-세포 상호작용을 매개하는 대부분의 세포독성 T 림프구 상에서 발견되는 세포 표면 당단백질이다. CD8 항원은 부류 I MHC 분자의 맥락에서 항원 제시 세포에 의해 제시되는 항원을 인식하는 T 림프구 상의 T-세포 수용체와의 공수용체로서 작용한다.
- [0048] 본원에 사용된 "CD8 세포"는 1종 이상의 네오TCR 및 CD8 구축물을 발현하도록 정확성 조작된 1종 이상의 세포를 의미한다.
- [0049] 본원에 사용된 "CD8 구축물"은 CD8 구축물 1, CD8 구축물 2, CD8 구축물 3, 또는 CD8 구축물 4 중 어느 하나를 의미한다.
- [0050] 본원에 사용된 "CD8 산물"은 CD8 세포를 포함하는 산물을 의미한다.
- [0051] "CD8 구축물 1" 및 "CD8 산물 1"은 네오TCR 및 CD8 α (CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인)를 포함하는 구축물 및 발현된 네오TCR 및 CD8 α를 포함하는 생성된 산물을 지칭한다. CD8 산물 1의 비-제한적 예는 도 2a, 3a, 및 6에 제공된다. CD8 산물 1의 비-제한적 예는 도 4a에 제공된다.
- [0052] "CD8 구축물 2" 및 "CD8 산물 2"는 네오TCR, CD8 α (CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인), 및 CD8 β (CD8 β 세포의 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인)를 포함하는 구축물 및 발현된 네오TCR, CD8 α, 및 CD8 β를 포함하는 생성된 산물을 지칭한다. CD8 산물 2의 비-제한적 예는 도 2b, 3b, 및 7에 제공된다. CD8 산물 1의 비-제한적 예는 도 4a에 제공된다.
- [0053] "CD8 구축물 3" 및 "CD8 산물 3"은 네오TCR, CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인을 포함하는 구축물 및 발현된 네오TCR, CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인을 포함하는 생성된 산물을 지칭한다. CD8 산물 3의 비-제한적 예는 도 2c, 3c, 및 8에 제공된다. CD8 산물 1의 비-제한적 예는 도 4b에 제공된다.
- [0054] "CD8 구축물 4" 및 "CD8 산물 4"는 네오TCR, CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함하는 구축물 및 발현된 네오TCR, CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함하는 생성된 산물을 지칭한다. CD8 산물 4의 비-제한적 예는 도 2d, 3d, 및 9에 제공된다. CD8 산물 1의 비-제한적 예는 도 4b에 제공된다.
- [0055] "보존적 치환" 또는 "보존적 아미노산"은 화학적으로 또는 기능적으로 유사한 아미노산으로의 아미노산의 치환을 지칭한다. 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다.
- [0056] 특정 실시양태에서, 산성 아미노산 D 및 E는 서로에 대해 보존적 치환이고; 염기성 아미노산 K, R, 및 H는 서로

에 대해 보존적 치환이고; 친수성 비하전된 아미노산 S, T, N, 및 Q는 서로에 대해 보존적 치환이고; 지방족 비하전된 아미노산 G, A, V, L, 및 I는 서로에 대해 보존적 치환이고; 비-극성 비하전된 아미노산 C, M, 및 P는 서로에 대해 보존적 치환이고; 방향족 아미노산 F, Y, 및 W는 서로에 대해 보존적 치환이고; A, S, 및 T는 서로에 대해 보존적 치환이고; D 및 E는 서로에 대해 보존적 치환이고; N 및 Q는 서로에 대해 보존적 치환이고; R 및 K는 서로에 대해 보존적 치환이고; I, L, 및 M은 서로에 대해 보존적 치환이고; F, Y, 및 W는 서로에 대해 보존적 치환이고; A 및 G는 서로에 대해 보존적 치환이고; D 및 E는 서로에 대해 보존적 치환이고; N 및 Q는 서로에 대해 보존적 치환이고; R, K 및 H는 서로에 대해 보존적 치환이고; I, L, M, 및 V는 서로에 대해 보존적 치환이고; F, Y 및 W는 서로에 대해 보존적 치환이고; S 및 T는 서로에 대해 보존적 치환이고; C 및 M은 서로에 대해 보존적 치환이다.

- [0057] 추가의 보존적 치환은 예를 들어, 문헌 [Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* 2nd ed. (1993) W. H. Freeman & Co., New York, NY]에서 발견될 수 있다.
- [0058] "치료하다", "치료", 및 "치료하는"은 상호교환가능하게 사용되며, 본원에 사용된 바와 같이 임상적 결과를 포함한 유익하거나 목적하는 결과를 얻는 것을 의미한다. 치료의 목적하는 효과는 질환의 발생 또는 재발을 방지하는 것, 증상의 경감, 질환의 임의의 직접적 또는 간접적 병리학적 결과의 감소, 전이를 방지하는 것, 질환 진행의 속도를 감소시키는 것, 질환 상태의 개선 또는 경감, 및 완화 또는 개선된 예후를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 네오TCR 산물은 증식성 장애 (예를 들어, 암)의 발달을 지연시키거나 이러한 질환의 진행을 감속시키는데 사용된다.
- [0059] 본원에 사용된 "텍스트라머"는 그의 동족 네오TCR에 특이적으로 결합하는 다량체화된 네오에피토프-HLA 복합체를 의미한다.
- [0060] 본원에 사용된 용어 "신생항원", "네오에피토프" 또는 "네오E"는 예를 들어, 체세포 돌연변이(들)로부터 발생하고, "비-자기"로서 인식되는 새롭게 형성된 항원 결정자를 지칭한다. "신생항원", "네오에피토프" 또는 "네오E"를 발생시키는 돌연변이는 프레임시프트 또는 비-프레임시프트 indel, 미스센스 또는 넌센스 치환, 스플라이스 부위 변경 (예를 들어, 대체 스플라이싱된 전사체), 게놈 재배열 또는 유전자 융합, 임의의 게놈 또는 발현 변경, 또는 임의의 번역후 변형을 포함할 수 있다.
- [0061] 본원에 사용된 "네오TCR", "네오E TCR" 및 "외인성 TCR"은 예를 들어, 유전자 편집 방법에 의해 T 세포 내로 도입된 네오에피토프-특이적 T 세포 수용체를 의미한다. 본원에 사용된 용어 "TCR 유전자 서열"은 네오TCR 유전자 서열을 지칭한다.
- [0062] 본원에 사용된 "네오TCR 세포"는 1종 이상의 네오TCR을 발현하도록 정확성 조작된 1종 이상의 세포를 의미한다. 특정 실시양태에서, 세포는 T 세포이다. 특정 실시양태에서, T 세포는 CD8+ 및/또는 CD4+ T 세포이다. 특정 실시양태에서, CD8+ 및/또는 CD4+ T 세포는 네오TCR 산물이 투여될 환자로부터의 자가 세포이다. 용어 "네오TCR 세포" 및 "네오TCR-P1 T 세포" 및 "네오TCR-P1 세포"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.
- [0063] 본원에 사용된 "네오TCR 산물"은 1종 이상의 네오TCR 세포를 포함하는 제약 제제를 의미한다. 네오TCR 산물은 자가 정확성 게놈-조작된 CD8+ 및 CD4+ T 세포로 이루어진다. 표적화된 DNA-매개 *비-바이러스* 정확성 게놈 조작 접근법을 사용하여, 내인성 TCR의 발현은 제거되고, 중앙-배타적 네오에피토프를 표적화하는 말초 CD8+ T 세포로부터 단리된 환자-특이적 네오TCR에 의해 대체된다. 특정 실시양태에서, 생성된 조작된 CD8+ 또는 CD4+ T 세포는 천연 서열, 천연 발현 수준, 및 천연 TCR 기능의 그들의 표면 상에 네오TCR을 발현한다. 네오TCR 외부 결합 도메인 및 세포질 신호전달 도메인의 서열은 천연 CD8+ T 세포로부터 단리된 TCR로부터 비변형된다. 네오TCR 유전자 발현의 조절은 네오TCR 유전자 카세트가 게놈 내로 통합된 상류에 위치한 천연 내인성 TCR 프로모터에 의해 유도된다. 이 접근법을 통해, 네오TCR 발현의 천연 수준은 비자극된 및 항원-활성화된 T 세포 상태에서 관찰된다.
- [0064] 각각의 환자에 대해 제조된 네오TCR 산물은 그 동일한 환자의 말초 혈액으로부터 개별적으로 단리된 네오E-특이적 CD8+ T 세포로부터 클로닝된 단일 네오E-특이적 TCR을 발현하도록 정확성 게놈 조작된 한정된 용량의 자가 CD8+ 및/또는 CD4+ T 세포를 나타낸다.
- [0065] 본원에 사용된 "네오TCR 바이러스 산물"은 게놈 조작이 바이러스 매개 방법을 사용하여 수행되는 것을 제외하고는 네오TCR 산물의 동일한 정의를 갖는다.
- [0066] "제약 제제"는 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 유효하게 되는 것을 허용하도록 하는 형태이고, 제제가 투여될 대상체에게 비허용가능하게 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 명확성을

위해, 네오TCR 산물에 사용된 대량의 DMSO는 비허용가능하게 독성인 것으로 간주되지 않는다.

- [0067] 치료의 목적을 위한 "대상체", "환자", 또는 "개체"는 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 경기, 또는 애완동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소 등을 포함한 포유동물로서 분류되는 임의의 동물을 지칭한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.
- [0068] 본원에 사용된 "TCR"은 T 세포 수용체를 의미한다.
- [0069] 본원에 사용된 용어 "종양 항원"은 정상 또는 비-신생물성 세포에 비해 종양 세포 상에 고유하게 또는 차등적으로 발현된 항원 (예를 들어, 폴리펩티드)을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 종양 항원은 항원-인식 수용체를 통해 면역 반응을 활성화시키거나 유도할 수 있는 또는 수용체-리간드 결합을 통해 면역 반응을 억제할 수 있는 종양에 의해 발현된 임의의 폴리펩티드를 포함한다.
- [0070] "2A" 및 "2A 펩티드"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되며, 진핵생물 세포에서 번역 동안 펩티드의 절단을 매개할 수 있는 18-22 아미노산 길이의 바이러스성 자기-절단 펩티드의 부류를 의미한다.
- [0071] 2A 펩티드 부류의 4가지 널리 공지된 구성원은 T2A, P2A, E2A, 및 F2A이다. T2A 펩티드는 토세아 아시그나 (Thosea asigna) 바이러스 2A에서 최초로 확인되었다. P2A 펩티드는 돼지 테스코바이러스-1 2A에서 최초로 확인되었다. E2A 펩티드는 말 A형 비염 바이러스에서 최초로 확인되었다. F2A 펩티드는 구제역 바이러스에서 최초로 확인되었다.
- [0072] 2A 펩티드의 자기-절단 메커니즘은 2A의 C-말단에서 글리실-프롤린 펩티드 결합의 형성을 스킵하는 리보솜의 결과이다. 구체적으로, 2A 펩티드는 입체 장해 및 리보솜 스킵의 생성에 필요한 C-말단 보존된 서열을 갖는다. 리보솜 스킵은 3가지 옵션 중 하나를 발생시킬 수 있다: 1) 2개의 절단된 단백질을 발생시키는 번역의 성공적인 스킵 및 재개 (C-말단 프롤린을 제외하고 완전한 2A 펩티드에 부착된 2A 단백질의 상류 및 N-말단에서 하나의 프롤린에 부착된 2A 단백질의 하류; 2) 중단된 번역 및 단지 2A의 상류의 단백질을 발생시키는 성공적인 스킵, 그러나 리보솜 떨어짐; 또는 3) 비성공적인 스킵 및 계속된 번역 (즉, 융합 단백질).
- [0073] 본원에 사용된 용어 "내인성"은 세포 또는 조직에서 정상적으로 발현되는 핵산 분자 또는 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0074] 본원에 사용된 용어 "외인성"은 세포에 내인적으로 존재하지 않는 핵산 분자 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 따라서, 용어 "외인성"은 세포에서 발현된 임의의 재조합 핵산 분자 또는 폴리펩티드, 예컨대 외래, 이종, 및 과-발현된 핵산 분자 및 폴리펩티드를 포괄한다. "외인성" 핵산이란 천연 야생형 세포에 존재하지 않는 핵산을 의미하며; 예를 들어, 외인성 핵산은 서열에 의해, 위치/장소에 의해, 또는 둘 다에 의해 내인성 대응물과는 다를 수 있다. 명확성을 위해, 외인성 핵산은 그의 천연 내인성 대응물에 비해 동일하거나 상이한 서열을 가질 수 있으며; 이는 세포 자체 또는 그의 전구체 내로의 유전자 조작에 의해 도입될 수 있고, 임의로 대안적 제어 서열, 예컨대 비-천연 프로모터 또는 분비 서열에 연결될 수 있다.
- [0075] 그것이 T 세포에 관한 것일 때 "어린" 또는 "보다 어린" 또는 "어린 T 세포"는 기억 줄기 세포 (T_{MSC}) 및 중심 기억 세포 (T_{CM})를 의미한다. 이들 세포는 특이적 활성화 시 T 세포 증식을 가지며, 다중 세포 분열에 적격이다. 이들은 또한 재-주입 후 그래프팅되어, 그들의 동족 항원에의 노출 시 이펙터 T 세포로 급속하게 분화되고, 종양 세포를 표적화하고 살해할 뿐만 아니라, 진행중인 암 감시 및 제어를 위해 존속하는 능력을 갖는다.
- [0076] **네오TCR 산물**
- [0077] 일부 실시양태에서, 그 전문이 본원에 포함되는 PCT/US2020/17887 및 PCT/US2019/025415에 기재된 유전자 편집 기술 및 네오TCR 단리 기술을 사용하여, 네오TCR은 네오TCR을 발현하도록 조작된 정확성 계층에 의해 (도 1a-1c에 기재된 바와 같은 DNA-매개 (비-바이러스) 방법을 사용하여) 암을 갖는 동일한 환자로부터의 자가 CD8+ 및 CD4+ T 세포에서 클로닝된다. 다시 말해서, 종양 특이적인 네오TCR을 암 환자에서 확인하고, 이어서 이러한 네오TCR을 클로닝하고, 이어서 클로닝된 네오TCR을 암 환자의 T 세포 내로 삽입한다. 이어서 네오TCR 발현 T 세포를 "어린" T 세포 표현형을 보존하는 방식으로 확장시켜, T 세포의 대다수가 T 기억 줄기 세포 및 T 중심 기억 표현형을 나타내는 네오TCR-P1 산물 (즉, 네오TCR 산물)을 생성한다.
- [0078] 이들 '어린' 또는 '보다 어린' 또는 덜-분화된 T 세포 표현형은 개선된 그래프팅 잠재성 및 주입 후 연장된 존속을 부여하는 것으로 기재된다. 따라서, 유의하게 '어린' T 세포 표현형으로 이루어진 네오TCR 산물의 투여는

개선된 그래프팅 잠재성, 주입 후 연장된 존속, 및 신체 전반에 걸쳐 종양 세포를 근절시키는 이펙터 T 세포로의 급속한 분화를 통해, 암을 갖는 환자를 유익하게 할 잠재성을 갖는다.

- [0079] 생체의 작용 메커니즘 연구를 또한 암을 갖는 환자로부터의 T 세포로 제조된 네오TCR 산물로 수행하였다. T 세포 살해 활성, 증식, 및 시토카인 생산의 항원-특이성에 의해 측정된 바와 같은 필적하는 유전자 편집 효율 및 기능적 활성이 관찰되었으며, 이는 본원에 기재된 제조 프로세스가 출발 물질로서 암을 갖는 환자로부터의 T 세포를 갖는 산물을 생성하는데 있어서 성공적임을 입증한다.
- [0080] 특정 실시양태에서, 네오TCR 산물 제조 프로세스는 가이드 RNA 서열에 결합된 CRISPR-Cas9 뉴클레아제의 이중 리보핵단백질 종의 전기천공을 수반하며, 각각의 종은 게놈 TCR α 및 게놈 TCR β 로커스를 표적화한다. Cas9 뉴클레아제를 각각의 게놈 로커스에 표적화하는 특이성은 고도로 특이적인 것으로 문헌에 이전에 기재되었다. 각각 COSMID 및 GUIDE-seq를 사용하여, 네오TCR 산물의 포괄적인 시험을 시험관내에서 및 인 실리코 분석에서 수행하여 가능한 오프-타겟 게놈 절단 부위를 조사하였다. 건강한 공여자로부터의 다중 네오TCR 산물 또는 필적하는 세포 산물을 딥 시퀀싱에 의해 후보 오프-타겟 부위의 절단에 대해 평가하였으며, 이는 선택된 뉴클레아제가 고도로 특이적이라는 공개된 증거를 뒷받침한다.
- [0081] 정확성 게놈 조작 프로세스의 추가의 측면은 안전성에 대해 평가되었다. 표적화된 로커스 증폭 (TLA) 또는 표준 FISH 세포유전학에 의해 다중 네오TCR 산물을 평가하는데 있어서 정확성 게놈 조작 후의 게놈 불안정성의 증거는 발견되지 않았다. 네오TCR 서열의 게놈 내로 어디에서도 오프-타겟 통합은 검출되지 않았다. 잔여 Cas9의 증거는 세포 산물에서 발견되지 않았다.
- [0082] 네오TCR 산물 및 정확성 게놈 조작 프로세스의 포괄적인 평가는 네오TCR 산물이 환자로의 재주입 후 잘 내성화될 것임을 지시한다.
- [0083] 본원에 기재된 게놈 조작 접근법은 고형 및 액상 종양을 갖는 환자에 대한 개인화된 입양 세포 요법을 위한 맞춤형 네오TCR T 세포 (즉, 네오TCR 산물)의 고도로 효율적인 생성을 가능하게 한다. 더욱이, 조작 방법은 T 세포에서의 사용에 제한되지 않으며, 또한 자연 킬러 및 조혈 줄기 세포를 포함한 다른 1차 세포 유형에 성공적으로 적용되었다.
- [0084] **CD8 산물**
- [0085] 정확성 게놈 조작된 CD4 T 세포에서의 MHC 부류 I-제한된 네오TCR 및 이소성 CD8 수용체의 공동발현은 항원-특이적 이펙터 기능을 유익하게 강화시킨다.
- [0086] 종양-배타적 돌연변이로부터의 네오에피토프는 고형 종양을 갖는 환자에 대한 개인화된 네오E-특이적 자가 TCR-T 세포 요법을 위한 강력한 표적을 나타낸다. 그 전문이 참조로 포함되는 PCT/US2020/17887에 기재된 바와 같은 imPACT 단리 기술은 고형 암을 갖는 환자의 혈액으로부터 네오E-특이적 CD8 T 세포를 포획하기 위한 초-민감성 및 고-처리량 프로세스이다. 이 기술을 지렛대로 하여, 네오에피토프-특이적 MHC 부류 I-제한된 TCR ("MHC-I 네오TCR")을 개별적으로 포획된 CD8 T 세포로부터 클로닝하였다. **실시예 1**에 기재된 바와 같은 DNA-매개 (비-바이러스) 유전자 편집을 사용하여, 암을 갖는 동일한 환자로부터의 신선한 CD8 및 CD4 T 세포를 MHC-I 네오TCR를 발현하도록 조작하였다 (내인성 TCR의 제거와 수반하여).
- [0087] 천연 발생 MHC-I TCR은 공동 CD8 공-수용체가 펩티드-MHC 결합을 안정화하는 것을 도울 것이 요구되는 것으로 추정되었지만, 보다 높은 친화도 TCR은 CD8-비의존성 표적 결합 및 T 세포 활성화를 유도할 수 있었다. 따라서, CD4 T 세포는, 고 친화도 네오TCR로 조작되는 경우, 펩티드-MHC-I 표적을 인식하고, 이펙터 T 세포 기능을 촉발시킬 수 있었다. 그러나, 보다 낮은 친화도 TCR은 T 세포 활성화를 촉발시키기 위해 CD8 공-수용체에 의존적이었다. 네오TCR과 함께 CD8 공-수용체 유전자를 CD4 T 세포 내로 정확성 게놈 조작함으로써, MHC-I 네오TCR은 항원-특이적 이펙터 T 세포 기능을 촉발시키는데 적격이도록 만들어졌다.
- [0088] CD8은 TCR-pMHC 상호작용을 안정화시키고, 결합력을 위해 TCR과 상승작용한다. CD8은 또한 저 친화도 TCR로부터 결합력을 증진시키는 역할을 하는 반면, CD8 α 의 세포내 도메인은 증진된 T 세포 활성화를 위해 중요하다. CD8의 발현은 CD4 T 세포 반응을 증진시킬 수 있으며, 이는 pMHC의 생리학적 농도에 반응하지 않을 수 있다. MHC에의 CD8 결합의 파괴는 캐치-결합 TCR-pMHC를 슬립-결합으로 전환시킬 수 있으며, 이는 심지어 CD8에 비의존적인 pMHC에 결합하는 TCR에 대해서도 CD8-MHC 상호작용의 중요성을 강조한다.
- [0089] CD8 α 는 CD8 β 보다 LCK에 대한 더 낮은 친화도를 가지며, 이는 CD8 α 및 CD8 β 둘다의 공동-발현 또는 세포외 CD8 α 및 CD8 β 의 세포내 도메인을 함유하는 키메라 CD8 α -CD8 β 분자의 생성 중 어느 하나가 유효성을 개선시

킬 수 있음을 시사한다. 본원에 기재된 CD8 구축물은 하기이다:

1. CD8 α 동종이량체 (CD8 구축물 1)
2. CD8 α -P2A-CD8 β (CD8 구축물 2)
3. CD8 β 세포내 도메인을 갖는 CD8 α (CD8 구축물 3)
4. CD4 세포내 도메인을 갖는 CD8 α 동종이량체 (CD8 구축물 4).

일부 실시양태에서, 상기 기재된 네오TCR 산물은 CD8 구축물 1, CD8 구축물 2, CD8 구축물 3, 또는 CD8 구축물 4 (각각의 CD8 산물)의 발현을 포함하는 추가의 변형을 포함한다. 구체적으로, 그 전문이 본원에 포함되는 PCT/US2020/17887 및 PCT/US2019/025415에 기재된 유전자 편집 기술 및 네오TCR 단리 기술을 사용하여, 네오TCR은 네오TCR을 발현하도록 조작된 정확성 계놈에 의해 (도 1a-1c에 기재된 바와 같은 DNA-매개 (비-바이러스) 방법을 사용하여) 암을 갖는 동일한 환자로부터의 자가 CD8+ 및 CD4+ T 세포에서 클로닝된다.

CD8 구축물 각각은, 발현되는 경우, CD8 산물을 생성한다. 표 1은 각각의 구축물 및 산물의 설명을 제공한다.

표 1. CD8 산물 및 CD8 구축물

CD8 구축물	CD8 산물	발현 성분	예시적인 구축물	예시적인 산물
CD8 구축물 1	CD8 산물 1	네오TCR, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인	도 2a, 도 6	도 3a, 도 4a
CD8 구축물 2	CD8 산물 1	네오TCR, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, CD8 β 세포내 도메인	도 2b, 도 7	도 3b, 도 4a
CD8 구축물 3	CD8 산물 1	네오TCR, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 β 세포내 도메인	도 2c, 도 8	도 3c, 도 4b
CD8 구축물 4	CD8 산물 1	네오TCR, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD4 세포내 도메인	도 2d, 도 9	도 3d, 도 4b

특정 실시양태에서, CD8 산물 1은 네오TCR 및 CD8 동종이량체를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물 1은 네오TCR, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인의 발현을 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물 1은 CD8 α 신호 펩티드의 발현을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물 1은 도 3a에 제시된 번역된 요소를 포함한다. 비-제한적인 예시적인 실시양태에서, CD8 산물 1은 네오TCR, CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 각각의 요소의 기능을 보존하거나 실질적으로 보존하는 CD8 α 신호 펩티드, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인의 서열 변형은 이루어질 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 서열 변형은 아미노산의 보존적 치환이다.

비-제한적 실시양태에서, CD8 산물 1은 도 6에 제공된 CD8 구축물 1로부터 제조된다. 특정 실시양태에서, 도 6에 제공된 CD8 구축물 1의 서열은 CD8 α 신호 펩티드, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인의 번역이 보존된 기능을 갖는 각각의 요소를 남기는 한, 임의의 수의 방식으로 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 도 6에서 CD8 구축물 1의 각각의 요소의 순서는 동일하게 남아 있지만, 각각의 개별적인 요소의 서열은 핵산이 코딩하는 아미노산이 동일하게 남아 있거나 단지 보존적 치환을 포함하는 한, 변화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 도 6에서 CD8 구축물 1의 각각의 요소의 순서는 동일하게 남아 있지만, 각각의 개별적인 요소의 서열은 코딩된 단백질의 기능이 실질적으로 변화되지 않은 채 남아 있는 한, 변화될 수 있다.

특정 실시양태에서, CD8 산물 2는 네오TCR, CD8 α , 및 CD8 β 를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 α 및 CD8 β 는 발현을 위한 CD8 산물 2 구축물에서의 프로테아제 절단 부위 및 2A 펩티드에 의해 분리된다. 특정 실시양태

에서, CD8 산물 2는 네오TCR, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인의 발현을 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물 2는 CD8 α 신호 펩티드의 발현을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물은 CD8 β 신호 펩티드의 발현을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물은 CD8 α 신호 펩티드 및 CD8 β 신호 펩티드의 발현을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물 2는 **도 3b**에 제시된 번역된 요소를 포함한다. 비-제한적인 예시적인 실시양태에서, CD8 산물 2는 네오TCR, CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포외 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 각각의 요소의 기능을 보존하거나 실질적으로 보존하는 CD8 α 신호 펩티드, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인의 서열 변형이 이루어질 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 서열 변형은 아미노산의 보존적 치환이다.

[0101] 비-제한적 실시양태에서, CD8 산물 2는 **도 7**에 제공된 CD8 구축물 2로부터 제조된다. 특정 실시양태에서, **도 7**에 제공된 CD8 구축물 2의 서열은 CD8 α 신호 펩티드, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인의 번역이 보존된 기능을 갖는 각각의 요소를 남기는 한, 임의의 수의 방식으로 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, **도 7**에서 CD8 구축물 2의 각각의 요소의 순서는 동일하게 남아 있지만, 각각의 개별적인 요소의 서열은 핵산이 코딩하는 아미노산이 동일하게 남아 있거나 단지 보존적 치환을 포함하는 한, 변화될 수 있다. 특정 실시양태에서, **도 7**에서 CD8 구축물 2의 각각의 요소의 순서는 동일하게 남아 있지만, 각각의 개별적인 요소의 서열은 코딩된 단백질의 기능이 실질적으로 변화되지 않은 채 남아 있는 한, 변화될 수 있다.

[0102] 특정 실시양태에서, CD8 산물 3은 네오TCR 및 CD8 β 세포내 도메인을 갖는 CD8 α를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물 3은 네오TCR, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인의 발현을 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물 3은 CD8 α 신호 펩티드의 발현을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물 3은 **도 3c**에 제시된 번역된 요소를 포함한다. 비-제한적인 예시적인 실시양태에서, CD8 산물 3은 네오TCR, CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 각각의 요소의 기능을 보존하거나 실질적으로 보존하는 CD8 α 신호 펩티드, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인의 서열 변형이 이루어질 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 서열 변형은 아미노산의 보존적 치환이다.

[0103] 비-제한적 실시양태에서, CD8 산물 3은 **도 8**에 제공된 CD8 구축물 3으로부터 제조된다. 특정 실시양태에서, **도 8**에 제공된 CD8 구축물 3의 서열은 CD8 α 신호 펩티드, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인의 번역이 보존된 기능을 갖는 각각의 요소를 남기는 한, 임의의 수의 방식으로 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, **도 8**에서 CD8 구축물 3의 각각의 요소의 순서는 동일하게 남아 있지만, 각각의 개별적인 요소의 서열은 핵산이 코딩하는 아미노산이 동일하게 남아 있거나 단지 보존적 치환을 포함하는 한, 변화될 수 있다. 특정 실시양태에서, **도 8**에서 CD8 구축물 3의 각각의 요소의 순서는 동일하게 남아 있지만, 각각의 개별적인 요소의 서열은 코딩된 단백질의 기능이 실질적으로 변화되지 않은 채 남아 있는 한, 변화될 수 있다.

[0104] 특정 실시양태에서, CD8 산물 4는 네오TCR 및 CD4 세포내 도메인을 갖는 CD8 α 동종이량체를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물 4는 네오TCR, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인의 발현을 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물 4는 CD8 α 신호 펩티드의 발현을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물 4는 **도 3d**에 제시된 번역된 요소를 포함한다. 비-제한적인 예시적인 실시양태에서, CD8 산물 4는 네오TCR, CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 각각의 요소의 기능을 보존하거나 실질적으로 보존하는 CD8 α 신호 펩티드, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인의 서열 변형이 이루어질 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 서열 변형은 아미노산의 보존적 치환이다.

[0105] 비-제한적 실시양태에서, CD8 산물 4는 **도 9**에 제공된 CD8 구축물 4로부터 제조된다. 특정 실시양태에서, **도 9**에 제공된 CD8 구축물 4의 서열은 CD8 α 신호 펩티드, CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인의 번역이 보존된 기능을 갖는 각각의 요소를 남기는 한, 임의의 수의 방식으로 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, **도 9**에서 CD8 구축물 4의 각각의 요소의 순서는 동일하게 남아 있지만, 각각의 개별적인 요소

의 서열은 핵산이 코딩하는 아미노산이 동일하게 남아 있거나 단지 보존적 치환을 포함하는 한, 변화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 도 9에서 CD8 구축물 4의 각각의 요소의 순서는 동일하게 남아 있지만, 각각의 개별적인 요소의 서열은 코딩된 단백질의 기능이 실질적으로 변화되지 않은 채 남아 있는 한, 변화될 수 있다.

[0106] 특정 실시양태에서, CD8 산물은 TET2 녹아웃 또는 TET2 녹다운을 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 세포는 비-바이러스 방법을 사용하여 TET2 유전자를 녹아웃시키도록 추가로 조작된다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 세포는 바이러스 방법을 사용하여 TET2 유전자를 녹아웃시키도록 추가로 조작된다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 세포는 비-바이러스 방법을 사용하여 T 세포 존속과 연관된 유전자의 기능을 낮아짓시키거나, 녹다운시키거나, 변형시킴으로써 T 세포 존속을 증가시키도록 추가로 조작된다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 세포는 바이러스 방법을 사용하여 T 세포 존속과 연관된 유전자의 기능을 낮아짓시키거나, 녹다운시키거나, 변형시킴으로써 T 세포 존속을 증가시키도록 추가로 조작된다.

[0107] 일부 실시양태에서, CD8 산물은 바이러스 방법을 사용하여 네오TCR 및 CD8 구축물을 발현하도록 조작된 세포를 포함한다 (즉, CD8 바이러스 산물). 특정 실시양태에서, CD8 바이러스 산물의 세포는 비-바이러스 방법을 사용하여 TET2 유전자를 녹아웃시키도록 추가로 조작된다. 특정 실시양태에서, CD8 바이러스 산물의 세포는 바이러스 방법을 사용하여 TET2 유전자를 녹아웃시키도록 추가로 조작된다. 특정 실시양태에서, CD8 바이러스 산물의 세포는 비-바이러스 방법을 사용하여 T 세포 존속과 연관된 유전자의 기능을 낮아짓시키거나, 녹다운시키거나, 변형시킴으로써 T 세포 존속을 증가시키도록 추가로 조작된다. 특정 실시양태에서, CD8 바이러스 산물의 세포는 바이러스 방법을 사용하여 T 세포 존속과 연관된 유전자의 기능을 낮아짓시키거나, 녹다운시키거나, 변형시킴으로써 T 세포 존속을 증가시키도록 추가로 조작된다.

[0108] 특정 실시양태에서, 녹아웃되거나, 녹다운되거나, 변형된 기능을 갖는 T 세포 존속 유전자는 T 세포 활성화의 하향조절을 부여하는 유전자이다. 특정 실시양태에서, 녹아웃되거나, 녹다운되거나, 변형된 유전자는 T 세포 기억 기능을 하향조절하는 유전자이다. 특정 실시양태에서, 녹아웃되거나, 녹다운되거나, 변형된 유전자는 T-세포 기능, 증식, 및/또는 생존을 감소시키는 유전자이다.

[0109] 특정 실시양태에서, CD8 산물 및 그의 CD8 세포에 대한 추가의 변형은 종양 미세환경 회복력을 증가시키고, T 세포 활성을 증가시키고, 종양 미세환경 귀소/체류를 증가시키고, T 세포 존속을 증가시키고, T 세포의 이소성 이펙터 기능을 증가시키는 변형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 종양 미세환경 회복력은 음성 환경적 신호를 전환시키는/반대작용하는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, TCR-매개 신호 증진은 T 세포 활성을 증가시키는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 종양 미세환경 귀소/체류는 종양 침윤을 증진시키는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 기능적 T 세포 존속은 대사 및 전사 조절을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 이소성 이펙터 기능은 TCR-유도된 항체, 시토카인, 또는 펩티드 분비를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0110] 특정 실시양태에서, 기능적 T 세포 존속은 본원에 기재된 바와 같은 유전자 조작에 의해, 변형된 T 세포 (본원에 기재된 바와 같은 적어도 네오TCR을 혼입하도록 변형됨)의 기능적 T 세포 존속을 개선시키는 제약 작용제의 공동-투여에 의해, 및 변형된 T 세포 (본원에 기재된 바와 같은 적어도 네오TCR을 혼입하도록 변형됨)의 제조 및 배양 조건에 의해 달성될 수 있다.

[0111] 특정 실시양태에서, 이소성 이펙터 기능을 개선시키는데 사용되는 TCR-유도된 항체는 본원에 기재된 항체 또는 기능적 그의 단편 중 어느 하나이다. 특정 실시양태에서, 이소성 이펙터 기능을 개선시키는데 사용되는 TCR-유도된 시토카인은 천연 발생 시토카인, 변형된 시토카인, 시토카인의 융합 단백질, 또는 이들의 임의의 조합이다. 특정 실시양태에서, TCR-유도된 시토카인은 시토카인이 아니지만, 오히려 내인성 시토카인 생산을 유도하는 다른 보조-인자 또는 발현 요소이다.

[0112] 특정 실시양태에서, CD8 산물 및 그의 CD8 세포에 대한 추가의 변형은 1종 이상의 추가의 유전자 및/또는 기능적 단백질을 녹인시키는 변형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 녹인된 유전자 및/또는 기능적 단백질은 c-Myb, 우성 음성 FAS, FAS 말단절단물, FBXW7, CTP1A, OPA1, GLUT1, CA-STAT5A, 우성 음성 TGFβR, DNMT3a, 우성 음성 PD-1R, 우성 음성 PD-1 또는 PD-L1, 또는 PD-L2, 우성 음성 SHIP-1 단백질, 인테그린, 케모카인 수용체, 시토카인, 및 인터루킨을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 유전자의 우성 음성 형태는 유전자의 길항제인 항체 또는 그의 기능적 단편이다. 예를 들어, 우성 음성 PD-1은 항-PD-1 항체 또는 그의 기능적 단편일 수 있다. 특정 실시양태에서, 임의의 녹인 유전자 및/또는 기능적 단백질은 유전자 및/또는 단백질의 기능적 단편 (말단절단물을 포함하나 이에 제한되지는 않음)이다.

- [0113] 특정 실시양태에서, CD8 산물 및 그의 CD8 세포에 대한 추가의 변형은 1종 이상의 추가의 유전자 및/또는 기능적 단백질을 녹아웃 또는 녹다운시키는 변형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 녹아웃되거나 녹다운된 유전자 및/또는 기능적 단백질은 TET2, IFNGR1, RICTOR, NR4A1, DNMT3A, SUV39H1, PPP2RD, 아테노신 2A 수용체, PP2A3, 및 PP2A4를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0114] 특정 실시양태에서, 기능적 단백질의 발현을 위한 유전자를 녹인시키는 대신, 상이한 유전자는 그렇지 않다면 녹인될 유전자의 발현을 상향조절하는 본원에 기재된 유전자 조작을 통해 조정될 수 있다.
- [0115] 특정 실시양태에서, 유전자를 녹아웃시키거나 녹다운시키는 대신, 상이한 유전자는 그렇지 않다면 녹아웃될 유전자의 발현을 하향조절하는 본원에 기재된 유전자 조작을 통해 조정될 수 있다.
- [0116] CD8 산물 제조 프로세스는 가이드 RNA 서열에 결합된 CRISPR-Cas9 뉴클레아제의 이중 리보핵단백질 종의 전기천공을 수반하며, 각각의 종은 게놈 TCR α 및 게놈 TCR β 로커스를 표적화한다. Cas9 뉴클레아제를 각각의 게놈 로커스에 표적화하는 특이성은 고도로 특이적인 것으로 문헌에 이전에 기재되었다. 각각 COSMID 및 GUIDE-seq를 사용하여, CD8 산물의 포괄적인 시험을 시험관내에서 및 인 실리코 분석에서 수행하여 가능한 오프-타겟 게놈 절단 부위를 조사하였다. 건강한 공여자로부터의 다중 CD8 산물 또는 필적하는 세포 산물을 딥 시퀀싱에 의해 후보 오프-타겟 부위의 절단에 대해 평가하였으며, 이는 선택된 뉴클레아제가 고도로 특이적이라는 공개된 증거를 뒷받침한다.
- [0117] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 CD8 산물은 T 세포, NK 세포, NKT 세포, 대식세포, 조혈 줄기 세포 (HSC), HSC로부터 유래된 세포, 또는 수지상/항원-제시 세포일 수 있다.
- [0118] 특정 실시양태에서, CD8 세포는 "어린" T 세포 표현형을 보존하는 방식으로 확장되어, T 세포의 대다수가 T 기억 줄기 세포 및 T 중심 기억 표현형을 나타내는 CD8 산물을 생성한다.
- [0119] 이들 '어린' 또는 '보다 어린' 또는 덜-분화된 T 세포 표현형은 개선된 그래프팅 잠재성 및 주입 후 연장된 존속을 부여하는 것으로 기재된다. 따라서, 유의하게 '어린' T 세포 표현형으로 이루어진 CD8 산물의 투여는 개선된 그래프팅 잠재성, 주입 후 연장된 존속, 및 신체 전반에 걸쳐 종양 세포를 근절시키는 이펙터 T 세포로의 급속한 분화를 통해, 암을 갖는 환자를 유익하게 할 잠재성을 갖는다.
- [0120] 특정 실시양태에서, CD8 산물의 CD8 세포는 기억 줄기 세포 (Tmsc) 및/또는 중심 기억 세포 (Tcm)를 우세하게 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 CD8 세포의 적어도 25%는 기억 줄기 세포 (Tmsc) 및/또는 중심 기억 세포 (Tcm)를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 CD8 세포의 적어도 30%는 기억 줄기 세포 (Tmsc) 및/또는 중심 기억 세포 (Tcm)를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 CD8 세포의 적어도 35%는 기억 줄기 세포 (Tmsc) 및/또는 중심 기억 세포 (Tcm)를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 CD8 세포의 적어도 40%는 기억 줄기 세포 (Tmsc) 및/또는 중심 기억 세포 (Tcm)를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 CD8 세포의 적어도 45%는 기억 줄기 세포 (Tmsc) 및/또는 중심 기억 세포 (Tcm)를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 CD8 세포의 적어도 50%는 기억 줄기 세포 (Tmsc) 및/또는 중심 기억 세포 (Tcm)를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 CD8 세포의 적어도 55%는 기억 줄기 세포 (Tmsc) 및/또는 중심 기억 세포 (Tcm)를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 CD8 세포의 적어도 60%는 기억 줄기 세포 (Tmsc) 및/또는 중심 기억 세포 (Tcm)를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 CD8 세포의 적어도 65%는 기억 줄기 세포 (Tmsc) 및/또는 중심 기억 세포 (Tcm)를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 CD8 세포의 적어도 70%는 기억 줄기 세포 (Tmsc) 및/또는 중심 기억 세포 (Tcm)를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 CD8 세포의 적어도 75%는 기억 줄기 세포 (Tmsc) 및/또는 중심 기억 세포 (Tcm)를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 CD8 세포의 75% 초과는 기억 줄기 세포 (Tmsc) 및/또는 중심 기억 세포 (Tcm)를 포함한다. Tmsc는 CD45RA+CD62L+, CD28+CD95+, 및 CCR7+CD27+인 세포로서 특징규명된다. Tcm은 CD45RO+CD62L+, CD28+CD95+, 및 CCR7+CD27+CD127+인 세포로서 특징규명된다. Tmsc 및 Tcm 둘 다는 약한 이펙터 T 세포 기능, 왕성한 증식, 왕성한 그래프팅, 및 긴 텔로미어를 갖는 것으로서 특징규명된다.
- [0121] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 CD8 세포는 CD8 구축물을 갖지 않는 세포와 비교하여 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 100%, 약 150%, 약 200%, 약 250%, 약 300%, 약 350%, 약 400%, 약 450%, 또는 약 500%의 개선된 특성 (예를 들어, 살해 활성, 세포 증식, 시토카인의 분비, LCK 친화도, 존속, 종양 침윤 능력)을 나타낸다.
- [0122] **어린 표현형을 갖는 CD8 산물을 제조하는 방법**

- [0123] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 부분적으로 조작된 "어린" T 세포의 제조에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 원래 대상으로부터 수득되거나 이러한 샘플로부터 단리된 항원-특이적 세포를 활성화시키고, 조작하고, 확장시키는 것을 포함하는, 생체외에서 항원-특이적 세포, 예를 들어, T 세포를 제조하는 방법을 포함한다.
- [0124] 특정 실시양태에서, 세포를 활성화시키는 방법은 TCR/CD3 복합체를 활성화시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, 제한 없이, T 세포는 CD3 효능제, CD28 효능제, 또는 이들의 조합과 함께 인큐베이션되고/거나 배양될 수 있다.
- [0125] 특정 실시양태에서, 조작된 활성화된 항원-특이적 세포, 예를 들어, 조작된 활성화된 T 세포는 조작된 활성화된 항원-특이적 세포, 예를 들어, T 세포를 시토카인, 케모카인, 가용성 펩티드, 또는 이들의 조합과 함께 배양함으로써 확장될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조작된 활성화된 항원-특이적 세포, 예를 들어, 조작된 활성화된 T 세포는 1종 이상의 시토카인과 함께 배양될 수 있다. 특정 실시양태에서, 시토카인은 IL2, IL7, IL15, 또는 이들의 조합일 수 있다. 예를 들어, 조작된 활성화된 항원-특이적 세포, 예를 들어, 조작된 활성화된 T 세포는 IL7 및 IL15와 함께 배양될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조작된 활성화된 항원-특이적 세포, 예를 들어, 조작된 활성화된 T 세포 배양과 관련하여 사용된 시토카인은 약 1 pg/ml 내지 약 1 g/ml, 약 1 ng/ml 내지 약 1 g/ml, 약 1 µg/ml 내지 약 1 g/ml, 또는 약 1 mg/ml 내지 약 1g/ml, 및 그 사이에 있는 임의의 값의 농도로 존재할 수 있다.
- [0126] **제약 제제.**
- [0127] CD8 산물의 제약 제제는 세포의 '어린' 표현형을 동결보존된 상태로 보존할 수 있는 용액에서 CD8 세포를 배합함으로써 제조된다. 표 1은 한 이러한 제약 제제의 예를 제공한다. 대안적으로, CD8 산물의 제약 제제는 세포의 '어린' 표현형을 산물을 동결하거나 동결보존할 필요 없이 보존할 수 있는 용액에서 CD8 세포를 배합함으로써 제조될 수 있다 (즉, CD8 산물은 수용액에서 또는 비-동결된/동결보존된 세포 펠렛으로서 유지된다).
- [0128] 추가의 제약상 허용되는 담체, 완충제, 안정화제, 및/또는 보존제는 또한 동결보존 용액 또는 수성 저장 용액 (CD8 산물이 동결보존되지 않는 경우)에 첨가될 수 있다. 크리오스토르, 크리오스토르 CS5, 셀뱅크 (CELLBANKER), 및 DMSO를 임의로 포함하는 주문제작 동결보존 배지를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 동결보존제 및/또는 배지는 CD8 산물을 동결보존하는데 사용될 수 있다.
- [0129] **유전자-편집 방법**
- [0130] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 부분적으로 인간 세포, 예를 들어, 조작된 T 세포 또는 조작된 인간 줄기 세포를 조작하는 방법을 수반한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 부분적으로 인간 세포, 예를 들어, NK 세포, NKT 세포, 대식세포, 조혈 줄기 세포 (HSC), HSC로부터 유래된 세포, 또는 수지상/항원-제시 세포를 조작하는 방법을 수반한다. 특정 실시양태에서, 이러한 조작은 게놈 편집을 수반한다. 예를 들어 (그러나 제한은 아님), 이러한 게놈 편집은 1개 이상의 내인성 로커스, 예를 들어, TCR 알파 (TCR α) 로커스 및 TCR 베타 (TCR β) 로커스를 표적화하는 뉴클레아제로 달성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제는 내인성 표적 서열에서 단일-가닥 DNA Nick 또는 이중-가닥 DNA 파단을 생성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제는 게놈의 코딩 또는 비-코딩 부분, 예를 들어, 엑손, 인트론을 표적화할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 뉴클레아제는 귀소 엔도뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 메가TAL 뉴클레아제, 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 아연-핑거 뉴클레아제 (ZFN), 및 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문구조 반복부 (CRISPR)/Cas 뉴클레아제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제는 자체가 예를 들어, 아미노산 치환 및/또는 결실의 도입을 통해, 커팅 활성의 효율을 증가시키도록 조작될 수 있다.
- [0131] 특정 실시양태에서, CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템은 인간 세포를 조작하는데 사용된다. 특정 실시양태에서, CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템은 Cas 뉴클레아제, 및 Cas 뉴클레아제를 내인성 표적 서열에 동원하는 1개 이상의 RNA, 예를 들어, 단일 가이드 RNA를 포함한다. 특정 실시양태에서, Cas 뉴클레아제 및 RNA는 세포에서 예를 들어 상이한 벡터 또는 조성물을 사용하여 별개로, 또는 예를 들어, 폴리시스트론성 구축물 또는 단일 단백질-RNA 복합체에서 함께 도입된다. 특정 실시양태에서, Cas 뉴클레아제는 Cas9 또는 Cas12a이다. 특정 실시양태에서, Cas9 폴리펩티드는 제한 없이, 스트렙토코쿠스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*) 또는 네이세리아 메넳기티디스 (*Neisseria meningitidis*)를 포함하는 박테리아 종으로부터 수득된다. CRISPR/Cas 시스템의 추가의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 그것이 교시하는 전부에 대해 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Adli, Mazhar, "The CRISPR tool kit for genome editing and beyond." Nature communications vol. 9,1 1911 (2018)]을 참조한다.

- [0132] 특정 실시양태에서, 게놈 편집은 면역학적 반응을 조절하는 1개 이상의 게놈 로커스에서 일어난다. 특정 실시양태에서, 로커스는 제한 없이, TCR 알파 (TCR α) 로커스, TCR 베타 (TCR β) 로커스, TCR 감마 (TCR γ), 및 TCR 델타 (TCR δ)를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 구축물을 삽입하기 위한 로커스는 게놈의 어디에나 있다. 특정 실시양태에서, CD8 구축물을 삽입하기 위한 로커스는 TRAC 로커스이다. 특정 실시양태에서, CD8 구축물을 삽입하기 위한 로커스는 2개의 TRBC 로커스 중 하나이다. 특정 실시양태에서, CD8 구축물을 삽입하기 위한 로커스는 TRAC 로커스 또는 TRAB 로커스 이외의 로커스이다. 특정 실시양태에서, CD8 구축물을 삽입하기 위한 로커스는 유전자 로커스 내로 삽입되며, 여기서 이러한 유전자는 Nick아웃된다. 비-제한적 예로서, CD8 산물의 목적하는 표현형이 네오TCR의 발현, CD8 구축물의 발현, 및 TET2 유전자 또는 AAVS1 유전자의 Nick아웃인 경우, CD8 구축물은 TET2 로커스 또는 AAVS1 로커스에서 삽입될 수 있다. 특정 실시양태에서, CD8 구축물의 삽입은 네오TCR 삽입과 나란하다. 특정 실시양태에서, CD8 구축물의 삽입은 네오TCR 삽입과는 별개의 로커스이다.
- [0133] 특정 실시양태에서, 게놈 편집은 비-바이러스 전달 시스템을 사용함으로써 수행된다. 예를 들어, 핵산 분자는 핵산을 리포펙션 (Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987; Ono et al., Neuroscience Letters 17:259, 1990; Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger et al., Methods in Enzymology 101:512, 1983), 아시알로로소퓨코이드-폴리리신 접합 (Wu et al., Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu et al., Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989)의 존재 하에서, 또는 외과적 조건 하에서의 미세-주사에 의해 (Wolff et al., Science 247:1465, 1990) 투여함으로써 세포 내로 도입될 수 있다. 유전자 전달을 위한 다른 비-바이러스 수단은 인산칼슘, DEAE 덱스트란, 전기천공, 및 원형질체 용해를 사용한 시험관내에서의 형질감염을 포함한다. 리포솜은 또한 세포 내로의 DNA의 전달을 위해 잠재적으로 유익할 수 있다. 대상체의 질환에 걸린 조직 내로의 정상 유전자의 이식은 또한 정상 핵산을 생체외에서 배양가능한 세포 유형 (예를 들어, 자가 또는 이종 1차 세포 또는 그의 자손) 내로 전달하고, 그 후 세포 (또는 그의 후손)를 표적화된 조직 내로 주사하거나, 전신적으로 주사함으로써 달성될 수 있다.
- [0134] 특정 실시양태에서, 게놈 편집은 바이러스 전달 시스템을 사용함으로써 수행된다. 특정 실시양태에서, 바이러스 방법은 표적화된 통합 (AAV를 포함하나 이에 제한되지는 않음) 및 무작위 통합 (렌티바이러스 접근법을 포함하나 이에 제한되지는 않음)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 바이러스 전달은 뉴클레아제의 통합 없이 달성될 것이다. 이러한 실시양태에서, 바이러스 전달 시스템은 렌티플래쉬(Lentiflash) 또는 또 다른 유사한 전달 시스템일 수 있다.
- [0135] **상동성 재조합 주형**
- [0136] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 상동성 재조합 (HR) 주형 핵산 서열을 세포의 내인성 로커스 내로 도입하고 재조합하는 것에 의한 세포의 게놈 편집을 제공한다. 특정 실시양태에서, HR 주형 핵산 서열은 선형이다. 특정 실시양태에서, HR 주형 핵산 서열은 원형이다. 특정 실시양태에서, 원형 HR 주형은 플라스미드, 미니서클, 또는 나노플라스미드일 수 있다. 특정 실시양태에서, HR 주형 핵산 서열은 제1 및 제2 상동성 아암을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상동성 아암은 약 300개 염기 내지 약 2,000개 염기의 것일 수 있다. 예를 들어, 각각의 상동성 아암은 1,000개 염기일 수 있다. 특정 실시양태에서, 상동성 아암은 세포의 제1 및 제2 내인성 서열에 대해 상동성일 수 있다. 특정 실시양태에서, 내인성 로커스는 TCR 로커스이다. 예를 들어, 제1 및 제2 내인성 서열은 TCR 알파 로커스 또는 TCR 베타 로커스 내에 있다. 특정 실시양태에서, HR 주형은 TCR 유전자 서열을 포함한다. 비-제한적 실시양태에서, TCR 유전자 서열은 환자 특이적 TCR 유전자 서열이다. 비-제한적 실시양태에서, TCR 유전자 서열은 종양-특이적이다. 비-제한적 실시양태에서, TCR 유전자 서열은 그의 내용이 본원에 참조로 포함되는 PCT/US2020/017887에 기재된 방법을 사용하여 확인되고 획득될 수 있다. 특정 실시양태에서, HR 주형은 TCR 알파 유전자 서열 및 TCR 베타 유전자 서열을 포함한다.
- [0137] 특정 실시양태에서, HR 주형은 폴리시스트론성 폴리뉴클레오티드이다. 특정 실시양태에서, HR 주형은 유연성 폴리펩티드 서열 (예를 들어, Gly-Ser-Gly 서열)을 코딩하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, HR 주형은 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 코딩하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, HR 주형은 2A 펩티드 (예를 들어, P2A, T2A, E2A, 및 F2A)를 포함한다. HR 주형 핵산 및 그의 세포를 변형시키는 방법에 대한 추가의 정보는 그의 내용이 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 출원 번호 PCT/US2018/058230에서 발견될 수 있다.
- [0138] **치료 방법**
- [0139] 본 개시된 대상은 면역 반응의 유도 및/또는 증가를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 유도하고/거나 증가시키는 방법을 제공한다. CD8 산물은 대상체에서 암을 치료하고/거나 예방하는데 사용될 수 있다. CD8 산물은 암을 앓고 있는 대상체의 생존을 연장시키는데 사용될 수 있다. CD8 산물은 또한 대상체에서 암을 치료하고/거

나 예방하는데 사용될 수 있다. CD8 산물은 또한 대상체에서 종양 부담을 감소시키는데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 유효량으로 CD8 산물 또는 이를 포함하는 조성물 (예를 들어, 제약 조성물)을 투여하여, 기존의 상태의 경감 또는 재발의 방지인 목적하는 효과를 달성하는 것을 포함한다. 치료를 위해, 투여되는 양은 목적하는 효과를 생성하는데 있어서 유효한 양이다. 유효량은 하나 또는 일련의 투여로 제공될 수 있다. 유효량은 볼루스로 또는 연속적 관류에 의해 제공될 수 있다.

[0140] 특정 실시양태에서, CD8 산물은 바이러스성 또는 박테리아성 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, CD8 산물은 자가면역 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0141] 특정 실시양태에서, CD8 산물의 유효량은 IV 투여를 통해 전달된다. 특정 실시양태에서, CD8 산물은 단일 투여로 IV 투여를 통해 전달된다. 특정 실시양태에서, CD8 산물은 다중 투여로 IV 투여를 통해 전달된다. 특정 실시양태에서, CD8 산물은 2회 이상의 투여로 IV 투여를 통해 전달된다. 특정 실시양태에서, CD8 산물은 2회의 투여로 IV 투여를 통해 전달된다. 특정 실시양태에서, CD8 산물은 3회의 투여로 IV 투여를 통해 전달된다.

[0142] 본 개시된 대상은 대상체에서 암을 치료하고/거나 예방하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 방법은 유효량의 CD8 산물을 암을 갖는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0143] 암의 비-제한적 예는 혈액암 (예를 들어 백혈병, 림프종, 및 골수종), 난소암, 유방암, 방광암, 뇌암, 결장암, 장암, 간암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 피부 암, 위암, 교모세포종, 인후암, 흑색종, 신경모세포종, 선암종, 신경아교종, 연조직 육종, 및 다양한 암종 (전립선 및 소세포 폐암을 포함함)을 포함한다. 적합한 암종은 성상세포종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 희소돌기아교세포종, 뇌실막세포종, 수모세포종, 원시 신경 외배엽 종양 (PNET), 연골육종, 골원성 육종, 췌장 관 선암종, 소 및 대 세포 폐 선암종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 편평 세포 암종, 기관지폐포암종, 상피 선암종, 및 그의 간 전이, 림프관육종, 림프관내피육종, 간암, 담관암종, 윤활막종, 중피종, 유잉 종양, 횡문근육종, 결장 암종, 기저 세포 암종, 한선 암종, 유두상 암종, 피지선 암종, 유두상 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신세포 암종, 담관 암종, 융모막암종, 고환종, 배아 암종, 윌름스 종양, 고환 종양, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경 집종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 백혈병, 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린 혈증, 및 중쇄 질환, 유방 종양, 예컨대 도관 및 소엽 선암종, 자궁 경부의 편평 및 선암종, 자궁 및 난소 상피 암종, 전립선 선암종, 방광의 이행 편평 세포 암종, B 및 T 세포 림프종 (결절성 및 미만성) 형질세포종, 급성 및 만성 백혈병, 악성 흑색종, 연조직 육종 및 평활근육종을 포함하나 이에 제한되지는 않는 종양학의 분야에 공지된 임의의 것을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 신생물은 혈액암 (예를 들어 백혈병, 림프종, 및 골수종), 난소암, 전립선암, 유방암, 방광암, 뇌암, 결장암, 장암, 간암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 위암, 교모세포종, 및 인후암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 본 개시된 어린 T 세포 및 이를 포함하는 조성물은 통상적인 치료 개입으로 처리할 수 없는 혈액암 (예를 들어, 백혈병, 림프종, 및 골수종) 또는 난소암을 치료하고/거나 예방하는데 사용될 수 있다.

[0144] 특정 실시양태에서, 신생물은 고형 암 또는 고형 종양이다. 특정 실시양태에서, 고형 종양 또는 고형 암은 교모세포종, 전립선 선암종, 신장 유두상 세포 암종, 육종, 난소암, 췌장 선암종, 직장 선암종, 결장 선암종, 식도 암종, 자궁 체부 자궁내막모양 암종, 유방암, 피부 피부 흑색종, 폐 선암종, 위 선암종, 자궁경부 및 자궁경관내 암, 신장 투명 세포 암종, 고환 배 세포 종양, 및 공격성 B-세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0145] 대상체는 질환의 진행된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 치료 목적은 질환 진행의 완화 또는 반전, 및/또는 부작용의 개선을 포함할 수 있다. 대상체는 그들이 이미 치료된 상태의 병력을 가질 수 있으며, 이 경우 치료 목적은 전형적으로 재발의 위험을 감소시키거나 지연시키는 것을 포함할 것이다.

[0146] 요법을 위한 적합한 인간 대상체는 전형적으로 임상적 기준에 의해 구별될 수 있는 2개의 치료 군을 포함한다. "진행된 질환" 또는 "높은 종양 부담"을 갖는 대상체는 임상적으로 측정가능한 종양을 갖는 것들이다. 임상적으로 측정가능한 종양은 종양 질량에 기반하여 검출될 수 있는 것이다 (예를 들어, 촉진, CAT 스캔, 초음파도, 유방촬영술 또는 X-선에 의해; 그들 자신 상의 양성 생화학적 또는 조직병리학적 마커는 이 집단을 확인하는데 불충분함). 제약 조성물은 그들의 상태를 경감시킬 목적으로 항-종양 반응을 유발하기 위해 이들 대상체에게 투여된다. 이상적으로, 종양 질량의 감소는 결과로서 일어나지만, 임의의 임상적 개선은 유익을 구성한다. 임상적 개선은 진행의 감소된 위험 또는 속도 또는 종양의 병리학적 결과의 감소를 포함한다.

[0147] **제조품**

- [0148] CD8 산물은 제조품과 조합으로 사용될 수 있다. 이러한 제조품은 증식성 장애 (예를 들어, 암)의 예방 또는 치료에 유용할 수 있다. 제조품의 예는 용기 (예를 들어, 주입 백, 보틀, 저장 용기, 플라스크, 바이알, 시린지, 튜브, 및 IV 용액 백) 및 용기 상의 또는 그와 연관된 표지 또는 패키지 삽입물을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 용기는 CD8 산물 내의 CD8 세포의 저장 및 보존을 위해 허용되는 임의의 물질로 제조될 수 있다. 특정 실시양태에서, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 천공가능한 스톱퍼를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다. 예를 들어, 용기는 크리오맥스(CryoMACS) 동결 백일 수 있다. 표지 또는 패키지 삽입물은 CD8 산물이 선택의 상태 및 기원의 환자를 치료하는데 사용됨을 지시한다. 환자는 CD8 산물의 용기 상에서 확인되는데, 이는 CD8 산물이 자가 세포로부터 제조되고, 환자-특이적 및 개별화된 치료로서 조작되기 때문이다.
- [0149] 제조품은 1) 그 안에 함유된 CD8 산물을 갖는 제1 용기를 포함할 수 있다.
- [0150] 제조품은 1) 그 안에 함유된 CD8 산물을 갖는 제1 용기; 및 2) 그 안에 함유된 제1 용기와 동일한 CD8 산물을 갖는 제2 용기를 포함할 수 있다. 임의로, 제1 및 제2 용기와 동일한 CD8 산물을 갖는 추가의 용기가 제조되고 만들어질 수 있다. 임의로, 상이한 세포독성제 또는 다르게는 치료제를 포함하는 조성물을 함유하는 추가의 용기는 또한 상기 기재된 용기와 조합될 수 있다.
- [0151] 제조품은 1) 그 안에 함유된 CD8 산물을 갖는 제1 용기; 및 2) 그 안에 함유된 조성물을 갖는 제2 용기를 포함할 수 있으며, 여기서 조성물은 추가의 세포독성제 또는 다르게는 치료제를 포함한다.
- [0152] 제조품은 1) 그 안에 함유된 2종의 CD8 산물을 갖는 제1 용기; 및 2) 그 안에 함유된 조성물을 갖는 제2 용기를 포함할 수 있으며, 여기서 조성물은 추가의 세포독성제 또는 다르게는 치료제를 포함한다.
- [0153] 제조품은 1) 그 안에 함유된 CD8 산물을 갖는 제1 용기; 2) 그 안에 함유된 제2 CD8 산물을 갖는 제2 용기; 및 3) 임의로 그 안에 함유된 조성물을 갖는 제3 용기를 포함할 수 있으며, 여기서 조성물은 추가의 세포독성제 또는 다르게는 치료제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 및 제2 CD8 산물은 상이한 CD8 산물이다. 특정 실시양태에서, 제1 및 제2 CD8 산물은 동일한 CD8 산물이다.
- [0154] 제조품 1) 그 안에 함유된 3종의 CD8 산물을 갖는 제1 용기; 및 2) 임의로 그 안에 함유된 조성물을 갖는 제2 용기를 포함할 수 있으며, 여기서 조성물은 추가의 세포독성제 또는 다르게는 치료제를 포함한다.
- [0155] 제조품은 1) 그 안에 함유된 CD8 산물을 갖는 제1 용기; 2) 그 안에 함유된 제2 CD8 산물을 갖는 제2 용기; 3) 그 안에 함유된 제3 CD8 산물을 갖는 제3 용기; 및 4) 임의로 그 안에 함유된 조성물을 갖는 제4 용기를 포함할 수 있으며, 여기서 조성물은 추가의 세포독성제 또는 다르게는 치료제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1, 제2, 및 제3 CD8 산물은 상이한 CD8 산물이다. 특정 실시양태에서, 제1, 제2, 및 제3 CD8 산물은 동일한 CD8 산물이다. 특정 실시양태에서, 제1, 제2, 및 제3 CD8 산물 중 2개는 동일한 CD8 산물이다.
- [0156] 제조품은 1) 그 안에 함유된 4종의 CD8 산물을 갖는 제1 용기; 및 2) 임의로 그 안에 함유된 조성물을 갖는 제2 용기를 포함할 수 있으며, 여기서 조성물은 추가의 세포독성제 또는 다르게는 치료제를 포함한다.
- [0157] 제조품은 1) 그 안에 함유된 CD8 산물을 갖는 제1 용기; 2) 그 안에 함유된 제2 CD8 산물을 갖는 제2 용기; 3) 그 안에 함유된 제3 CD8 산물을 갖는 제3 용기; 4) 그 안에 함유된 제4 CD8 산물을 갖는 제4 용기; 및 5) 임의로 그 안에 함유된 조성물을 갖는 제5 용기를 포함할 수 있으며, 여기서 조성물은 추가의 세포독성제 또는 다르게는 치료제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1, 제2, 제3, 및 제4 CD8 산물은 상이한 CD8 산물이다. 특정 실시양태에서, 제1, 제2, 제3, 및 제4 CD8 산물은 동일한 네오TCR 산물이다. 특정 실시양태에서, 제1, 제2, 제3, 및 제4 CD8 산물 중 2개는 동일한 네오TCR 산물이다. 특정 실시양태에서, 제1, 제2, 제3, 및 제4 CD8 산물 중 3개는 동일한 CD8 산물이다.
- [0158] 제조품은 1) 그 안에 함유된 5종 이상의 CD8 산물을 갖는 제1 용기; 및 2) 임의로 그 안에 함유된 조성물을 갖는 제2 용기를 포함할 수 있으며, 여기서 조성물은 추가의 세포독성제 또는 다르게는 치료제를 포함한다.
- [0159] 제조품은 1) 그 안에 함유된 CD8 산물을 갖는 제1 용기; 2) 그 안에 함유된 제2 CD8 산물을 갖는 제2 용기; 3) 그 안에 함유된 제3 CD8 산물을 갖는 제3 용기; 4) 그 안에 함유된 제4 CD8 산물을 갖는 제4 용기; 5) 그 안에 함유된 제5 CD8 산물을 갖는 제5 용기; 6) 임의로 그 안에 함유된 제6 이상의 CD8 산물을 갖는 제6 이상의 추가의 용기; 및 7) 임의로 그 안에 함유된 조성물을 갖는 추가의 용기를 포함할 수 있으며, 여기서 조성물은 추가의 세포독성제 또는 다르게는 치료제를 포함한다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 모든 용기는 상이한 CD8 산물이다. 특정 실시양태에서, CD8 산물의 모든 용기는 동일한 CD8 산물이다. 특정 실시양태에서, 환자의 종양 샘플(들)에서 검출가능한 CD8의 이용가능성, 환자에 대한 다중 CD8 산물을 가질 필요성 및/또는 목적, 및 1개

이상의 용기를 요구하거나 그로부터 이익을 얻을 수 있는 어느 하나의 CD8 산물의 이용가능성에 기반하여 5개 이상의 용기에 동일하거나 상이한 CD8 산물의 임의의 조합이 있을 수 있다.

[0160] 제조품은 1) 그 안에 함유된 CD8 산물을 갖는 제1 용기; 2) 그 안에 함유된 제2 CD8 산물을 갖는 제2 용기; 및 3) 그 안에 함유된 제3 CD8 산물을 갖는 제3 용기를 포함할 수 있다.

[0161] 제조품은 1) 그 안에 함유된 CD8 산물을 갖는 제1 용기; 2) 그 안에 함유된 제2 CD8 산물을 갖는 제2 용기; 3) 그 안에 함유된 제3 CD8 산물을 갖는 제3 용기; 및 4) 임의로 그 안에 함유된 제4 CD8 산물을 갖는 제4 용기를 포함할 수 있다.

[0162] 제조품은 1) 그 안에 함유된 CD8 산물을 갖는 제1 용기; 2) 그 안에 함유된 제2 CD8 산물을 갖는 제2 용기; 3) 그 안에 함유된 제3 CD8 산물을 갖는 제3 용기; 4) 그 안에 함유된 제4 CD8 산물을 갖는 제4 용기; 및 5) 임의로 그 안에 함유된 제4 CD8 산물을 갖는 제5 용기를 포함할 수 있다.

[0163] 제조품은 그 안에 함유된 1종의 CD8 산물을 갖는 용기를 포함할 수 있다. 제조품은 그 안에 함유된 2종의 CD8 산물을 갖는 용기를 포함할 수 있다. 제조품은 그 안에 함유된 3종의 CD8 산물을 갖는 용기를 포함할 수 있다. 제조품은 그 안에 함유된 4종의 CD8 산물을 갖는 용기를 포함할 수 있다. 제조품은 그 안에 함유된 5종의 CD8 산물을 갖는 용기를 포함할 수 있다.

[0164] 제조품은 1) 그 안에 함유된 1종의 CD8 산물을 갖는 제1 용기, 및 2) 그 안에 함유된 2종의 CD8 산물을 갖는 제2 용기를 포함할 수 있다. 제조품은 1) 그 안에 함유된 2종의 CD8 산물을 갖는 제1 용기, 및 2) 그 안에 함유된 1종의 CD8 산물을 갖는 제2 용기를 포함할 수 있다. 상기 예에서, 1종 이상의 추가의 CD8 산물을 포함하는 제3 및/또는 제4 용기는 제조품에 포함될 수 있다. 추가적으로, 1종 이상의 추가의 CD8 산물을 포함하는 제5 용기는 제조품에 포함될 수 있다.

[0165] 더욱이, 본원에 기재된 CD8 산물의 임의의 용기는 다중 시점의 투여를 위해 및/또는 환자에 대한 적절한 용량에 기반하여 2, 3, 또는 4개의 별개의 용기로 분할될 수 있다.

[0166] 특정 실시양태에서, CD8 산물은 키트에 제공된다. 키트는 비-제한적 예로서, 패키지 삽입물(들), 표지, CD8 산물(들)을 사용하는 것에 대한 지시서, 시린지, 처리 지시서, 투여 지시서, 튜빙, 바늘, 및 임상외가 CD8 산물(들)을 적절하게 투여하기 위해 필요로 할 다른 것을 함유할 수 있다.

[0167] 치료 조성물 및 제조 방법

[0168] 본원에 기재된 바와 같이, CD8 산물의 우수 제조 관행 (GMP) 제조를 위한 플라스미드 DNA-매개 정확성 게놈 조작 프로세스가 개발되었다. 환자-특이적 네오TCR의 표적화된 통합은 CRISPR 엔도뉴클레아제 리보핵단백질 (RNP)을 플라스미드 DNA에 의해 코딩된 개인화된 네오TCR 유전자 카세트와 함께 전기천공함으로써 달성되었다. 네오TCR에 추가로, CD8 구축물은 그들을 네오TCR 벡터 내로 혼입하고, 이어서 상기 기재된 바와 같은 CRISPR 엔도뉴클레아제 리보핵단백질 (RNP)로 전기천공함으로써 삽입되었다.

[0169] CD8 산물은 임상적 제조 프로세스를 사용하여 약물 산물로 제제화될 수 있다. 이 프로세스 하에서, CD8 산물은 크리오맥스 동결 백에서 동결보존된다. 1개 이상의 백은 환자 필요에 따라 각각의 환자에 대한 부위에 선적될 수 있다. 산물은 그 환자의 종양 세포의 표면 상에 배타적으로 존재하는 내인성 HLA 수용체 중 하나에 복합체화된 네오에피토프를 표적화하는 1종 이상의 자가 네오TCR을 발현하도록 정확성 게놈 조작된 분리반출술-유래, 환자-자가, CD8 및 CD4 T 세포로 구성된다.

[0170] 최종 산물은 5% 디메틸 술폭시드 (DMSO), 인간 혈청 알부민, 및 플라스마-라이트를 함유할 것이다. 최종 세포 산물은 표 2에 제공된 성분의 목록을 함유할 것이다.

표 2. CD8 산물의 조성

성분	사양/등급
종 유핵 네오TCR 세포	cGMP 제조됨
플라스마-라이트 A	USP
0.02 - 0.08 M 나트륨 카프릴레이트 및 나트륨 트립토판네이트 중 인간 혈청 알부민	USP
크리오스토르 CS10	USP 등급 물질로 cGMP 제조됨

조성물 및 벡터

본 개시된 대상은 본원에 개시된 세포 (예를 들어, 면역반응성 세포)를 포함하는 조성물을 제공한다.

특정 실시양태에서, 본 개시된 대상은 본원에 개시된 네오TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 핵산 조성물은 본원에 개시된 CD8 구축물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 이러한 핵산 조성물을 포함하는 세포가 제공된다.

특정 실시양태에서, 핵산 조성물은 본원에 개시된 네오TCR에 작동가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 핵산 조성물은 본원에 개시된 CD8 구축물에 작동가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함한다.

특정 실시양태에서, 프로모터는 내인성 또는 외인성이다. 특정 실시양태에서, 외인성 프로모터는 신장 인자 (EF)-1 프로모터, CMV 프로모터, SV40 프로모터, PGK 프로모터, 긴 말단 반복부 (LTR) 프로모터 및 메탈로티오네인 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다. 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 NFAT 전사 반응 요소 (TRE) 프로모터, CD69 프로모터, CD25 프로모터, IL-2 프로모터, IL-12 프로모터, p40 프로모터, 및 Bcl-xL 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

조성물 및 핵산 조성물은 관련 기술분야에 공지된 또는 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의해 대상체에게 투여되고/거나 세포 내로 전달될 수 있다. 세포 (예를 들어, T 세포)의 유전자 변형은 실질적으로 균질한 세포 조성물을 제조할 DNA 구축물로 형질도입함으로써 달성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터 (감마-레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터 중 어느 하나)는 세포 내로의 DNA 구축물의 도입을 위해 사용된다. 비-바이러스 벡터는 또한 사용될 수 있다.

가능한 형질도입 방법은 또한 예를 들어, 문헌 [Bregni, *et al.* (1992) *Blood* 80:1418-1422]의 방법에 의한 생산자 세포와의 세포의 직접적 공동-배양, 또는 예를 들어, 문헌 [Xu, *et al.* (1994) *Exp. Hemat.* 22:223-230]; 및 [Hughes, *et al.* (1992) *J. Clin. Invest.* 89:1817]의 방법에 의해 적절한 성장 인자 및 다가양이온과 함께 또는 없이 바이러스 상청액 단독으로 또는 농축된 벡터 스톱과 함께 배양하는 것을 포함한다.

다른 형질도입 바이러스 벡터는 세포를 변형시키는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 선택된 벡터는 높은 효율의 감염 및 안정한 통합 및 발현을 나타낸다 (예를 들어, 문헌 [Cayouette *et al.*, *Human Gene Therapy* 8:423-430, 1997]; [Kido *et al.*, *Current Eye Research* 15:833-844, 1996]; [Bloomer *et al.*, *Journal of Virology* 71:6641-6649, 1997]; [Naldini *et al.*, *Science* 272:263-267, 1996]; 및 [Miyoshi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:10319, 1997] 참조). 사용될 수 있는 다른 바이러스 벡터는 예를 들어, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 및 아데노-연관 바이러스 벡터, 우두 바이러스, 소 유두종 바이러스, 또는 포진 바이러스, 예컨대 엡스타인-바르 바이러스를 포함한다 (또한, 예를 들어, 문헌 [Miller, *Human Gene Therapy* 15-14, 1990]; [Friedman, *Science* 244:1275-1281, 1989]; [Eglitis *et al.*, *BioTechniques* 6:608-614, 1988]; [Tolstoshev *et al.*, *Current Opinion in Biotechnology* 1:55-61, 1990]; [Sharp, *The Lancet* 337:1277-1278, 1991]; [Cornetta *et al.*, *Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 36:311-322, 1987]; [Anderson, *Science* 226:401-409, 1984]; [Moen, *Blood Cells* 17:407-416, 1991]; [Miller *et al.*, *Biotechnology* 7:980-990, 1989]; [LeGal La Salle *et al.*, *Science* 259:988-990, 1993]; 및 [Johnson, *Chest* 107:77S- 83S, 1995]의 벡터 참조). 레트로바이러스 벡터는 특히 잘 개발되어 있으며, 임상적 환경에서 사용되었다 (Rosenberg *et al.*, *N. Engl. J. Med* 323:370, 1990; Anderson *et al.*, 미국 특허 번호 5,399,346).

비-바이러스 접근법은 또한 세포의 유전자 변형에 사용될 수 있다. 예를 들어, 핵산 분자는 핵산을 리포펙션 (Feigner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7413, 1987; Ono *et al.*, *Neuroscience Letters* 17:259,

1990; Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger et al., Methods in Enzymology 101:512, 1983), 아시알로오로소뮤코이드-폴리리신 접합 (Wu et al., Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu et al., Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989)의 존재 하에서, 또는 외과적 조건 하에서의 미세-주사에 의해 (Wolff et al., Science 247:1465, 1990) 투여함으로써 세포 내로 도입될 수 있다. 유전자 전달을 위한 다른 비-바이러스 수단은 인산칼슘, DEAE 텍스트란, 전기천공, 및 원형질체 융합을 사용한 시험관내에서의 형질감염을 포함한다. 리포솜은 또한 세포 내로의 DNA의 전달을 위해 잠재적으로 유익할 수 있다. 대상체의 질환에 걸린 조직 내로의 정상 유전자의 이식은 또한 정상 핵산을 생체외에서 배양가능한 세포 유형 (예를 들어, 자가 또는 이종 1차 세포 또는 그의 자손) 내로 전달하고, 그 후 세포 (또는 그의 후손)를 표적화된 조직 내로 주사하거나, 전신적으로 주사함으로써 달성될 수 있다.

[0182] 폴리뉴클레오타이드 요법 방법은 임의의 적합한 프로모터 (예를 들어, 인간 시토크로마비러스 (CMV), 원숭이 바이러스 40 (SV40), 또는 메탈로티오네인 프로모터)로부터 지정되고, 임의의 적절한 포유동물 조절 요소 또는 인트론 (예를 들어 신장 인자 1a 인핸서/프로모터/인트론 구조)에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, 목적하는 경우, 특이적 세포 유형에서 유전자 발현을 우선적으로 지정하는 것으로 공지된 인핸서는 핵산의 발현을 지정하는데 사용될 수 있다. 사용되는 인핸서는 제한 없이, 조직- 또는 세포-특이적 인핸서로서 특장규명된 것들을 포함할 수 있다. 대안적으로, 게놈 클론이 치료 구축물로서 사용되는 경우, 조절은 동족 조절 서열에 의해, 또는 목적하는 경우, 상기 기재된 임의의 프로모터 또는 조절 요소를 포함한 이종 공급원으로부터 유래된 조절 서열에 의해 매개될 수 있다.

[0183] 생성된 세포는 비변형된 세포에 대한 것들과 유사한 조건 하에서 성장될 수 있으며, 그에 의해 변형된 세포는 확장되고 다양한 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0184] **키트**

[0185] 본 개시된 대상은 면역 반응을 유도하고/거나 증진시키고/거나, 대상체에서 암 또는 병원체 감염을 치료하고/거나 예방하기 위한 키트를 제공한다. 특정 실시양태에서, 키트는 본 개시된 세포 또는 이를 포함하는 제약 조성물의 유효량을 포함한다. 특정 실시양태에서, 키트는 멸균 용기를 포함하며; 이러한 용기는 박스, 앰플, 보틀, 바이알, 튜브, 백, 파우치, 블리스터-팩, 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 적합한 용기 형태일 수 있다. 이러한 용기는 플라스틱, 유리, 적층 종이, 금속 호일, 또는 의약을 보유하는데 적합한 다른 물질로 제조될 수 있다. 특정 비-제한적 실시양태에서, 키트는 본 개시된 HR 주형을 코딩하는 단리된 핵산 분자를 포함한다.

[0186] 목적하는 경우, 세포 및/또는 핵산 분자는 세포 또는 핵산 분자를 암 또는 병원체 또는 면역 장애를 갖거나 이를 발달시킬 위험이 있는 대상체에게 투여하는 것에 대한 지시서와 함께 제공된다. 지시서는 일반적으로 암 또는 병원체 감염의 치료 및/또는 예방을 위한 조성물의 사용에 관한 정보를 포함한다. 특정 실시양태에서, 지시서는 하기 중 적어도 하나를 포함한다: 치료제의 설명; 신생물, 병원체 감염, 또는 면역 장애 또는 그의 증상의 치료 또는 예방을 위한 투여 스케줄 및 투여; 예방책; 경고; 적응증; 금기증; 과다-투여량 정보; 유해 반응; 동물 약리학; 임상 연구; 및/또는 참고문헌. 지시서는 용기 상에 직접적으로 인쇄될 수 있거나 (존재하는 경우), 용기에 적용된 표지로서, 또는 별개의 쉬트, 팸플릿, 카드, 또는 용기에 또는 그와 함께 공급된 폴더로서일 수 있다. 생성된 세포는 비변형된 세포에 대한 것들과 유사한 조건 하에서 성장될 수 있으며, 그에 의해 변형된 세포는 확장되고 다양한 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0187] **예시적인 실시양태**

[0188] A. 특정 비-제한적 실시양태에서, 본 개시된 대상은 외인성 T 세포 수용체 (TCR), 및 외인성 CD8을 포함하는 세포를 제공한다.

[0189] A1. 외인성 CD8이 적어도 1종의 단량체를 포함하는 것인 A의 상기 세포.

[0190] A2. 외인성 CD8의 적어도 1종의 단량체가 세포의 도메인, 막횡단 도메인, 세포내 도메인, 그의 단편, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 A1의 상기 세포.

[0191] A3. 세포외 도메인이 CD8 α 세포외 도메인 또는 CD8 β 세포외 도메인을 포함하는 것인 A2의 상기 세포.

[0192] A4. 막횡단 도메인이 CD8 α 막횡단 도메인 또는 CD8 β 막횡단 도메인을 포함하는 것인 A2 또는 A3의 상기 세포.

[0193] A5. 세포내 도메인이 CD8 α 세포내 도메인 또는 CD8 β 세포내 도메인을 포함하는 것인 A2-A4의 상기 세포.

[0194] A6. 세포내 도메인이 CD4 세포내 도메인을 포함하는 것인 A2-A4의 상기 세포.

- [0195] A7. 적어도 1종의 단량체가 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인을 포함하는 것인 A1-A5의 상기 세포.
- [0196] A8. 적어도 1종의 단량체가 CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인을 포함하는 것인 A1-A5의 상기 세포.
- [0197] A9. 적어도 1종의 단량체가 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인을 포함하는 것인 A1-A5의 상기 세포.
- [0198] A10. 적어도 1종의 단량체가 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함하는 것인 A1-A6의 상기 세포.
- [0199] A11. 적어도 1종의 단량체가 신호 펩티드를 포함하는 것인 A1-A10의 상기 세포.
- [0200] A12. 신호 펩티드가 CD8 신호 펩티드인 A11의 상기 세포.
- [0201] A13. 세포외 도메인이 서열식별번호: 140, 또는 서열식별번호: 145에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 A2-A12의 상기 세포.
- [0202] A14. 막횡단 도메인이 서열식별번호: 141, 또는 서열식별번호: 146에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 A2-A13의 상기 세포.
- [0203] A15. 세포내 도메인이 서열식별번호: 142, 서열식별번호: 147, 또는 서열식별번호: 148에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 A2-A14의 상기 세포.
- [0204] A16. 신호 펩티드가 서열식별번호: 139, 또는 서열식별번호: 144에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 A11-A15의 상기 세포.
- [0205] A17. 외인성 CD8이 2A 서열을 포함하는 것인 A-A16의 상기 세포.
- [0206] A18. 외인성 CD8이 링커를 포함하는 것인 A-A17의 상기 세포.
- [0207] A19. 링커가 서열식별번호: 137에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 A18의 상기 세포.
- [0208] A20. 외인성 CD8이 프로테아제 절단 부위를 포함하는 것인 A-A19의 상기 세포.
- [0209] A21. 프로테아제 절단 부위가 푸린 절단 부위인 A-A20의 상기 세포.
- [0210] A22. 외인성 TCR이 환자 유래 TCR인 A-A21의 상기 세포.
- [0211] A23. 외인성 TCR이 신호 서열, 제1 및 제2 2A 서열, 및 TCR 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인 A-A22의 상기 세포.
- [0212] A24. 외인성 TCR이 암 항원을 인식하는 것인 A-A23의 상기 세포.
- [0213] A25. 암 항원이 신생항원인 A24의 상기 세포.
- [0214] A26. 암 항원이 환자 특이적 항원인 A24의 상기 세포.
- [0215] A27. 세포가 1차 세포인 A-A26의 상기 세포.
- [0216] A28. 세포가 환자-유래 세포인 A-A26의 상기 세포.
- [0217] A29. 세포가 림프구인 A-A26의 상기 세포.
- [0218] A30. 세포가 T 세포인 A-A26의 상기 세포.
- [0219] A31. 세포가 어린 T 세포인 A-A26의 상기 세포.
- [0220] A32. 세포가 CD45RA+, CD62L+, CD28+, CD95-, CCR7+, 및 CD27+인 A31의 상기 세포.
- [0221] A33. 세포가 CD45RA+, CD62L+, CD28+, CD95+, CD27+, CCR7+인 A31의 상기 세포.
- [0222] A34. 세포가 CD45RO+, CD62L+, CD28+, CD95+, CCR7+, CD27+, CD127+인 A31의 상기 세포.
- [0223] A35. 세포 존속을 증진시키고/거나 기억 세포 분화를 증진시키는 유전자 변형을 추가로 포함하는 A-A34의 상기 세포.

- [0224] A36. 세포의 살해 활성이 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 살해 활성과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 A-A35의 상기 세포.
- [0225] A37. 항원에의 TCR의 결합 시 세포의 증식이 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 증식과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 A-A36의 상기 세포.
- [0226] A38. 세포에 의한 항원에의 TCR의 결합 시 전염증성 시토카인의 분비가 외인성 CD8을 갖지 않는 세포에 의한 분비와 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 A-A37의 상기 세포.
- [0227] A39. 세포의 LCK 친화도가 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 LCK 친화도와 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 A-A38의 상기 세포.
- [0228] A40. 세포의 존속이 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 존속과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 A-A39의 상기 세포.
- [0229] A41. 세포의 종양 침윤 능력이 외인성 CD8을 갖지 않는 세포의 종양 침윤 능력과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 A-A40의 상기 세포.
- [0230] A42. 외인성 TCR이 CD8-의존성 TCR인 A-A41의 상기 세포.
- [0231] A43. 외인성 TCR이 CD8-비의존성 TCR인 A-A41의 상기 세포.
- [0232] A44. 외인성 CD8이 CD8 구축물 1, CD8 구축물 2, CD8 구축물 3, 또는 CD8 구축물 4에 의해 코딩되는 것인 A-A43의 상기 세포.
- [0233] A45. 외인성 CD8이 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인; CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함하는 것인 A-A43의 상기 세포.
- [0234] A46. 외인성 CD8이 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포외 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148)을 포함하는 것인 A-A43의 상기 세포.
- [0235] B. 특정 비-제한적 실시양태에서, 본 개시된 대상은 세포 내로 상동성 재조합 (HR) 주형 핵산 서열을 도입하며, 여기서 HR 주형은 제1 및 제2 표적 핵산 서열에 대해 상동성인 제1 및 제2 상동성 아암, 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 TCR 유전자 서열, 및 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 CD8 유전자 서열을 포함하는 것인 단계, 및 HR 주형 핵산을 세포의 내인성 로커스 내로 재조합하는 단계를 포함하는, 세포를 변형시키는 방법을 제공한다.
- [0236] B1. HR 주형이 CD8 유전자 서열의 상류에 위치한 제1 2A-코딩 서열, CD8 유전자 서열의 하류 및 TCR 유전자 서열의 상류에 위치한 제2 2A-코딩 서열, 및 TCR 유전자 서열의 하류에 위치한 제3 2A-코딩 서열을 포함하며; 여기서 제1, 제2, 및 제3 2A-코딩 서열은 동일한 아미노산 서열을 코딩하고, 서로에 대해 코돈-분기된 것인 B의 상기 방법.
- [0237] B2. HR 주형이 제1, 제2, 및/또는 제3 2A-코딩 서열의 바로 상류에 위치한 아미노산 서열 Gly Ser Gly를 코딩하는 서열을 포함하는 것인 B 또는 B1의 상기 방법.
- [0238] B3. HR 주형이 제1, 제2, 및/또는 제3 2A-코딩 서열의 상류에 위치한 푸린 절단 부위를 코딩하는 서열을 추가로 포함하는 것인 B1 또는 B2의 상기 방법.
- [0239] B4. HR 주형이 TCR 유전자 서열 및/또는 CD8 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 신호 서열을 코딩하는 서열을 추가로 포함하는 것인 B-B3의 상기 방법.

- [0240] B5. HR 주형이 제3 2A-코딩 서열 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 제2 TCR 서열을 포함하는 것인 B-B4의 상기 방법.
- [0241] B6. HR 주형이 제1 TCR 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 제1 신호 서열을 코딩하는 서열; 및 제2 TCR 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 제2 신호 서열을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 B5의 상기 방법.
- [0242] B7. HR 주형이 제1 CD8 유전자 서열 및 제2 2A-코딩 서열 사이에 위치한 제2 CD8 유전자 서열을 포함하는 것인 B-B6의 상기 방법.
- [0243] B8. 2A 코딩 서열이 제1 및 제2 CD8 유전자 서열 사이에 위치하는 것인 B7의 상기 방법.
- [0244] B9. 아미노산 서열 Gly Ser Gly를 코딩하는 서열이 제1 및 제2 CD8 유전자 서열 사이에 위치하는 것인 B7 또는 B8의 상기 방법.
- [0245] B10. 푸린 절단 부위를 코딩하는 서열이 제1 및 제2 CD8 유전자 서열 사이에 위치하는 것인 B7-B9의 상기 방법.
- [0246] B11. CD8 유전자 서열이 세포외 도메인을 코딩하는 서열, 세포내 도메인을 코딩하는 서열, 세포내 도메인을 코딩하는 서열, 그의 단편, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 B-B10의 상기 방법.
- [0247] B12. 세포외 도메인을 코딩하는 서열이 CD8 α 세포외 도메인 또는 CD8 β 세포외 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 B11의 상기 방법.
- [0248] B13. 막횡단 도메인을 코딩하는 서열이 CD8 α 막횡단 도메인 또는 CD8 β 막횡단 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 B11 또는 B12의 상기 방법.
- [0249] B14. 세포내 도메인을 코딩하는 서열이 CD8 α 세포내 도메인 또는 CD8 β 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 B11-B13의 상기 방법.
- [0250] B15. 세포내 도메인을 코딩하는 서열이 CD4 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 B11-B14의 상기 방법.
- [0251] B16. CD8 유전자 서열이 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 B11-B15의 상기 방법.
- [0252] B17. CD8 유전자 서열이 CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 B11-B15의 상기 방법.
- [0253] B18. CD8 유전자 서열이 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 B11-B15의 상기 방법.
- [0254] B19. CD8 유전자 서열이 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 B11-B15의 상기 방법.
- [0255] B20. HR 주형이 제1 CD8 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 제1 신호 서열을 코딩하는 서열; 및 제2 CD8 유전자 서열의 바로 상류에 위치한 제2 신호 서열을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 B7-B19의 상기 방법.
- [0256] B21. 신호 서열이 CD8 신호 서열, 인간 성장 호르몬 신호 서열, 그의 단편, 또는 이들의 조합인 B4-B20의 상기 방법.
- [0257] B22. HR 주형의 제1 및 제2 상동성 아암이 각각 약 300개 염기 내지 약 2,000개 염기의 길이인 B-B21의 상기 방법.
- [0258] B23. HR 주형의 제1 및 제2 상동성 아암이 각각 약 600개 염기 내지 약 2,000개 염기의 길이인 B-B22의 상기 방법.
- [0259] B24. 외인성 TCR이 환자 유래 TCR인 B-B23의 상기 방법.
- [0260] B25. 외인성 TCR이 신호 서열, 제1 및 제2 2A 서열, 및 TCR 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인 B-B24의 상기 방법.
- [0261] B26. 외인성 TCR이 암 항원을 인식하는 것인 B-B25의 상기 방법.
- [0262] B27. 암 항원이 신생항원인 B26의 상기 방법.

- [0263] B28. 암 항원이 환자 특이적 항원인 B26의 상기 방법.
- [0264] B29. HR 주형이 비-바이러스성인 B-B28의 상기 방법.
- [0265] B30. HR 주형이 원형 DNA인 B-B29의 상기 방법.
- [0266] B31. HR 주형이 선형 DNA인 B-B29의 상기 방법.
- [0267] B32. 도입이 전기천공을 통해 일어나는 것인 B-B31의 상기 방법.
- [0268] B33. 재조합이 뉴클레아제에 의한 내인성 로커스의 절단; 및 상동성 지정 복구에 의한 내인성 로커스 내로의 HR 주형 핵산 서열의 재조합을 포함하는 것인 B-B32의 상기 방법.
- [0269] B34. 뉴클레아제가 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문구조 반복부 (CRISPR) 패밀리 뉴클레아제, 또는 그의 유도체인 B33의 상기 방법.
- [0270] B35. gRNA를 추가로 포함하는 B34의 상기 방법.
- [0271] B36. 프로세스가 세포를 배양하는 것을 추가로 포함하는 것인 B-B35의 상기 방법.
- [0272] B37. 배양이 적어도 1종의 시토카인의 존재 하에서 수행되는 것인 B36의 상기 방법.
- [0273] B38. 배양이 IL2, IL7, IL15, 또는 이들의 임의의 조합의 존재 하에서 수행되는 것인 B36 또는 B37의 상기 방법.
- [0274] B39. 배양이 IL7 및 IL15의 존재 하에서 수행되는 것인 B36 또는 B37의 상기 방법.
- [0275] B40. 세포 존속을 증진시키고/거나 기억 세포 분화를 증진시키는 유전자 변형을 추가로 포함하는 B-B39의 상기 방법.
- [0276] B41. 세포가 1차 세포인 B-B40의 상기 방법.
- [0277] B42. 세포가 환자-유래 세포인 B-B40의 상기 방법.
- [0278] B43. 세포가 림프구인 B-B40의 상기 방법.
- [0279] B44. 세포가 T 세포인 B-B40의 상기 방법.
- [0280] B45. 세포가 어린 T 세포인 B-B40의 상기 방법.
- [0281] B46. 세포가 CD45RA+, CD62L+, CD28+, CD95-, CCR7+, 및 CD27+인 B45의 상기 방법.
- [0282] B47. 세포가 CD45RA+, CD62L+, CD28+, CD95+, CD27+, CCR7+인 B45의 상기 방법.
- [0283] B48. 세포가 CD45RO+, CD62L+, CD28+, CD95+, CCR7+, CD27+, CD127+인 B45의 상기 방법.
- [0284] B49. 세포의 살해 활성이 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 살해 활성과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 B-B48의 상기 방법.
- [0285] B50. 항원예의 TCR의 결합 시 세포의 증식이 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 증식과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 B-B49의 상기 방법.
- [0286] B51. 세포에 의한 항원예의 TCR의 결합 시 전염증성 시토카인의 분비가 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포에 의한 분비와 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 B-B50의 상기 방법.
- [0287] B52. 세포의 LCK 친화도가 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 LCK 친화도와 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 B-B51의 상기 방법.
- [0288] B53. 세포의 존속이 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 존속과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 B-B52의 상기 방법.
- [0289] B54. 세포의 종양 침윤 능력이 CD8 유전자 서열을 갖지 않는 세포의 종양 침윤 능력과 비교하여 약 10% 내지 약 500% 증가되는 것인 B-B53의 상기 방법.
- [0290] B55. TCR 유전자가 CD8-의존성 TCR을 코딩하는 것인 B-B54의 상기 방법.
- [0291] B56. TCR 유전자가 CD8-비의존성 TCR을 코딩하는 것인 B-B54의 상기 방법.

- [0292] B57. CD8 유전자 서열이 CD8 구축물 1, CD8 구축물 2, CD8 구축물 3, 또는 CD8 구축물 4에 의해 코딩되는 것인 B-B56의 상기 방법.
- [0293] B58. CD8 유전자 서열이 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포의 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD4 세포내 도메인을 포함하는 것인 B-B56의 상기 방법.
- [0294] B59. CD8 유전자 서열이 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포의 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148)을 포함하는 것인 B-B56의 상기 방법.
- [0295] C. 특정 비-제한적 실시양태에서, 본 개시된 대상은 B-B57의 방법에 의해 변형된 세포를 제공한다.
- [0296] D. 특정 비-제한적 실시양태에서, 본 개시된 대상은 A-A46의 세포 또는 C의 세포의 유효량을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0297] D1. 조성물이 제약상 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 제약 조성물인 D의 상기 조성물.
- [0298] D2. 조성물이 암의 치료를 위해 이를 필요로 하는 환자에게 투여되는 것인 D 또는 D1의 상기 조성물.
- [0299] D3. 조성물이 동결보존제를 포함하는 것인 D-D2의 상기 조성물.
- [0300] D4. 조성물이 혈청 알부민을 포함하는 것인 D-D3의 상기 조성물.
- [0301] D5. 조성물이 플라스마-라이트 A, HSA, 및 크리오스토르 CS10을 포함하는 것인 D-D4의 상기 조성물.
- [0302] E. 특정 비-제한적 실시양태에서, 본 개시된 대상은 A-A46의 세포, 제C항의 세포, 또는 D-D5의 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0303] E1. 세포의 치료 유효량을 투여하기 전에, 비-골수소멸성 림프구고갈 레지멘이 대상체에게 투여되는 것인 E의 상기 방법.
- [0304] E2. 암이 고형 종양인 E 또는 E1의 상기 방법.
- [0305] E3. 암이 액상 종양인 E 또는 E1의 상기 방법.
- [0306] E4. 고형 종양이 흑색종, 흉부암, 폐암, 난소암, 유방암, 췌장암, 두경부암, 전립선암, 부인과암, 중추 신경계 암, 피부암, HPV+ 암, 식도암, 갑상선암, 위암, 간세포암, 담관암종, 신세포암, 고환암, 육종, 및 결장직장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 E2의 상기 방법.
- [0307] E5. 액상 종양이 소포성 림프종, 백혈병, 및 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 E3의 상기 방법.
- [0308] F. 특정 비-제한적 실시양태에서, 본 개시된 대상은 A-A46의 세포, B-B57의 방법을 수행하기 위한 시약, C의 세포, 또는 D-D5의 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0309] F1. 키트가 암을 치료하는 것에 대한 서면 지시서를 추가로 포함하는 것인 F의 상기 키트.
- [0310] G. 특정 비-제한적 실시양태에서, 본 개시된 대상은 외인성 T 세포 수용체 (TCR); 및 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포의 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함하는 외인성 CD8을 포함하는 세포를 제공한다.
- [0311] H. 특정 비-제한적 실시양태에서, 본 개시된 대상은 외인성 T 세포 수용체 (TCR); 및 CD8 α 신호 펩티드 (서열

식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포의 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148)을 포함하는 외인성 CD8을 포함하는 세포를 제공한다.

[0312] I. 특정 비-제한적 실시양태에서, 본 개시된 대상은 세포 내로 상동성 재조합 (HR) 주형 핵산 서열을 도입하며, 여기서 HR 주형은 제1 및 제2 표적 핵산 서열에 대해 상동성인 제1 및 제2 상동성 아암; 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 TCR 유전자 서열; 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 CD8 유전자 서열을 포함하는 것인 단계; 및 HR 주형 핵산을 세포의 내인성 로커스 내로 재조합하는 단계를 포함하는, 세포를 변형시키는 방법으로서, 여기서 CD8 유전자 서열은 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포의 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 β 세포내 도메인; 또는 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0313] J. 특정 비-제한적 실시양태에서, 본 개시된 대상은 세포 내로 상동성 재조합 (HR) 주형 핵산 서열을 도입하며, 여기서 HR 주형은 제1 및 제2 표적 핵산 서열에 대해 상동성인 제1 및 제2 상동성 아암; 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 TCR 유전자 서열; 제1 및 제2 상동성 아암 사이에 위치한 CD8 유전자 서열을 포함하는 것인 단계; 및 HR 주형 핵산을 세포의 내인성 로커스 내로 재조합하는 단계를 포함하는, 세포를 변형시키는 방법으로서, 여기서 CD8 유전자 서열은 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포의 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148)을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0314] K. 특정 비-제한적 실시양태에서, 본 개시된 대상은 세포를 포함하는 조성물로서, 여기서 세포는 외인성 T 세포 수용체 (TCR) 및 외인성 CD8을 포함하며, 여기서 외인성 CD8은 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포의 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함하는 것인 조성물을 제공한다.

[0315] L. 특정 비-제한적 실시양태에서, 본 개시된 대상은 세포를 포함하는 조성물로서, 여기서 세포는 외인성 T 세포 수용체 (TCR) 및 외인성 CD8을 포함하며, 여기서 외인성 CD8은 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포의 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포의 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148)을 포함하는 것인 조성물을 제공한다.

[0316] M. 특정 비-제한적 실시양태에서, 본 개시된 대상은 치료 유효량의 세포를 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 여기서 세포는 외인성 T 세포 수용체 (TCR) 및 외인성 CD8을 포함하며, 여기서 외인성 CD8은 CD8 α 세포의 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 α 세포내 도메인;

CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, CD8 α 세포내 도메인, CD8 β 세포외 도메인, CD8 β 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD8 β 세포내 도메인; 또는 CD8 α 세포외 도메인, CD8 α 막횡단 도메인, 및 CD4 세포내 도메인을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0317] N. 치료 유효량의 세포를 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 여기서 세포는 외인성 T 세포 수용체 (TCR) 및 외인성 CD8을 포함하며, 여기서 외인성 CD8은 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), CD8 α 세포내 도메인 (서열식별번호: 142), CD8 β 신호 펩티드 (서열식별번호: 144), CD8 β 세포외 도메인 (서열식별번호: 145), CD8 β 막횡단 도메인 (서열식별번호: 146), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD8 β 세포내 도메인 (서열식별번호: 147); 또는 CD8 α 신호 펩티드 (서열식별번호: 139), CD8 α 세포외 도메인 (서열식별번호: 140), CD8 α 막횡단 도메인 (서열식별번호: 141), 및 CD4 세포내 도메인 (서열식별번호: 148)을 포함하는 것인 방법.

[0318] **실시예**

[0319] 하기는 본 발명의 방법 및 조성물의 실시예이다. 상기 제공된 일반적 설명을 고려하여, 다양한 다른 실시양태가 실시될 수 있음이 이해된다.

[0320] **실시예 1. 네오TCR 산물의 생성**

[0321] PCT/US2020/17887 (그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 imPACT 단리 기술에 의해 확인된 네오에피토프-특이적 TCR을 사용하여 상동성 재조합 (HR) DNA 주형을 생성하였다. 이들 HR 주형을 부위-특이적 뉴클레아제와 나란히 1차 인간 T 세포 내로 형질감염시켰다 (도 1a-1c 참조). 단일-단계 비-바이러스 정확성 게놈 조작은 내인성 프로모터에 의해 발현된 환자의 네오에피토프-특이적 TCR로의 내인성 TCR의 심리스 대체를 발생시켰다. 표면 상에 발현된 TCR은 서열에 있어서 전체적으로 천연이다.

[0322] 네오TCR-T 세포 게놈 조작의 정확성을 오프-타겟 통합 핫 스팟 또는 전위에 대한 표적화된 로커스 증폭 (TLA)에 의해, 및 차세대 시퀀싱 기반 오프-타겟 절단 검정에 의해 평가하고, 비의도된 결과의 증거를 결여함을 발견하였다.

[0323] 도 1a-1c에 나타내어진 바와 같이, 관심의 유전자를 함유하는 구축물을 내인성 로커스 내로 삽입하였다. 이는 좌측 및 우측 HR 아암에 의해 플랭킹된 관심의 유전자의 코딩 서열을 함유하는 상동성 복구 주형의 사용으로 달성되었다. HR 아암에 추가로, 관심의 유전자를 2A 펩티드, 관심의 상류 번역된 유전자로부터 2A 펩티드를 제거하는 2A 펩티드의 상류인 프로테아제 절단 부위, 및 신호 서열 사이에 끼워 넣었다 (도 1b). 게놈 내로 통합되면, 관심의 발현 유전자 카세트의 유전자를 단일 메신저 RNA로서 전사하였다. 메신저 RNA에서의 관심의 이 유전자의 번역 동안, 플랭킹 영역을 자기-절단 2A 펩티드에 의해 관심의 유전자로부터 풀고, 프로테아제 절단 부위를 관심의 번역된 유전자로부터 상류의 2A 펩티드의 제거를 위해 절단하였다 (도 1c). 2A 펩티드 및 프로테아제 절단 부위에 추가로, gly-ser-gly (GSG) 링커를 각각의 2A 펩티드 앞에 삽입하여 발현 카세트에서 다른 요소로부터 관심의 유전자의 분리를 추가로 증진시켰다.

[0324] P2A 펩티드는 그의 효율적인 절단 때문에 세포 산물에 대해 다른 2A 펩티드보다 우수한 것으로 결정되었다. 따라서, 두 (2)가지 P2A 펩티드 및 코돈 분기성을 사용하여, P2A 펩티드로부터 관심의 유전자의 어느 하나의 말단 상에 나머지 아미노산으로부터 임의의 외인성 에피토프를 도입하지 않고 관심의 유전자를 발현시켰다. 외인성 에피토프를 갖지 않는 (즉, 관심의 유전자의 어느 하나의 측 상에 플랭킹 P2A 펩티드 아미노산을 갖지 않는) 유전자 편집된 세포의 유익은 면역원성이 대폭 감소되고, 유전자 편집된 세포를 함유하는 세포 산물로 주입된 환자가 유전자 편집된 세포에 대한 면역 반응을 가질 가능성이 적다는 것이다.

[0325] PCT/US/2018/058230에 기재된 바와 같이, 네오TCR은 T 세포의 TCR α 로커스 내로 통합되었다. 구체적으로, 좌측 및 우측 HR 아암에 의해 플랭킹된 네오TCR 코딩 서열을 함유하는 상동성 복구 주형을 사용하였다. 또한, 내인성 TCR β 로커스는 파괴되어 단지 네오TCR 구축물에 의해 코딩된 TCR 서열의 발현을 초래하였다. 일반적 전략을 원형 HR 주형을 사용하여 뿐만 아니라 선형 주형으로 적용하였다.

[0326] 표적 TCR α 로커스 (C α)는 플라스미드 HR 주형과 함께 나타내어지고, 생성된 편집된 서열 및 하류 mRNA/단백질 산물은 도 1b 및 1c에 나타내어진다. 표적 TCR α 로커스 (내인성 TRAC) 및 그의 CRISPR Cas9 표적 부위 (수평

줄무늬, 절단 부위는 화살표에 의해 표시됨)가 나타내어진다 (도 1a-1c). 네오TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 갖는 원형 플라스미드 HR 주형은 좌측 및 우측 상동성 아암 (각각 "LHA" 및 "RHA") 사이에 위치한다. 코돈 최적화된 HR 주형에 의해 도입된 TRAC의 영역이 나타내어진다 (수직 줄무늬). TCRβ 불변 도메인은 TRBC2로부터 유래되었으며, 이는 TRBC1에 대해 기능적으로 등가인 것으로 지시된다. 네오TCR 카세트 중의 다른 요소는 2A = 2A 리보솜 스킵핑 요소 (비-제한적 예로서, 카세트에 사용된 2A 펩티드는 번역된 산물에서 임의의 그러지 않다면 발생하는 비-내인성 에피토프를 제거하는 코돈 분기성과 조합으로 사용된 둘 다의 P2A 서열임); P = 상류 TCRβ 단백질로부터 2A 태그를 제거하는 2A의 상류의 프로테아제 절단 부위 (비-제한적 예로서, 프로테아제 절단 부위는 푸린 프로테아제 절단 부위일 수 있음); SS = 신호 서열 (비-제한된 예로서, 신호 서열은 인간 성장 호르몬 신호 서열일 수 있음)을 포함한다. 네오TCR 발현 유전자 카세트의 HR 주형은 TCRα 가이드 RNA를 갖는 CRISPR Cas9 뉴클레아제 RNP에 의해 표적화된 TCRα 게놈 로커스 내로의 삽입을 지정하는 2개의 플랭킹 상동성 아암을 포함한다. 이들 상동성 아암 (LHA 및 RHA)은 네오TCR 발현 유전자 카세트의 네오E-특이적 TCR 서열을 플랭킹한다. 이 실시예에 사용된 프로테아제 절단 부위는 푸린 프로테아제 절단 부위였지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 적절한 프로테아제 절단 부위가 사용될 수 있다. 유사하게, HGH는 이 실시예를 위해 선택된 신호 서열이었지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 신호 서열은 목적하는 트래피킹에 기반하여 선택되고 사용될 수 있다.

[0327] 게놈 내로 통합되면 (도 1c), 네오TCR 발현 유전자 카세트는 그 개별적인 T 세포로부터의 내인성 TCRα 폴리펩티드의 부분을 여전히 포함하는 내인성 TCRα 프로모터로부터 단일 메신저 RNA로서 전사된다 (도 1c). 이 단일 네오TCR 메신저 RNA의 리보솜 폴리펩티드 번역 동안, 네오TCR 서열은 P2A 펩티드에서의 자기-절단에 의해 내인성, CRISPR-파괴된 TCRα 폴리펩티드로부터 풀린다 (도 1c). 코딩된 네오TCRα 및 네오TCRβ 폴리펩티드는 또한 네오TCR 발현 유전자 카세트에 포함된 내인성 세포성 인간 푸린 프로테아제 및 제2 자기-절단 P2A 서열 모티프에 의한 절단을 통해 서로로부터 풀린다 (도 1c). 네오TCRα 및 네오TCRβ 폴리펩티드는 T 세포 표면에 대한 네오TCR 단백질 복합체의 다량체 어셈블리 및 트래피킹을 위해 신호 리더 서열 (인간 성장 호르몬, HGH로부터 유래됨)에 의해 세포질 세망에 별개로 표적화된다. 푸린 프로테아제 절단 부위의 포함은 상류 TCRβ 채로부터 2A 서열의 제거를 용이하게 하여 TCRβ 기능의 잠재적 간섭을 감소시킨다. 각각의 2A 앞에 gly-ser-gly 링커의 포함 (나타내지 않음)은 3개의 폴리펩티드의 분리를 추가로 증진시킨다.

[0328] 추가적으로, 3개의 반복된 단백질 서열은 HR 주형 내에서 코돈 분기되어 게놈 안정성을 촉진시킨다. TCR 유전자 카세트 내에서, 2개의 P2A는 서로에 대해 코돈 분기될 뿐만 아니라 2개의 HGH 신호 서열은 서로에 대해 코돈 분기되어 생체의 조작된 T 세포의 게놈 내의 도입된 네오TCR 카세트 서열의 안정성을 촉진시킨다. 유사하게, TRAC 엑손 1 (수직 줄무늬)의 재-도입된 5' 말단은 전체 카세트가 2개의 직접적 반복부의 개재 서열의 제거를 통해 시간 경과에 따라 소실될 가능성을 감소시킨다.

[0329] 네오TCR 산물에 추가로, 이 방법은 임의의 CD8 산물에 사용될 수 있다.

[0330] 인-아웃 PCR을 사용하여 네오E TCR 카세트의 정확한 표적 통합을 확인하였다. 아가로스 겔은 통합 카세트 및 부위에 특이적인 프라이머를 사용한 PCR의 결과가 단지 뉴클레아제 및 DNA 주형 둘 다로 처리된 세포 (KOKI 및 KOKIKO)에 대해서만 예상된 크기의 산물을 생성함을 나타내며, 이는 부위-특이적 및 정확한 통합을 입증한다.

[0331] 더욱이, 표적화된 로커스 증폭 (TLA)을 사용하여 표적화된 통합의 특이성을 확인하였다. 가교, 라이게이션, 및 네오TCR 삽입물에 특이적인 프라이머의 사용을 사용하여 통합의 부위(들) 주위의 서열을 얻었다. 게놈에 대해 맵핑된 판독물은 10 kb 간격으로 비닝된다. 유의한 판독물 깊이를 단지 염색체 14 상의 의도된 부위 통합 부위 주위에서 얻었으며, 이는 공통 오프-타겟 삽입 부위의 증거가 없음을 나타낸다.

[0332] 내인성 TCR에 대한 항체 염색 및 네오TCR에 대한 펩티드-HLA 염색은 조작이 네오TCR의 고 빈도 턴-인을 발생 시킴을 밝혀내었으며, 일부 TCR- 세포 및 소수의 WT T 세포가 남는다. 턴-인은 외인성 프로모터의 부재 하에서 네오TCR 발현에 의해 입증된다. 조작을 유사한 결과를 갖는 동일한 네오TCR을 사용하여 다수회 수행하였다. 따라서, 조작된 T 세포에서 네오TCR의 효율적이고 일관된 발현 및 내인성 TCR의 턴아웃이 달성되었다.

[0333] **실시예 2. CD8 산물 1의 생성**

[0334] *T 세포 단리 및 편집.* CD4 및 CD8 T 세포를 밀테니(Miltenyi) 프로디지(Prodigy) 또는 밀테니 MACS 분리 칼럼을 제조업체의 지시서에 따라 사용하여 건강한 공여자 PBMC로부터 단리하였다. 양성-선택된 CD4 및 CD8 T 세포 (밀테니 항체 및 단리 칼럼을 사용하여)를 신선하게 사용하거나 1% 인간 혈청 알부민 (게미니(Gemini)), 49% 플라스마라이트 (백스터(Baxter)), 및 50% CS10 (시그마(Sigma))에서 동결보존하였다. 동결보존된 세포를 해동시

키고, TexMACS (밀테니) + 10% 인간 AB 혈청 (밸리 바이오메디칼(Valley Biomedical))에서 세척하고, TexMACS + 3% 인간 AB 혈청 (배양 배지)에서 mL 당 2×10^6 개 세포의 밀도로 시딩하였다. 해동 후 1일에, 또는 신선하게 사용되는 경우 즉시, 세포를 세척하고, 부피로 배양 배지 + 12.5 ng/mL IL7 + 12.5 ng/mL IL15 + 1:17.5 비의 트랜스ACT(TransACT) T 세포 활성화 시약 (모든 시약은 밀테니로부터)에서 mL 당 1.46×10^6 개 세포의 밀도로 재-시딩하였다. 활성화 후 2일에, T 세포를 i) 네오TCR 산물의 생산을 위한 플라스미드 (예를 들어, **도 1b** 참조) 또는 ii) CD8 구조물 1 (예를 들어, 네오TCR 베타 및 알파 서열의 상류의 P2A 부위에 의해 플랭킹된 CD8 α 의 코딩 서열 및 TCR 알파 및 베타 로커스를 표적화하는 gRNA-Cas9 RNP로 이루어짐; 예를 들어, **도 2a** 참조)로 전기천공하였다. CD8 구조물 1의 예시적인 발현 구조물은 **도 11a**에 나타내어진다. T 세포를 100 μ L 큐벳 중 룬자(Lonza) X-유닛 및 프로그램 EO-115를 사용하여 전기천공하였다. T 세포를 12.5 ng/mL IL7 + 12.5 ng/mL IL15로 보충된 배양 배지에서 확장시킨다. 보충된 배지를 활성화 후 13일인 연구의 종료시까지 2-3일마다 교체하였다.

[0335] *comPACT* 및 *comPACT*-텍스트라머 제조. 신생항원-특이적 펩티드-HLA 복합체 폴리펩티드 (각각의 "comPACT")를 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 PCT/US2019/025415에 기재된 바와 같은 방법에 따라 제조하였다. comPACT-텍스트라머 복합체를 네오TCR 발현 T 세포의 표지화를 위해 제조하였다. 비오틴화 comPACT 단백질을 스트렙타비딘-접합된 형광단과 함께 실온 (RT)에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 비오틴-40-텍스트란 (NANOCs)을 혼합물에 첨가하고 RT에서 추가의 10분 동안 인큐베이션하였다. comPACT-텍스트라머를 4°C에서 저장하였다.

[0336] *네오TCR 편집된 T 세포에의 comPACT 결합의 확인*. T 세포를 유동 세포계측법을 위해 염색하였다. 세포를 먼저 생존력 염료로 4°C에서 20분 동안 염색하고, 이어서 세척하고, comPACT-텍스트라머로 4°C에서 10분 동안 염색하였다. 표면 항체 (항-CD8 α , 항-CD8 β , 항-CD4)를 세포 및 comPACT-텍스트라머의 현탁액에 첨가하고, 세포를 4°C에서 추가의 20분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 세척하고, 세포내 고정 완충제 (비디 바이오사이언시스(BD Biosciences))에서 고정시켰다. 모든 세포를 애튼(Attune) NxT 유동 세포계측기 (써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific)) 상에서 획득하고, 데이터를 FCS 익스프레스(FCS Express) 또는 플로우조(FlowJo) 중 어느 하나로 분석하였다.

[0337] *세포계측 비드 어레이 (CBA)*. 스트렙타비딘 코팅된 플레이트 (이글 바이오사이언시스(Eagle Biosciences))를 세척 완충제 (1% BSA 및 0.05% 트윈20으로 보충된 PBS)로 3회 세척하고, 이어서 100-0.01 ng/웰의 범위의 상이한 농도로 comPACT로 코팅하였다. comPACT를 갖지 않는 웰 및 미스매칭된 comPACT로 코팅된 웰을 대조군으로서 사용하였다. 플레이트를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하고, 세척 완충제로 3회 세척하고, 이어서 3% 인간 AB 혈청으로 보충된 TexMACS로 3회 세척하여 트윈20을 제거하였다. T 세포를 3% 인간 AB 혈청으로 보충된 TexMACS로 2회 세척하고, 3% 인간 AB 혈청으로 보충된 TexMACS 및 1X 페니실린-스트렙토마이신 용액에서 100만 개 세포/mL로 재현탁시켰다. T 세포를 comPACT 코팅된 플레이트 상으로 100 μ L/웰로 플레이트팅하고, 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 24시간 후, 상청액을 수집하고, 시토카인 농도를 BD 세포계측 비드 어레이 (CBA) 인간 Th1/Th2 시토카인 키트 II (카탈로그 번호 551809)를 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 분석하였다. 포획 비드를 배양 상청액과 혼합하고, 광으로부터 보호된 RT에서 3시간 동안 검출 시약과 함께 인큐베이션하고, 세척하고, 세척 완충제에 재현탁시켰다. 샘플을 애튼 NxT 유동 세포계측기 상에서 검정하고, 데이터를 플로우조로 분석하였다. EC₅₀은 최대 반응의 50%를 유발하는 동족 comPACT의 농도를 나타내며, 다양한 comPACT 농도에 걸친 IFN γ 분비의 최소-제공 적합을 이용하여 계산된다.

[0338] *세포내 염색*. T 세포를 지시된 날에 유동 세포계측법을 위해 염색하였다. T 세포를 먼저 생존력 염료로 4°C에서 20분 동안 염색하고, 이어서 세척하고, 표면 항체 (항-CD8 α , 항-CD8 β , 항-CD4)와 함께 4°C에서 추가의 20분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 T 세포를 세척하고, 세포내 염색을 위해 투과화하였다. T 세포를 항-2A 펩티드로 또는 항-IFN γ , 항-TNF, 또는 항-IL2로 투과화 완충제에서 4°C에서 20분 동안 염색하였다. T 세포를 세포내 고정 완충제 (비디 바이오사이언시스)에서 고정시켰다. 샘플을 애튼 NxT 유동 세포계측기 (써모피셔 사이언티픽) 상에서 검정하고, FCS 익스프레스 또는 플로우조 중 어느 하나로 분석하였다.

[0339] *T 세포 증식 검정*. 편집된 CD4 및 CD8 T 세포를 e450 증식 염료 (이바바이오사이언스(eBioscience))로 제조업체의 지시서에 따라 표지하였다. 표지된 세포를 상기 기재된 바와 같이 다양한 농도로 comPACT 코팅된 플레이트 상에서 자극시켰다. T 세포를 48-96시간에 걸쳐 수거하고, e450 염료의 희석에 의해 측정된 바와 같은 증식에 대해 분석하였다.

[0340] *T 세포 살해 검정*. HLA-매칭된 세포주를 동족 신생항원 펩티드 또는 미스매칭된 펩티드로 37°C, 5% CO₂에서 1시간 동안 펄싱하였다. 세포를 배지로 3회 세척하여 임의의 비결합된 펩티드를 제거하고, 이어서 상기 기재된

e450 증식 염료로 표지된 편집된 CD4 및 CD8 T 세포와 공동-배양하였다. 공동-배양물을 37℃에서 48시간 동안 5% CO₂와 함께 인큐베이션한 후, 수거하였다. 세포를 세척하고, 고정가능한 생존력 염료로 염색하여 살해 효율을 결정하였다. e450 증식 염료를 사용하여 편집된 T 세포를 표적 세포로부터 구별하였다.

[0341] *CD8 산물 1의 생성 및 확인.* 네오TCR 베타 및 알파 서열의 상류의 P2A 부위에 의해 플랭킹된 CD8 α의 코딩 서열 (CDS)로 이루어진 발현 구축물을 합성한다. 간략하게, 인간 CD8 α의 CDS를 제한 부위의 상류의 및 그로 플랭킹된 GSG-링커 및 P2A 부위로 합성한다. 관심의 네오TCR 발현 벡터 및 합성된 CD8 α 구축물을 제한 효소와 함께 인큐베이션하고, 함께 라이게이션하여 최종 HDR 구축물을 생성하였다. CD8 구축물 1을 TCR α 및 β 로커스를 표적화하는 gRNA-Cas9 RNP와 함께 전기천공하였다. CD8 T 세포 (그러나 CD4 T 세포는 아님) 중에서 텍스트라머에 결합하는 것으로 공지된 모델 네오TCR (예를 들어 TCR097)을 사용하여 CD8 α 트랜스진의 발현이 이들 TCR이 CD4 T 세포 중에서 텍스트라머에 결합하는 것을 가능하게 함을 입증하였다.

[0342] 유전자 전달 및 CD4 T 세포의 표면 상의 CD8 α의 발현의 효율을 시험하기 위해, 조작된 CD4 T 세포를 항-CD8 α 항체로 염색하고, 트랜스진의 표면 발현을 상기 기재된 바와 같이 유동 세포계측법에 의해 확인한다. 단지 CD8 T 세포 중에서 텍스트라머에 결합하는 것으로 공지된 네오TCR (예를 들어, TCR 097)을 사용하여 CD8 α 트랜스진의 발현이 이들 TCR이 CD4 T 세포 중에서 텍스트라머에 결합하는 것을 가능하게 함을 입증하였다. **도 13a, 13b, 14, 15a, 및 15b**를 참조한다. 더욱이, 야생형 및 유전자 조작된 CD8 α T 세포 상의 CD8 α 발현을 평가하여 CD8 α 트랜스진의 첨가가 CD8 T 세포 상의 CD8 α의 표면 수준을 증가시켰는지 여부를 결정하였다. CD8 α 트랜스진을 발현하도록 조작된 CD4 T 세포는 CD4 및 CD8 α에 대해 이중-양성이었다.

[0343] CD8 T 세포를 또한 CD8 α 트랜스진을 발현하도록 조작하고, 상기 기재된 바와 같이 특징규명하였다. **도 15a 및 15b.** 상대 CD8 α 유전자 발현을 또한 RT-qPCR을 통해 정량화하고, 대조군 비-조작된 CD8 T 세포와 비교하였다. CD8 α 트랜스진을 발현하는 CD8 T 세포는 CD8 α 발현의 내인성 수준보다 더 높았다.

[0344] *동족 항원의 직면 시 T 세포 증식에 대한 CD8 발현의 효과.* 편집된 T 세포를 상기 기재된 바와 같이 증식 염료로 염색하였다. 염색 후, T 세포를 다양한 농도의 동족 comPACT 단백질로 자극시켰다. 48-72시간 후, T 세포를 수거하고, 상기 기재된 바와 같이 항-CD4, 항-CD8, 및 항-2A 펩티드로 염색하였다. 편집된 T 세포를 2A 발현에 의해 확인하였다. CD4 및 CD8 T 세포의 증식을 증식성 염료의 희석을 정량화함으로써 결정하였다. CD8 α 트랜스진을 결여한 네오TCR-발현 T 세포를 음성 대조군으로서 사용하였다. CD8 α 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포는 CD8 α 발현을 결여한 CD4 T 세포보다 더 낮은 농도의 동족 comPACT에 반응하여 증식하였다.

[0345] *동족 항원의 직면 시 시토카인 생산에 대한 CD8 α 발현의 효과.* 증식에 추가로, 세포내 시토카인 염색을 통한 이펙터 시토카인 생산을 측정하였다. 이 검정에서, 네오TCR 산물 및 CD8 산물 1을 브레펠딘 A의 존재 하에서 5 시간 동안 다양한 농도의 동족 comPACT로 자극시켰다. 자극 후, T 세포를 항-CD4 및 항-CD8 α로 염색하였다. 세포를 투과화하고, 항-P2A 펩티드, 항-IFN γ , 항-TNF, 및 항-IL2로 염색하였다. CD8 α 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포는 CD8 α 발현을 결여한 네오TCR CD4 T 세포보다 더 낮은 농도의 동족 comPACT에 반응하여 이펙터 시토카인을 생산하였다.

[0346] *동족 항원의 직면 시 살해 활성화에 대한 CD8 α 발현의 효과.* 이펙터 기능을 평가하기 위해, 편집된 CD4 및 CD8 T 세포를 상기 기재된 바와 같이 동족 펩티드로 펄싱된 HLA-매칭된 표적 세포와 함께 배양하였다. CD4 및 CD8 T 세포를 별개로 편집하여 표적 세포를 살해하는 CD8 α를 발현하는 CD4 T 세포의 능력을 평가하였다. CD8 α 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포는 CD8 α 발현을 결여한 네오TCR CD4 T 세포보다 더 큰 분율의 동족 펩티드를 제시하는 표적 세포를 살해하였다.

[0347] 실시예 3. CD8 산물 2의 생성

[0348] CD8 α를 발현하도록 조작된 CD4 T 세포는 CD8 β 발현을 결여한다. 그러나, CD8 β는 LCK에 대해 더 높은 친화도를 갖는다 (Irie et al., 1998, J. Immunol., 161(1), 183-191). 따라서, T 세포를 CD8 α와 함께 CD8 β를 공동-발현하도록 편집하였다 (즉, CD8 산물 2). 이전에 기재된 바와 같이 P2A 부위에 의해 플랭킹된 CD8 β, P2A 부위에 의해 플랭킹된 CD8 α, 이어서 TRB 및 TRA 대립유전자를 함유하는 추가의 구축물을 생성한다. CD8 α 및 CD8 β를 발현하는 CD4 및 CD8 T 세포를 상기 기재된 동일한 검정을 사용하여 평가한다. CD8 α 및 CD8 β 서열을 갖는 예시적인 발현 구축물은 **도 11b**에 나타내어진다.

[0349] CD8 β 발현을 또한 편집된 CD4 T 세포에서 평가하였다. CD8 α 및 CD8 β 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포는 CD8 α 트랜스진 단독을 발현하는 CD4 T 세포보다 더 낮은 농도의 동족 comPACT에 반응하여 증식하였다. CD8 α 및 CD8 β 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포는 또한 CD8 α 트랜스진 단독을 발현하는 네오TCR CD4

T 세포보다 더 낮은 농도의 동족 compACT에 반응하여 이펙터 시토카인을 생산하였다. 그리고, CD8 α 및 CD8 β 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포는 CD8 α 트랜스진 단독을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포보다 더 큰 분율의 동족 펩티드를 제시하는 표적 세포를 살해하였다.

[0350] 실시예 4. 키메라 CD8 α 및 CD8 β 구축물 및 CD8 산물 3 및 4의 생성

[0351] T 세포의 효율적인 편집 및 네오TCR의 발현을 보장하기 위해, CD8 β 의 세포내 도메인에 연결된 CD8 α 의 세포외 및 막횡단 도메인에 대한 코딩 서열로 구성된 키메라 단백질을 생성하였다. CD8 β 서열의 세포내 도메인에 연결된 CD8 α 의 세포외 및 막횡단 도메인을 갖는 예시적인 발현 구축물 (즉, CD8 산물 3)은 도 11c에 나타내어진다.

[0352] 더욱이, CD4의 세포내 도메인은 CD8보다 훨씬 더 높은 LCK에 대한 친화도를 갖는다 (Irie et al., 1998). 따라서, CD4의 세포내 도메인에 연결된 CD8 α 의 세포외 및 막횡단 도메인에 대한 코딩 서열을 함유하는 제2 키메라 단백질을 생성하였다. CD4 서열의 세포내 도메인에 연결된 CD8 α 의 세포외 및 막횡단 도메인을 갖는 예시적인 발현 구축물 (즉, CD8 산물 4)은 도 11d에 나타내어진다.

[0353] CD8 산물 3 및 4를 발현하는 CD4 및 CD8 T 세포를 상기 기재된 동일한 검정을 사용하여 평가하였다.

[0354] CD8 α -CD8 β -ID 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포는 CD8 α 트랜스진 단독을 발현하는 CD4 T 세포보다 더 낮은 농도의 동족 compACT에 반응하여 증식하였다. CD8 α -CD8 β -ID 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포는 CD8 α 트랜스진 단독을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포보다 더 낮은 농도의 동족 compACT에 반응하여 이펙터 시토카인을 생산하였다. CD8 α -CD8 β -ID 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포는 CD8 α -CD8 β -ID 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포보다 더 큰 분율의 동족 펩티드를 제시하는 표적 세포를 살해하였다.

[0355] CD8 α -CD4-ID 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포는 CD8 α -CD8 β -ID 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포보다 더 낮은 농도의 동족 compACT에 반응하여 증식하였다. CD8 α -CD4 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포는 CD8 α -CD8 β -ID 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포보다 더 낮은 농도의 동족 compACT에 반응하여 이펙터 시토카인을 생산하였다.

[0356] CD8 α -CD4-ID 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포는 CD8 α -CD8 β -ID 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD4 T 세포보다 더 큰 분율의 동족 펩티드를 제시하는 표적 세포를 살해하였다. CD8 α -CD4-ID 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD8 T 세포 트랜스진을 결여한 네오TCR CD8 T 세포보다 더 낮은 농도의 동족 compACT에 반응하여 증식하였다. CD8 α -CD4 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD8 T 세포는 트랜스진을 결여한 네오TCR CD8 T 세포보다 더 낮은 농도의 동족 compACT에 반응하여 이펙터 시토카인을 생산하였다. CD8 α -CD4-ID 트랜스진을 발현하는 네오TCR CD8 T 세포는 트랜스진을 결여한 네오TCR CD8 T 세포보다 더 큰 분율의 동족 펩티드를 제시하는 표적 세포를 살해하였다.

[0357] 실시예 5. CD8 산물은 네오E-HLA 표적 인식에 대한 증가된 민감도를 가지며, 전염증성 및 세포독성 기능을 촉발시킨다

[0358] MHC-I 네오TCR을 결장직장암을 갖는 환자의 혈액으로부터 포획된 네오E-특이적 T 세포로부터 클로닝하였다. 건강한 공여자 CD8 및 CD4 T 세포를 클로닝된 MHC-I 네오TCR 단백을 발현하도록 또는 유전자-편집된 T 세포에서 이소성 CD8 공-수용체의 조작을 포함하도록 정확성 계층 조작하였다. 유동 세포계측 분석을 사용하여 네오TCR 및 이소성 CD8 공-수용체 (즉, CD8 구축물 1-4의 CD8 및 CD4 성분)의 표면 발현을 각각 평가하였다. 보다 낮은 친화도, CD8-의존성 네오TCR에 대해 CD4 T 세포 중에서 네오TCR 결합의 구체를 관찰하였다. 중요하게는, 동족 항원으로서의 자극에 반응하여, CD107a 및 세포내 IFN γ 염색은 CD4 T 세포에 의한 MHC-I 네오TCR-유도된 이펙터 기능의 민감도의 10-100배 증가를 밝혀내었으며, 특이성에 대한 효과는 없었다. 기능성 또는 민감도의 변화는 추가의 CD8 공-수용체의 발현에 의해 CD8 T 세포 상에서 보이지 않았다.

[0359] 이들 결과는 CD4 T 세포 내로의 CD8-의존성 MHC-I 네오TCR과 함께 CD8 공-수용체의 동시 정확성 계층 조작 (즉, CD8 산물 1-4)이 네오E-HLA 표적 인식에 대한 그들의 민감도를 유의하게 증가시킬 뿐만 아니라, 항원-특이성을 손상시키지 않으면서 전염증성 및 세포독성 기능을 촉발시킴을 입증한다.

[0360] 실시예 6. 다양한 LCK 친화도를 갖는 CD8 산물의 생성 및 디자인

[0361] 본원에 기재된 바와 같이, 4가지 부류의 CD8 산물을 생성하였다:

[0362] 1. CD8 α 동중이량체 (CD8 구축물 1)

- [0363] 2. CD8 α -P2A-CD8 β (CD8 구축물 2)
- [0364] 3. CD8 β 세포내 도메인을 갖는 CD8 α (CD8 구축물 3)
- [0365] 4. CD4 세포내 도메인을 갖는 CD8 α 동종이량체 (CD8 구축물 4)
- [0366] **도 10**에 나타내어진 바와 같이, 이들 CD8 구축물 및 생성된 CD8 산물을 다양한 정도의 LCK 친화도를 허용하도록 디자인하였다. 예측된 바와 같이, CD8 산물 1은 가장 낮은 LCK 친화도를 갖는 것으로 나타났고, 이어서 CD8 산물 2, CD8 산물 3, 및 CD8 산물 4였다 (그 순서에서 CD8 산물 4는 가장 높은 LCK 친화도를 가짐).
- [0367] CD8 산물 4의 높은 친화도에 기반하여, 이 산물을 네오TCR 산물에 비해 CD8 산물 1-4의 증가된 세포 살해 능력을 예시하는 세포 살해 검정에 사용하였다.
- [0368] CD4⁺ T 세포를 **도 2d** 및 **3d**에 기재된 CD8 산물 4 (산물에서 네오TCR로서 TCR097을 가짐)를 발현하도록 본원에 기재된 바와 같이 조작하였다. SW620 세포주는 R20Q 돌연변이 (TCR097에 대한 동족 항원)를 이중으로 발현하도록 조작되었다. 네오TCR097을 발현하는 CD8 산물 4를 SW620 이중 세포와 조합하였다. **도 13a** 및 **13b**에 나타내어진 바와 같이, CD8 산물 4는 TCR097을 또한 발현하는 네오TCR 산물보다 동족 항원 발현 SW620 세포의 실질적으로 더 양호한 살해를 제공하였다. **도 13a**에 나타내어진 실험을 1:1의 E:T 비로 수행하였으며, 그래프에 나타내어진 바와 같이, TCR097을 발현하는 네오TCR 산물은 동족 항원 발현 SW620 세포의 살해에 있어서 임의의 효능을 나타내지 않았다. **도 13b**에 나타내어진 실험을 2:1의 E:T 비로 수행하였으며, TCR097을 발현하는 네오TCR 산물은 동족 항원 발현 SW620 세포를 살해하는 일부 능력을 나타내었지만, TCR097을 발현하는 CD8 산물 4가 우수한 효능을 가졌음이 실험으로부터 명백하였다.
- [0369] **도 13a** 및 **13b**에 제공된 데이터를 갖는 상기 실험에 사용된 동일한 조작된 CD4⁺ 세포를 또한 R20Q 돌연변이를 동형접합성으로 발현하도록 조작된 SW620 세포주에 대해 시험하였다. 이 실험에서, 동족 항원의 높은 발현은 저 친화도 네오TCR097에 대해 보상할 수 있었으며, TCR097을 발현하는 네오TCR 산물 및 TCR097을 발현하는 CD8 산물 4 둘 다는 SW620 세포를 살해하는데 있어서 효능을 나타내었다. 그러나, 동형접합성 SW620 세포에서 동족 항원의 높은 발현은 생리학적으로 관련되지 않으며, 이 실험은 그들을 CD4 세포내 도메인을 갖는 CD8 α 동종이량체를 또한 포함하도록 추가로 조작함으로써 (즉, CD8 산물 4), 효과적으로 종양 세포와 결속하고 이를 살해할 수 없는 저 친화도 TCR을 갖는 네오TCR 산물을 구제하는 능력을 강조하는 역할을 한다.
- [0370] CD8 산물의 효능의 최종 제어 및 입증으로서, CD8 T 세포를 또한 네오TCR097 및 CD4 세포내 도메인을 갖는 CD8 α 동종이량체를 발현하도록 형질감염시켰다 (즉, CD4 T 세포 대신 CD8 T 세포를 사용한 CD8 산물 4). **도 15a** 및 **15b**에서 상부 그래프에 나타내어진 바와 같이, CD8 산물 4는 산물이 CD4 T 세포로부터 제조된 경우 네오TCR 산물보다 SW620 세포의 실질적으로 더 양호한 살해를 제공하였다. 그러나, CD8 산물 4 및 네오TCR 산물이 CD8 T 세포로부터 제조된 경우 (**도 15a** 및 **15b**에서 하부 그래프), 네오TCR 산물의 능력은 CD8 T 세포에서의 내인성 CD8 발현 때문에 구제되었다. 그래프의 오버레이가 나타내어지지 않지만, **도 15a** 및 **15b**에서 상부 그래프에 나타내어진 CD4 T 세포에서의 CD8 산물 4는 하부 2개의 그래프에서 CD8 T 세포에서의 CD8 산물 4보다 더 양호한 효능을 갖는 것으로 나타남은 또한 주목할 만하며; 이는 종양 사멸 및 치료를 필요로 하는 암을 갖는 환자의 유효 치료를 초래하는 종양 세포의 동족 항원과 결속하는 본원에 기재된 CD8 산물의 우수한 능력을 시사한다.
- [0371] **실시예 6. CD8 산물은 네오TCR 민감도를 유지하면서 증가된 CD4 T 세포 민감도를 갖는다**
- [0372] CD8 구축물이 적절하게 발현되었음을 확인하기 위해, CD8 산물 1, 2, 3, 및 4를 시험하여 CD8 α 의 표면 발현을 결정하였다. CD8 산물 1, 2, 3, 및 4 각각은 정상적인 CD8 α 표면 발현을 나타내었음이 보여졌다. CD8 산물 4로부터의 대표적인 데이터는 **도 16**에 나타내어진다.
- [0373] CD8 구축물이 어떻게 CD8 산물에서 발현된 네오TCR의 동족 항원에 대한 CD4 T 세포 민감도 및 특이성에 영향을 미치는지를 결정하는 것은 또한 중요하였다. 민감도 실험을 수행하였으며, CD8 산물 1-4는 증가된 CD4 T 세포 민감도를 나타내었음이 보여졌다 (**도 17a**). 특이성 실험을 또한 CD8 산물 1-4에 대해 수행하였다. CD8 산물 1, 2, 3, 및 4는 네오TCR097로 제조되었다. CD8 산물 1, 2, 3, 및 4 (네오TCR097을 발현함)를 시험하여 네오TCR097에 대한 동족 항원에 대한 이들 산물의 특이성을 평가하는 실험을 수행하였다. **도 17b**에 나타내어진 바와 같이, CD8 산물 1, 2, 3, 및 4 (네오TCR097을 발현함)는 네오TCR097에 대한 동족 항원에 대해 특이적이었으며, 미스매칭된 항원에 노출된 경우 활성을 나타내지 않았다. 특이성을 T 세포 활성화의 증거인 INF γ 및 CD107 생산에 의해 결정하였다. 따라서, 본원에 기재된 CD8 산물은 동일한 네오TCR을 발현하는 네오TCR 산물에 비해 CD4 T 세포에 대한 증가된 민감도를 가지며, 발현된 네오TCR에 대한 동족 항원에 대한 그들의 특이성을 유

지한다.

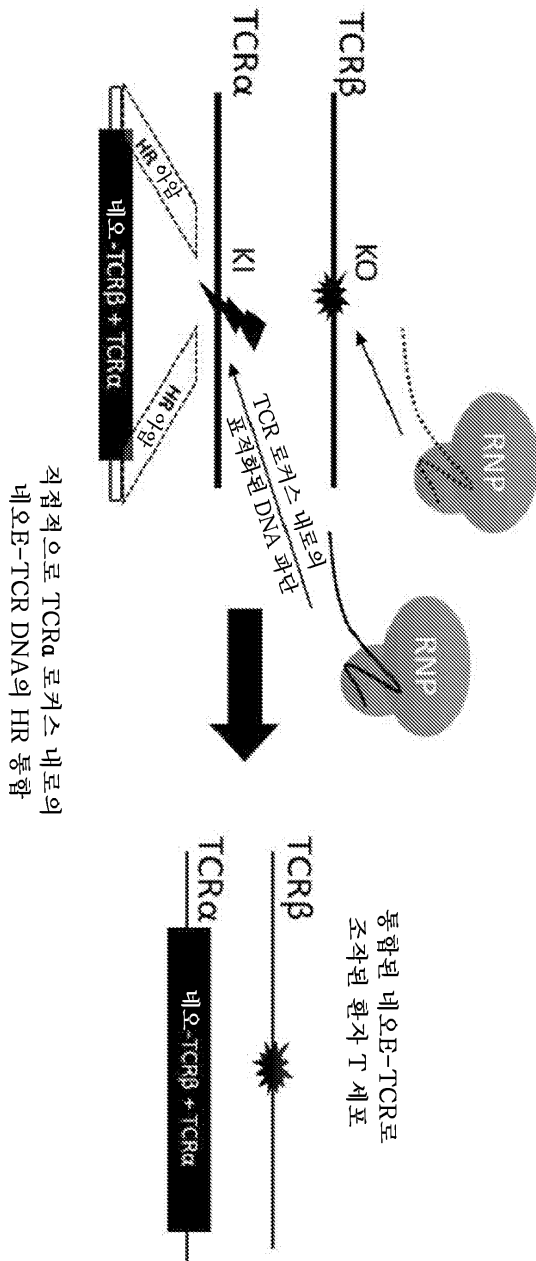
[0374] 마지막으로, CD8 구축물이 CD8-의존성 및 CD8-비의존성 네오TCR에 대해 갖는 영향을 조사하기 위한 실험을 수행하였다. CD8-의존성 네오TCR은 CD8 세포가 CD8 α 를 발현하도록 조작될 것이기 때문에 동족 항원에 대해 증가된 민감도를 나타낼 것으로 및 CD8-비의존성 네오TCR은 네오TCR의 비의존성 성질 때문에 증가된 민감도를 나타내지 않을 것으로 예상되었다. 그러나, 네오TCR 산물 1, 2, 3, 및 4는 놀랍게도 CD8-의존성 (예를 들어, 네오TCR097) 및 CD8-비의존성 (예를 들어, 네오TCR089) 네오TCR의 민감도를 증가시킨 것으로 나타났다. 따라서, CD8 구축물 1, 2, 3, 및 4는 이들이 CD8-의존성 또는 CD8-비의존성인지 여부와 무관하게, 모든 네오TCR에 대해 동족 네오TCR 항원을 갖는 종양 세포의 네오TCR 결속 및 T 세포 살해를 개선시킬 수 있는 것으로 나타났다.

[0375] 본 발명을 자세하게 및 일부는 특히 몇몇 기재된 실시양태에 관하여 기재하였지만, 이는 임의의 이러한 상세사항 또는 실시양태 또는 임의의 특정 실시양태에 제한되어야 하는 것으로 의도되지 않으며, 이는 첨부된 청구범위에 관하여, 종래 기술의 관점에서 이러한 청구범위의 가장 넓은 가능한 해석을 제공하도록, 및 따라서, 본 발명의 의도된 범위를 효과적으로 포괄하도록 해석되어야 한다.

[0376] 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 다른 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함된다. 상충되는 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 지배할 것이다. 또한, 섹션 표제, 물질, 방법, 및 실시예는 단지 예시적이며, 제한적인 것으로 의도되지 않는다.

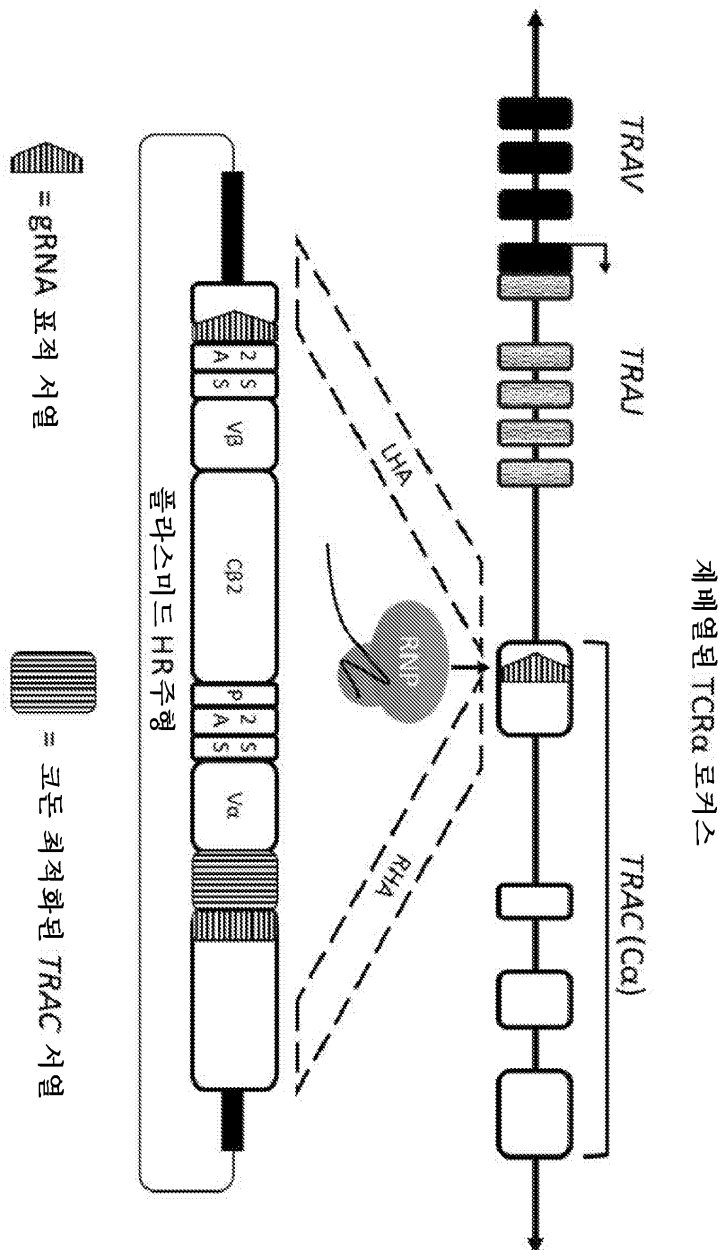
도면

도면1a

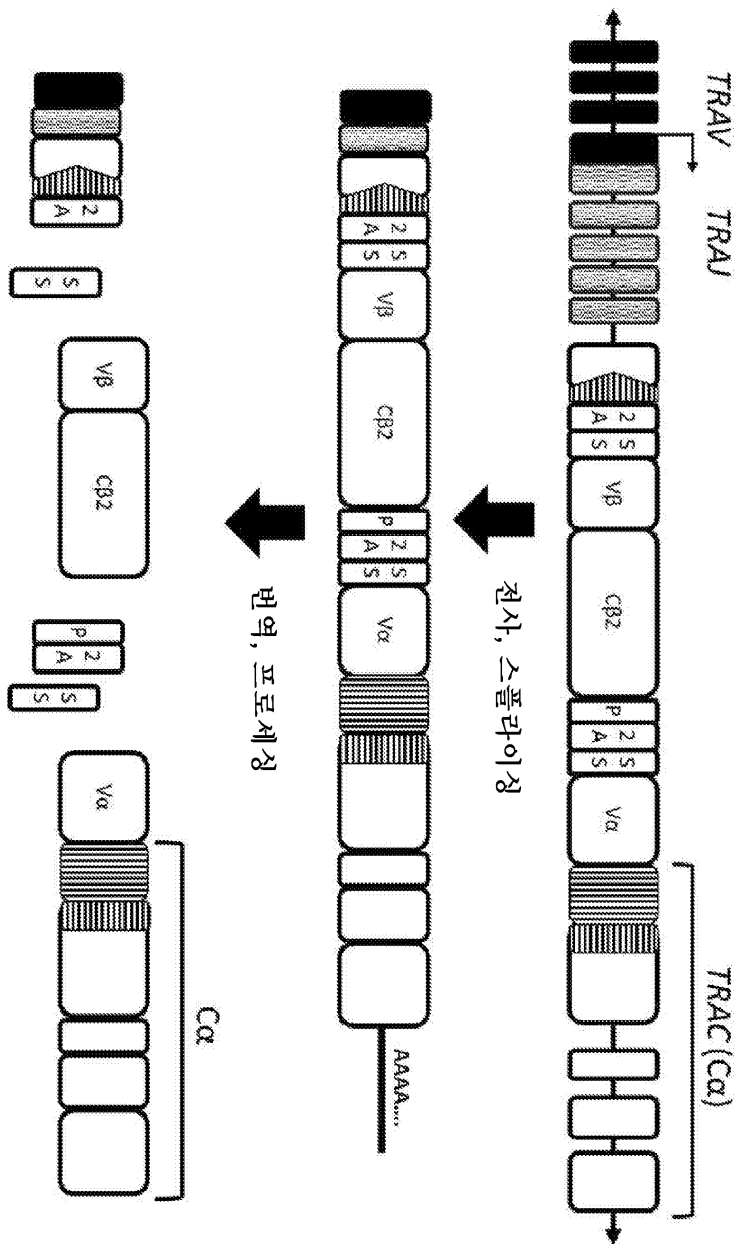


직접적으로 TCRα 로커스 내부의
네오E-TCR DNA의 HR 통합

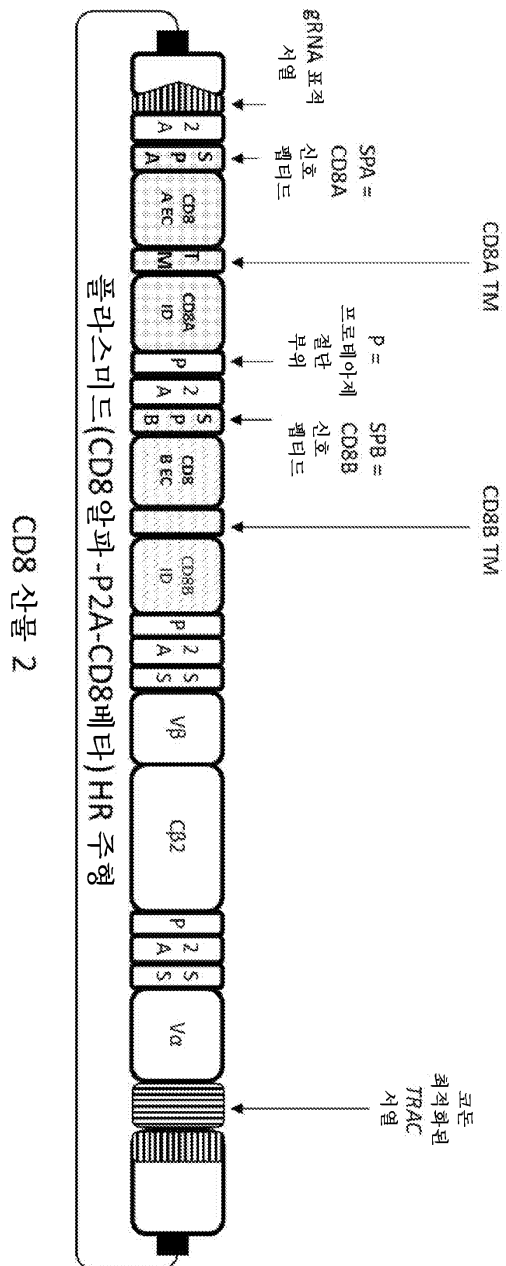
도면1b



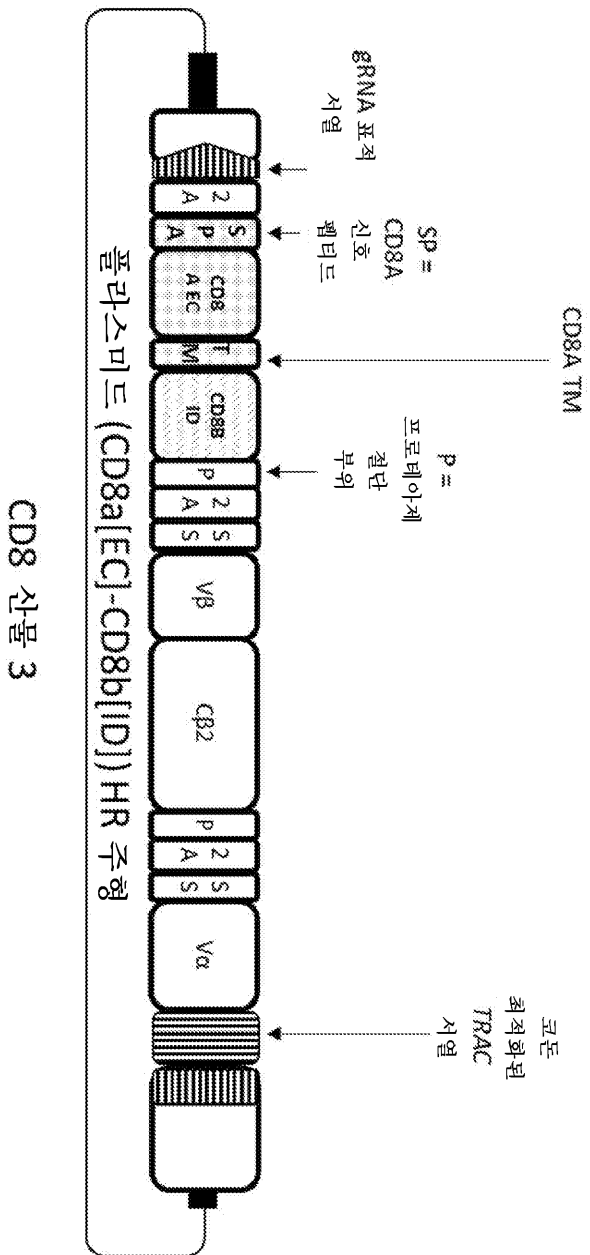
도면1c



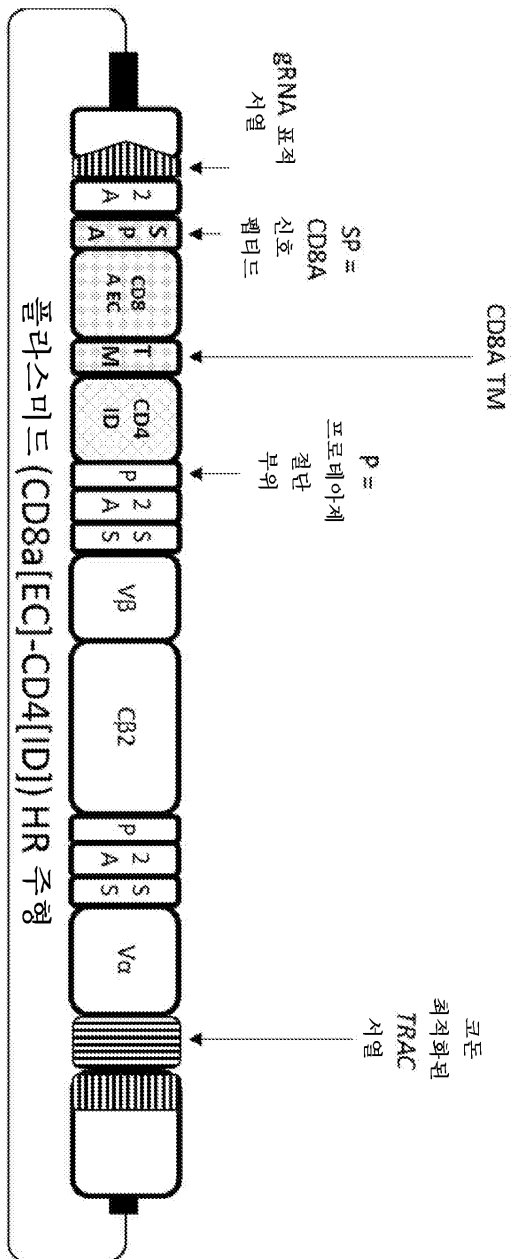
도면 2b



도면2c

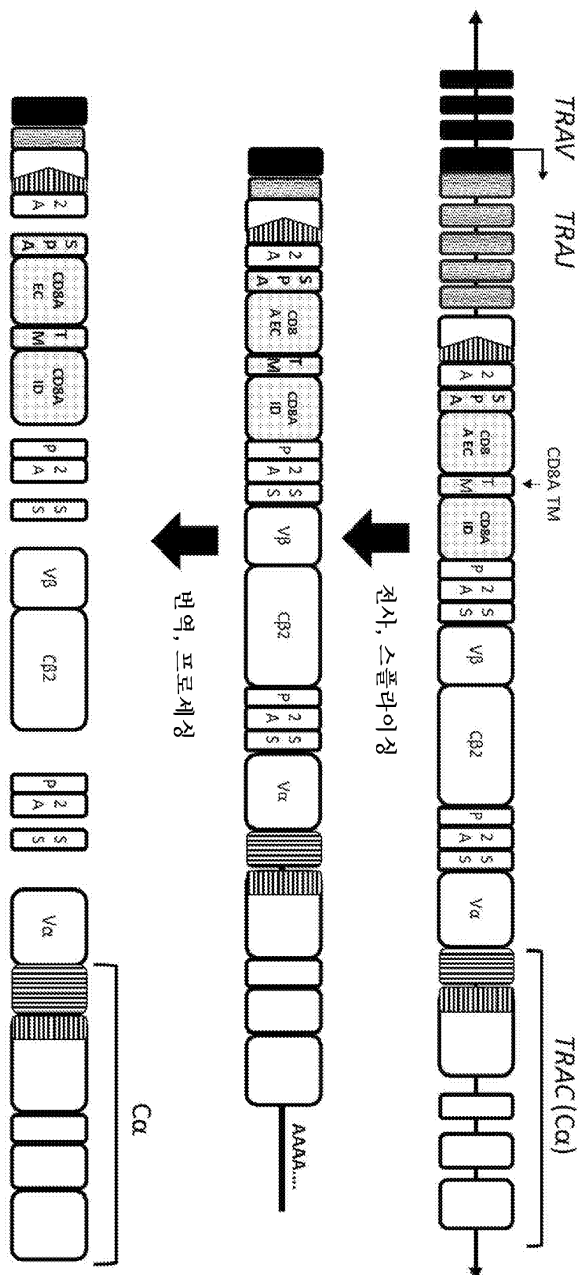


도면2d



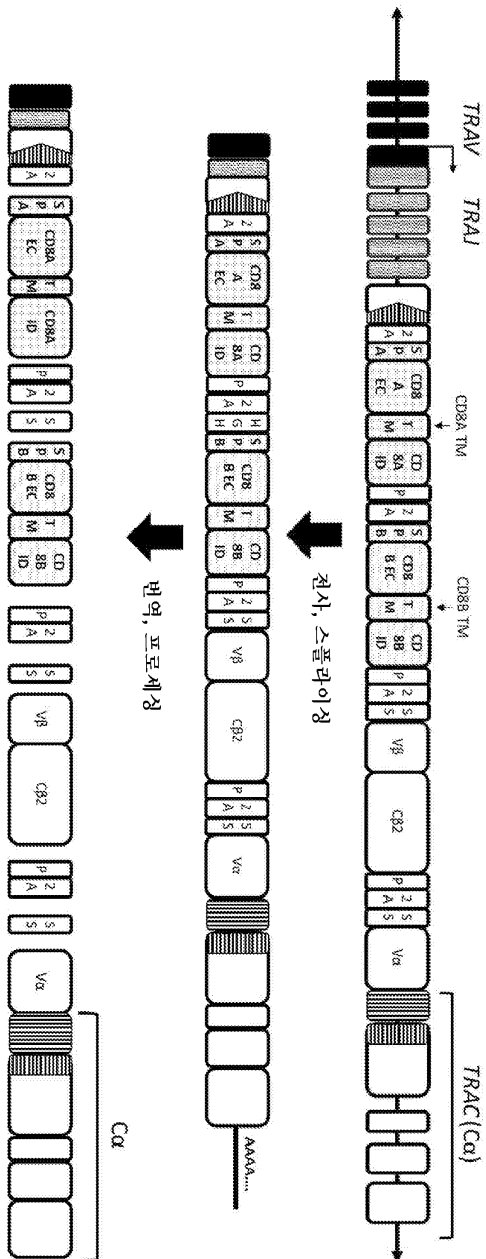
CD8 산물 4

(CD8A_CD8 산물 1)

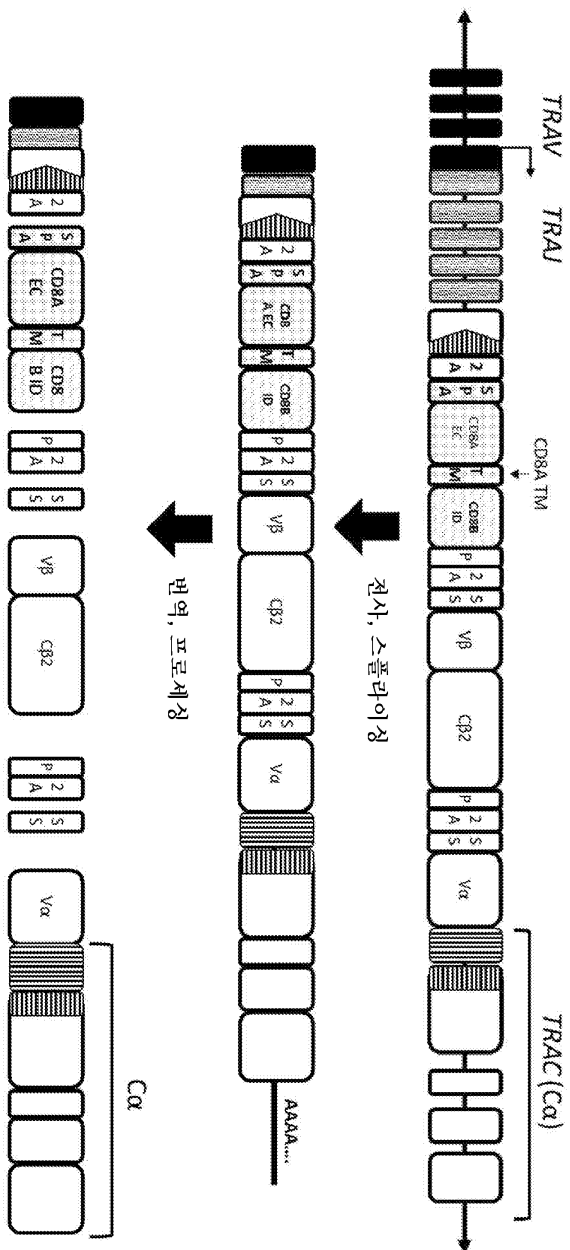


도면3a

(CD8알파-P2A-CD8 베타 _CD8 산물 2)

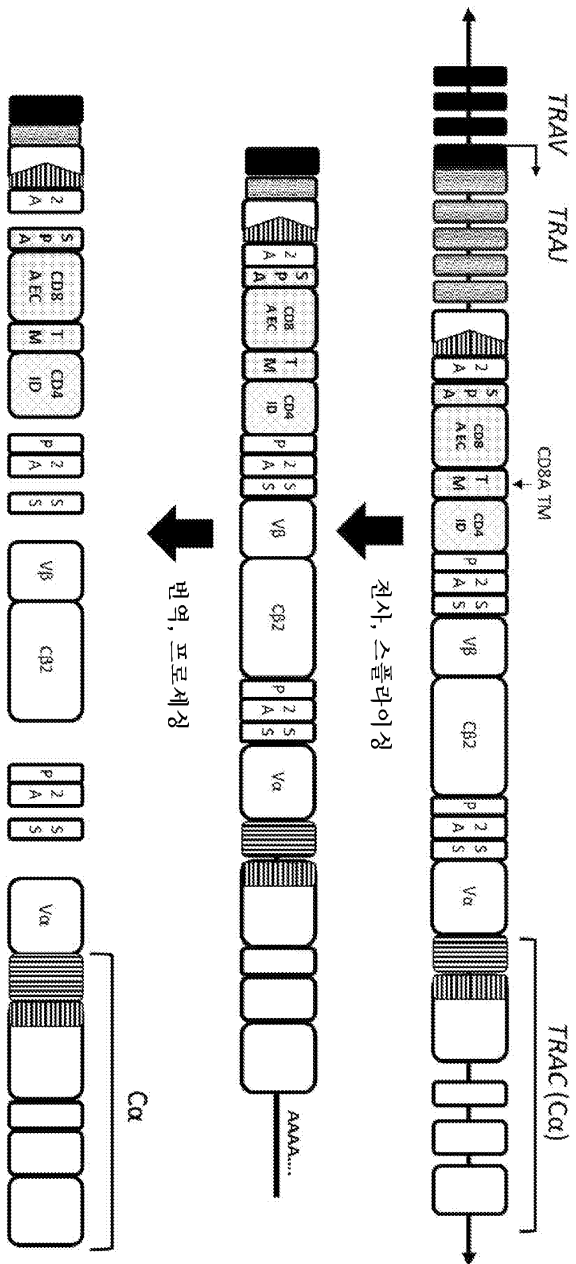


(CD8A[EC]-CD8B[ID]_CD8 산물 3)



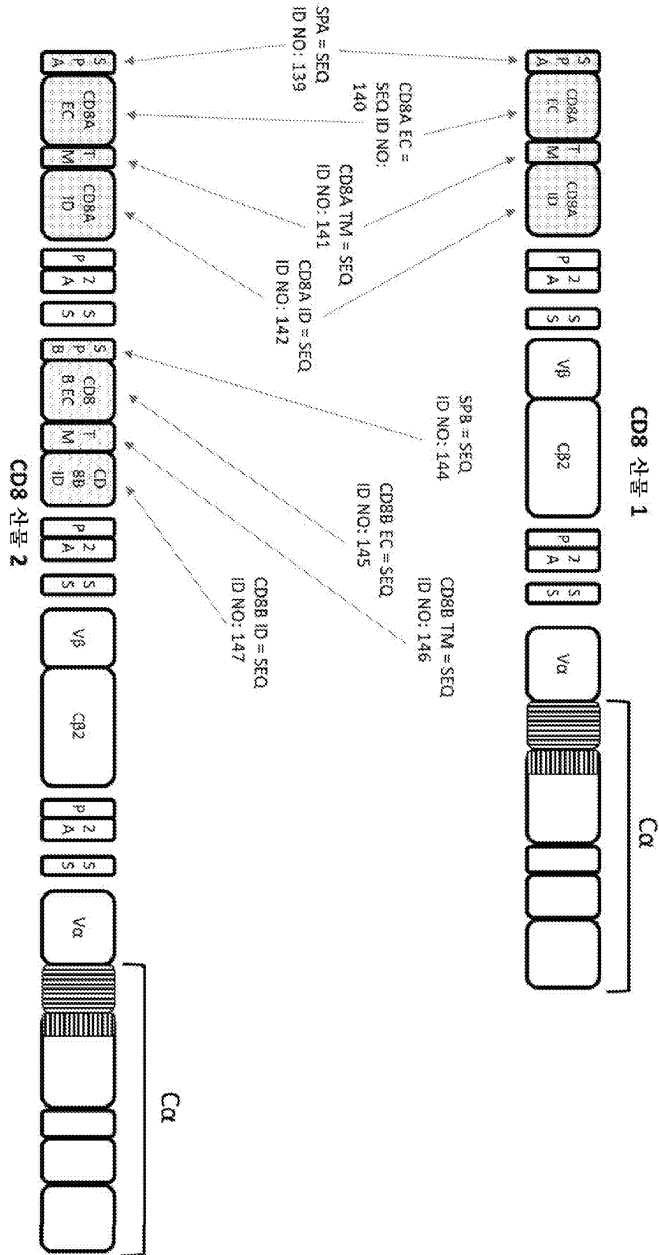
도면3c

(CD8a[EC]-CD4[ID]_CD8 산물 4)

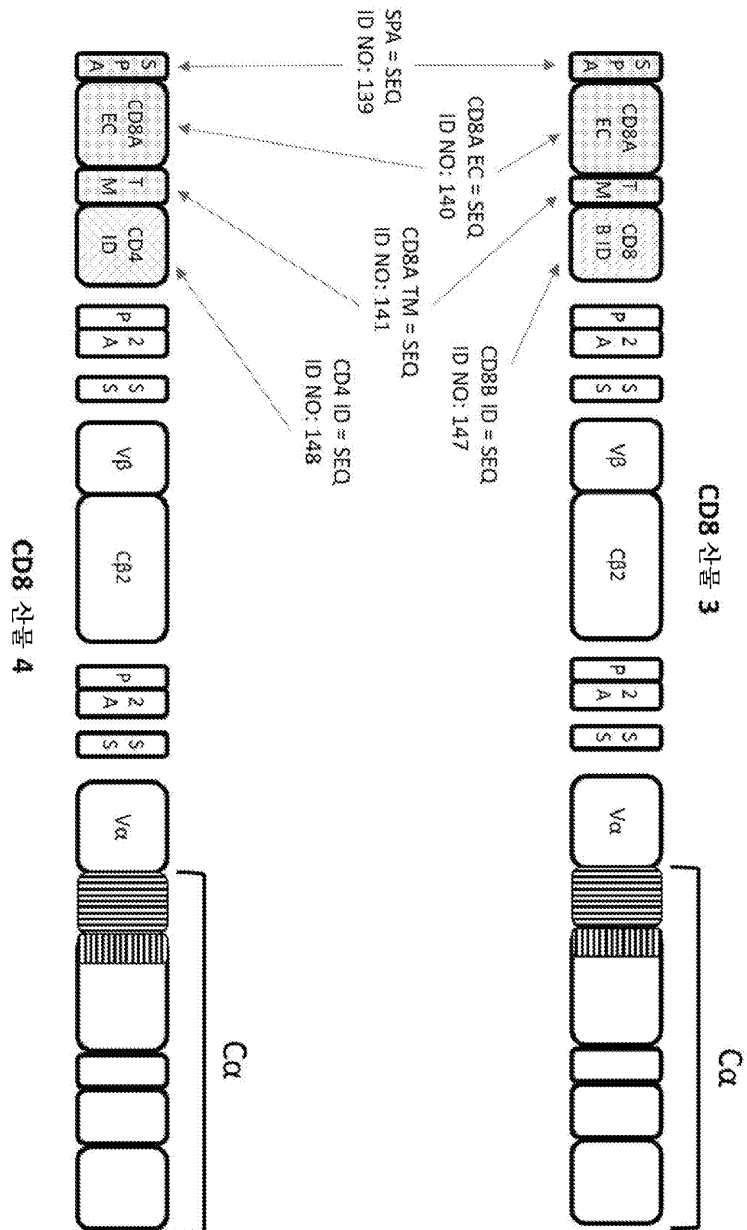


도면3d

도면4a



도면4b



네오TCR 산물 해석 서열

ACATTAAAAACACAATAATCCTACGGGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAAAGC
CTCCAGCAGCTCCTGCTTCTGAGGGTGAAAGGATAGACGCTGTGCTGCACTGACTCACTA
GCACCTCATCAGGGCCATATTTCTGCGAGGGTCAGTGGCTCCAACCTAACATTGTGGTACTT
TACAGTTTATTAATAAGATGTTTATATGGAGAAAGCTCTCATTTCTTCAGAAAGAGCTGGCT
AGGAAAGGTGGATGAGGCACCATATTCATTTTGCAAGGTGAAATTCCTGAGATGTAAAGAGCT
GCTGTGACTTGCTCAAGGCCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGTGGGCTTAGACGCAAGTGTG
TTCTGATTATAGTTCAAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCTGTGTAATGTGATAGATTT
CCCAACTTAATGCCAACATACCATTAACAACCTCCATTCTGCTAATGCCAGCTAAGTTGGGGA
GACCACTCCAGATTCGAAGATGTACAGTTGTCTGTGGCTTTTCCCATGCTGCTGCTTTA
CTGTGCCAGAGTTATATTTGCTGGGTTTGAAGAGATCCTATTAATAAAGAATAAGCAGT
ATTATTAAGTAGCCCTGCAATTCAGGTTTCTTGAGTGGCAGGGCCAGGCTGGCCGTGAACG
TTCACTGAAATCATGGCCCTTGGCCAGATGTAGGCTGTGCTGTCCCTGAGTCCAGTC
CATCAGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCC
AGCCCCACAGAGCCCCGCTTGTCCATCAGTGGCATCTGGACTCCAGCTGGGTTGGGGCA
AAGAGGGAAATGAGATCATGTCTTAACCTGATCTTGTGCCACAG

좌측 HR 아암 (SEQ ID NO:1)

ATATCCAGAAACCCTGACCCCTGCGGTGTACCAAGCTGAGAGACTTAATCCAGTG
ACAAGTCTGTCTGCCATTC

TRAC CDS (SEQ ID NO:2)

GAATTGCGGCTCCGGA

GSG 링커 1 (SEQ ID NO:3)

GCCACTAAGTCTTCCCTGTTGAACAAGGCTGGCGATGTTGAAGAAAAACCCCGG
TCCT

P2A (SEQ ID NO:4)

도면5i

도면5ii

ATGCCACCGGCTCTAGAACAAGCCTGCTGCTTTTGCCCTGCTGCTCCATGGCTC CAAGAAGATCTGCT	HGH/SS/2 (SEQ ID NO:5)
[[TRB_VDJ 서열, 네오TCR에 대해 특이적]]	네오TCR TRB_VDJ 서열에 대한 삽입 부위
CTGAAAAACGTGTTCCCTCCAAAAAGTGGCCGTGTCAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCC ACACACAGAAAGCCACACTGCTGTGCTGCTACCGGCTTCTACCCGATCACGTGGAACTG TCTTGGTGGTCAACGGGCAAGAAGGTGCACAGCGCGCTCAGCACAGATCCCAAGCCTCTGA AAGAACAGCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCTGTAGCAGACTGAGAGTGTCCGC CACCTTCTGGCAGAACCCCAAGAACCACTTCAGATGCCAGGTCAGTTCTACGGCCTGAGCG AGAACGATGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAAGCCTGTGACACAGATCGTGTGCCGAAG CCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTACCAGCGAGTCAIACCAAGCAGGGCGTGTCTGC CACCATCTGTATGAGATCTGCTCGGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGTGTGTGTGTCTCT GGTGTGATGGCTATGCTCTCCGGGGAAGCGCATCCCGAGGCC	TCR-베타/클론 (SEQ ID NO:7)
CGGGCCAAGCGG	푸린 절단 부위 (SEQ ID NO: 8)
GGCAGCGGC	GSG 링커 (SEQ ID NO:9)
GCCACCAACTTCAAGCTGCTGAAGCAGGCCGGCGAGCTGGAGGAAGAACCCCGCCCT	P2A (SEQ ID NO:10)
ATGCCACAGGCGAGCAACAATCTCTGCTGCTGGCCTTCGGAGCTGTGTGTGCTGTGCTGCT GCAAGAGGGTTCGCC	HGH SS (SEQ ID NO:11)

[[TRA_VDJ 서열, 네오TCR에 대해 특이적임]]

ATATTGAGAACCCCGATCCTGCTGTGTATCAGCTGCGGACAGCAAGAGCAGCGACACAAGAGC
GTGTGTTGTTC

ACCGATTTTGATTCTCAAAACAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTATATCACAGAC
AAAAGTGTGCTAGACATGAGGCTATGACTTCAAGAGCAACAGTGTGTGGCTGGAGCA
ACAAATCTGACTTTGCAATGTGCAAAACGCTTCAACAACAGCATTATCCAGAAGACACCTTCT
TCCCCAGCCCCAGG

TAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGACAGGCTGTTCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCC
CAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAACTCCTGATTTGGTGTCTCGGCTTATCCATTGCC
ACCAAAACCCCTCTTTTACTAAAGAAACAGTGAAGCTTGTCTGGCAGTCCAGAGAAATGACAC
GGGAAAAAAGCAGATGAAGAAGGTTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCT
CTCCAAGTGAAGTTCTGCTGCTGCTGCTTGTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTAGG
CCTCATTTCTAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCTCTCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTT
CCCAGCTCACTAAGTCAAGTCTCAACGAGTCACTCATTAACCAATCACTGATTGTGCCGG
CACATGAATGCACCCAGGTTGAAGTGGAGGAATTAAGAAAGTCAAGATGAGGGGTGTGCCCA
GAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGAGCCCATCTGTCAAGTGGGAAAAAGTCCAAATTAATTT
CAGATTGGAATGTGTTTAAGTCAAGGTTGAGAAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAAGTCAAG
GGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACAGCCCTACCAAGGGGCAGGGGAGAG
GACCTATAGAGGCTGGGAGCAGGAGCTCAATGAGAAAAAGGAGAGAGCAGCAGGCAATGA
GTTGAATGAAGGAGGAGGAGGGGGGTCAAGGGCTTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAG

GCTAGC

네오TCR TRA_VDJ 서열에
대한 삽입 부위

TCR-알파/불변
(SEQ ID NO:13)

TRAC CDS/ 우측 HR 아암(SEQ ID
NO: 14)

우측 HR 아암 (SEQ ID NO:15)

(SEQ ID NO:16)

도면5iii

도면5iv

CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAAAATCGAGCT
CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTTCCCTGGAA
CTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATCCTGTCGCTTCTCCT
TCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTACGCTGTAGGTATCTAGTTCGGTGTAGGTCGTT
CGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGACGAAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGG
TAACTATCGTCTTGAAGTCAACCCGGTAAAGACAGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG
GTACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTTCTTGAAGTGTGGCC
TAACTACGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTGTGAAAGCCAGTTACCTT
CGAAAAAAGAGTTGGTAGCTTTGATCCGGCAAAACCAACCCGCTGTAGCGGTGTTTTT
TTTGTTGCAAGCAGAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT

pBR322-기질 (SEQ ID
NO:17)

TTAGAAAAAATCATCGAGCATCAAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTAATACCA
TATTTTGA AAAAGCCGTTTCTGTATGAAGAGAAAACTCACCGAGGAGTTCCATAGGAT
GGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTGTCCAACATCAATACAACTATTAATTTT
CCCTGTCAAAAATAAAGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGTTGA
GAATGGCAAAAAGTTATGCAATTTCTTCCAGACTTGTCAACAAGCCCAATTACGCTGCTC
ATCAAAATCAGCTCGCATCAACCAAAACCGTTATTTATTCGTGATTGCGCTGAGCCAGACGAAA
TACGCGATCGCTGTAAAAAGGACAATTACAAAACAGGAATGCAACCGGCGCAGGAAC
ACTGCCAGCGCATCAACAATTTTCACTCGAATCAGGATATTTCTTAATACCTGGAATGCTG
TTTTTCGGGGATGCAAGTGTGAGTAACCATGATCATCAGGAGTACGGAATAAAATGCTTG
ATGTCGGAAGAAGGCAATAATTCGTCAGCCAGTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAAACATCA
TTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTGCGGCATCGGGCTTCCCATACAAG
CGATAGATTGTGCACTGATTGCGGACATTAATCGGAGCCCATTAATACCATATAAATCAG
CATCATGTTGGAATTAATCGCGGCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCAT

카나마이신 저항성 유전자
(kanR2) (SEQ ID NO:18)

AACACCCCTTGATTAAGCTGTTATGTAAGCAGACAGTTTATTTGTTATGATGATATATTTTATC
TTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC

카나마이신 프로모터
(SEQ ID NO:19)

CD8 산물 1 산물 해석 서열

ACATTAAAAACACAAAATCCTACGGGAATACTGAAAGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAAAAGC
CTCCAGCAGCTCTGCTTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGACTCATA
GCACTCTATCACGGCCATATCTGGCAGGGTCAGTGGCTCCAACATAACATTTGTTGGTACTT
TACAGTTTATTAATAATAGATGTTATATGGAGAAAGCTCTCATTTCTTCTCAGAAAGAGCCTGGCT
AGGAAAGGTGGATGAGGCAACATATTCATTTTGCAGGTGAAATTCCTGAGATGTAAGGAGCT
GCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAACGGTAGTGTGGGGCTTAGACGCAAGGTG
TTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGCAATCTCTGGTATATGTGATAGATTT
CCCAACTTAATGCCACATACCAATAAACCTCCCATTTCTGCTAATGCCAGCCTAAAGTTGGGGA
GACCACTCCAGATCCAAGATGTACAGTTGCTTTGTGGGCTTTTCCCATGCTGCTTTA
CTCTGCCAGAGTTATATGTCTGGGGTTTGAAGAAGATCTATTAATAAAGAATAAGCAGT
ATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAAGTTTCTTGAGTGGCAGGGCCAGGCTGGCCGTGAACG
TTCACTGAATCATGGCCTCTTGCGCAAGATTGATAGCTTGCTGTCCCTGAGTCCAGTC
CATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCC
AGCCCCACAGAGCCCCCGCCCTTTCATCACTGGCACTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCA
AAGAGGGAAATGAGATCAATGCTTAACCCGTGATCTTGTGCCACAG

좌측 HR 아암 (SEQ ID NO:22)

ATATCCAGAACCTTGACCCCTGCGGCTGTACCAGCTGAGAGACTTAATCCAGTGACCAAGTCTG
TCTGCCATATTC

TRAC CDS (SEQ ID NO:23)

GAATTCGGGCTCCGGA

GS6 링커 1 (SEQ ID NO:24)

GCCACTAACTTCAGCCTGTGAAGCAGGGCGGCGACGTTGAGGAAAAACCCCGGTCT

P2A (SEQ ID NO:25)

ATGGCCTTACCAGTGAACCGCCTTGCTCTGCGCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCC
G **CD8A** 신호 펩티드 (SEQ ID NO:26)

AGCCAGTTCGGGTGTCGCCGTGGATCGGACCTGGAACCTGGGCGAGACAGTGGAGCTG
AAGTGCCAGGTGCTGTGTCCAACCCGACGTCGGGTGCTGTGGCTCTTCCAGCGCGCG
GGCGCGCCAGTCCACCTTCTCTATACCTCTCCAAACAAGCCCAAGGGCGCGGAG
GGGCTGGACACCCAGCGGTTCTGGGCAAGAGTTGGGGACACCTTGTCTCACCCTG
AGGACTTCGCGCGAGAGAAGAGGGCTACTATTCTGCTCGCCCTGAGCAACTCCATCAT
GTACTTCAGCCACTTCGTGCGGGTCTTCTGCGCAGCGAAGCCCAACGACGCGCGCGC
GACCAACCAACCGCGCGCCCAACCATGCGTCGACGCGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTG
CCGGCCAGCGGGGGGGGCGCAGTGCACAGAGGGGCTGGACTTCGCTGTGAT

CD8A 세포외 도메인 (SEQ ID NO:27)

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGCTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACC
CD8A 막횡단 도메인 (SEQ ID NO:28)

CTTTACTGCAACCAAGGAACCGAAGACGTTTGGCAAATGTCCCGGCTGTGTCAAATC
GGGAGACAAGCCAGCCTTTCGGCGAGATACGTC **CD8A** 세포내 도메인 (SEQ ID NO:29)

AGGGCTAAACGG **푸린 절단 부위** (SEQ ID NO:30)

GAAATTCGGCTCCGGA **GSg** 링커 (SEQ ID NO:31)

GCCACTAACTTCTCCCTGTGAAACAAGGCTGGCGATGTTGAAGAAAAACCCCGTCTT **P2A** (SEQ ID NO:32)

ATGGCCACCGGCTCTAGAACAAAGCCTGTGCTCGCTTTTGGCCTGCTCTGCTCCATGGCTC **HGH/ss/2** (SEQ ID NO:33)
CAAGAAAGGATCTGCT

[[TRB_VDJ 서열, 네오TCR에 대해 특이적임]]

네오TCR TRB_VDJ 서열에
대한 삽입 부위

CTGAAAAACGTTGTTCCCTCCAAAGTGGCCGTGTTGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCC
ACACACAGAAAGCCACACTGTTGTTCTGGCTACCGGCTTACCCGATCAGTGGAACTG
TCTTGGTGGTCAACGGGCAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTCTGA
AAGAACAGCCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCTCTAGCAGACTGAGAGTGTCCGC
CACCTTCTGGCAGAACCCCAAGAACCACTTCAGATGCCAGGTCAGTTCTACGGCCTGAGCG
AGAACGATGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAAGCCTGTGACACAGATCGTGTGCGGAAG
CCTGGGGCAGAGCCGATGTGGCTTACCAGGAGTCAACAGCAGGCGGTGCTGTGC
CACCATCCTGTATGAGATCCTGCTCGGCAAGGCCACACATGACGCTGTGCTGTGCTCTCT
GGTGTGATGGCTATGTTCTCCCGGAGCGCATCCCCGAGGCC

TCR-베타/불변(SEQ ID
NO:35)

CGGGCCCAAGCGG

푸린 절단 부위 (SEQ ID NO:36)

GGCAGCGGC

GS6 링커 (SEQ ID NO:37)

GCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCGCGGACGTGGAGGAAACCCCGGCCCT

P2A (SEQ ID NO:38)

ATGGCCACAGGCGCAGAGAATCTCTGCTGCTGGCCTTCGGACTGCTGTCTGCCTTGCT
GCAAGAGGGGTTCCGCC

HGH/SS (SEQ ID NO:39)

[[TRA_VDJ 서열, 네오TCR에 대해 특이적임]]

네오TCR TRA_VDJ 서열에 대한 삽입 부위

ATATTCAGAACCCCGATCCTGCTGTGTATCAGCTGCGCGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGC
GTGTGTTTGTTC

TCR-알파/불변 (SEQ ID
NO:41)

도면6iii

ACCGATTTTGATTCTCAACAACAATGTGCACAAAGTAAGGATTCTGATGTATATACAGAC
AAAACTGTGTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGTGGCCTGGAGCA
ACAAATCTGACTTGCATGTGCAACGCTTCAACACAGCATTATCCAGAAGACACCTTCT
TCCCAGGCCAGG

TRAC CDS/ 우측 HR 아암
(SEQ ID NO:42)

TAAGGGCAGCTTTGGTGCCCTCGCAGGCTGTTTCTTCTGCTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCC
CAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGCTCGGCTTATCCATTGCC
ACCAAAACCCTCTTTTACTAAGAAACAGTGAAGCCTTGTCTGGCAGTCCAGAGAATGACAC
GGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGCCCCAGCCTCAGTCT
CTCCAAGTGAAGTTCTGCTGCTGCTGCTTGTCTCAGACTGTTGCCCTTACTGCTCTTAGG
CCTCATTTCAAGCCCCCTTCCAAGTTGCCCTCTCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTT
CCGAGCTCACTAAGTCAAGTCTCACGCACTCACTCAITTAACCAACCAATCACTGATTGTCCGG
CACATGAATGCACCAAGGTGTGAAGTGGAAGATTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGCCCCA
GAGGAAGCACCAITTTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAAGCTGGGAAAAAGTCCAATAIACTT
CAGATTGGAATGTGTTTAACTCAGGGTTGAGAAAAACAGCTACCTTCAGGACAATAAGTCAAG
GGAAGGGCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAG
GACCTATAGAGGCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGAGAAAGCAGCAGGCAATGA
GTTGAATGAAGGAGGCGGGGGTCAAGGGCTTCTAAGGCATGAGAGGGGTAGACAG

우측 HR 아암 (SEQ ID
NO:43)

GCTAGC

(SEQ ID NO:44)

도면6iv

CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCT
CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACGAGCGTTTCCCTGGAAAG
CTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCT
TCGGGAAGCGTGGCGTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTAICTAGTTCGGTGTAGGTCGTT
CGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGACGAAACCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGG
TAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACGACTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG
GTACACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGTACAGAGTTCTTGAAGTGTGGCC
TAACTACGGGTACACTAGAAGAACAGATATTGTGTATCTGCGCTGTGTGAAGCCAGTTACCTT
CGGAAAAAGAGTTGTAGCTCTGTATCCGGCAAAACCAACCGCTGGTAGCGGTGTTTTT
TTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCCGAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT

**pBR322_기질 (SEQ ID
NO:45)**

TTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAAATGAAACTGCAATTATTATATCAGGATTATCAATACCA
TATTTTGA AAAAGCCGTTTCTGTATGAAGGAGAAAAACTCACCGAGGAGTTCCATAGGAT
GGCAAGATCTGTGATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACCAACTATTAAATTC
CCCTGTCAAAAATTAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCAATGAGTACGACTGAATCCGTTGA
GAATGGCAAAAGTTATGCAATTTCTTCAGACTTGTCAACAGGCGCAGCCATTACGCTCGTC
ATCAAAATCACCTCGCATCAACCAAAACCGTTATTCATTCTGTGATGTGCGCTGAGCCAGACGAAA
TACGGGATCGCTGTAAAAAGGACATTAACAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAAC
ACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACTGAAATCAGGATATCTTTTAATACCTGGAATGCTG
TTTTCCGGGGATCGCAGTGTGTAGTAACCATGCAATCAGGAGTACGGATAAATGCTTG
ATGTCGGGAAGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTAGTGTGACCAATCTCATCTGTAAACATCA
TTGGCAACGCTACCTTTGCCAGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCATACAAG
CGATAGATTGTGCACTGATGCCCCGACATTAATCGGAGCCCATTTATACCAATATAAATCAG
CATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCTCGACGTTTCCGTTGAATATGGCTCAT

**카나마이신 저항성
(kanR2) (SEQ ID NO:46)**

AACACCCCTTGATTACTGTTATGTAAAGCAGACAGTTTATTTGTTATGATGATATATTTTATC
TTGTGCAATGTAAACATCAGAGATTTTGAGACAC

**카나마이신 프로모터 (SEQ
ID NO:47)**

CD8 산물 2 산물 핵산 서열

ACATTAAAAAACACAAAAATCTACGGGAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAAAAGC
CTCAGCAGCTCCTGCTTTCTGAAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGACTCATA
GCACTCTATCACGGCCATATTTCTGGCAGGGTCAGTGGCTCCAACCTAACATTTGTTGGTACTT
TACAGTTTATTAAATAGATGTTATATGGAGAAAGCTCTCATTTCTTTCTCAGAAAGAGCTGGCT
AGGAAAGGTGATGAGGCACCATATTCATTTTGCAGGTGAAATTCCTGAGATGTAAGGAGCT
GCTGTGACTTGTCAAGGCTTATATCGAATGAAGAAACGGTAGTGTGGGGCTTAGACGCAAGTG
TTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGCAATCTCTGGTAAATGTAATGATGATTT
CCCACTTAATGCCACATACCAATAAACCTCCCATTTCTGTAATGCCAGCTAAAGTTGGGGA
GACCACTCCAGATCCAAGATGTACAGTTGCTTTGCTGGGCTTTTCCCATGCTGCTTTTA
CTCTGCAGAGTTATATGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCTATTAATAAAGAATAAGCAGT
ATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAAGTTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCTGGCCGTGAACG
TTCACTGAAATCATGGCTCTTGCCCAAGATTGATAGCTTGCTGCTGAGTCCAGTC
CATCAGCAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCGTAATAAGCATGAGACCGTGACTTGGC
AGCCCCACAGAGCCCCGCTTGTCCATCACTGGCACTGGACTCCAGCTGGGTTGGGGCA
AAGAGGGAAATGAGATCATGTCTAACCCCTGATCCTTGTCCACAG

좌측 HR 아암 (SEQ ID NO:49)

ATATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAAGAGACTCTAAATCCAGTGACCAAGTCTG
TCTGCCATTC

TRAC CDS (SEQ ID NO:50)

GAATTCGGGCTCCGGA

GSG 링커 1 (SEQ ID NO:51)

GCCACTAAGTTCAGCCTGTGAAGCAGGCCGGCGACGTTGAGGAAAAACCCCGTCTCT

P2A (SEQ ID NO:52)

도면7i

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCCCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCC
G **CD8A** 신호 펩티드 (SEQ
ID NO:53)

AGCCAGTTCGGGTGTGCCGCTGGATCGGACCTGGAACTGGGCGAGACAGTGGAGCTG
AAGTGCCAGGTGTGCTGTCCAACCCGACGTGGGCTGTGCTCTTCCAGCCGCGG
GCGCCGCCAGTCCACCTTCTCTATACCTCTCCAAAAACAAGCCCAAAGGCGCCGAG
GGGCTGGACACCCAGCGGTCTCGGGCAAAGGTTGGGGACACCTTGTCCTCACCTG
AGCGACTTCGCCGAGAGAACGAGGGCTACTAATTTCTGCTCGCCCTGAGCACTCCATCAT
GTACTCAGCCACTTGTGTCCGGTCTTCTGCGAAGCCCAACGACGACGCCAGCGCCGC
GACCAACCAACACCGGCGCCACCATCGGTGCAAGCCCTGTCCCTGCGCCCAAGAGCGTG
CCGCCAGCGGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGAT

CD8A 세포내 도메인
(SEQ ID NO:54)

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCTGTCACTGGTTATCACCC
CD8A 막횡단
도메인 (SEQ ID NO:55)

CTTACTGCAACCACAGAGAACCGAAGACGTGTTGCAATGTCCCGGCTGTGTCAATC
GGGAGACAAAGCCAGCCTTTCGGCGAATACGTC **CD8A** 세포내 도메인
(SEQ ID NO:56)

AGAACAAGCGG 푸린 절단 부위 (SEQ ID NO:57)

GGCTCCGGA **GSG** 링커 (SEQ ID NO:58)

GCTACCAATTTAGCCTCTGAAGCAGGCTGGCGATGTTGAGGAAAAACCTGTCCC **P2A** (SEQ ID NO:59)

ATGCGGCGCGGCTGTGCTCCTCTTGCGCGGCAAGCTGACAGTTCTCCATGGCAACTCAGT
C **CD8B** 신호 펩티드 (SEQ
ID NO:60)

도면7ii

CD8B 세포외 도메인
(SEQ ID NO:61)

CTCCAGCAGACCCCTGCATACATAAAGGTGCAAAACCAACAAGATGGTGTGCTGTCTGCGA
GGCTAAATCTCCCTCAGTAACATGCCATCTACTGGCTGAGACAGCGCCAGGCACCGAGCA
GTGACAGTCACCACGAGTTCCTGGCCCTCTGGGATTCCGCAAAAGGGACTATCCACGGTGA
AGAGGTGGAACAGGAGAAAGATAGCTGTGTTGCGGATGCAAGCCGGTTCATTCTCAATCTC
ACAAGCGTGAAAGCCGGAAGACAGTGGCATCTACTCTGCATGATGTCGGAGCCCCGAGC
TGACCTTCGGGAAGGGAAGCACTCAGCTGAGTGTGTTGATTCTTCCCACTGCCCCAGCCC
ACCAAGAAGTCCACCCCTCAAGGAAGAGAGTGTGCCGGTTACCCAGGCCAGAGACCCAGAAG
GGCCCACTTTGTAGCCCC

CD8B 막횡단
도메인 (SEQ ID NO:62)

ATCACCCCTTGCCCTGCTGTGGCTGGCGTCCCTGTTCTGCTGGTTCCCTGGGAGTGCCCAT
C

CD8B 세포내 도메인
(SEQ ID NO:63)

CACCTGTGCTGCCGGGGAGGAGAGCCCGGCTTGTTTCATGAACAATTTTACAAA

푸린 절단 부위 (SEQ ID NO:64)

AGGGCTAAACGG

GS6 링커 (SEQ ID NO:65)

GAAATTCGGCTCCGGA

P2A (SEQ ID NO:66)

GCCACTAAGTCTCTCCCTGTTGAAACAAGGCTGGCGATGTTGAAGAAAAACCCGGTCTT

HGH/SS/2 (SEQ ID NO:67)

ATGGCCACCGGCTCTAGAACAAAGCTGTGCTGCTTTGGCCTGCTGTGCTCCCATGGCTC
CAAGAAAGGATCTGCT

도면7iii

[[TRB_VDJ 서열, 네오TCR에 대해 특이적임]]

네오TCR TRB_VDJ 서열에
대한 삽입 부위

CTGAAAAACGTTGTTCCCTCCAAAAAGTGCGCCGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCC
ACACACAGAAAGCCACACTCGTGTGCTGCTACCGGCTTCTACCCCGATCACGTGGAAC TG
TCTTGGTGGTCAACGGCAAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAAGCAGATCCCGAGCCTCTGA
AAGAACAGCCCCGCTCTGAACGACAGCGCGTACTGCTGTCTAGCAGACTGAGAGTGTCCGC
CACCTTCTGGCAGAACCCCAAGAAACCACTTCAGATGCCAGGTCCAGTTCTACGGCCTGAGCG
AGAACGATGAGTGGAACCCAGGACAGAGCCCAAGCCTGTGACACAGATCGTGTGCCGAAG
CCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAAGCGAGTCAIACCAAGCAGGGCGTGTCTGC
CAACATCCTGTATGAGATCCTGCTCGGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGTGTGTGTCTCT
GGTGTGATGTGTGTCTCTCCGGGAAGCGCATCCCCGAGGCC

TCR-배타/불변 (SEQ ID
NO:69)

CGGGCCAAAGCGG

푸린 절단 부위 (SEQ ID NO:70)

GGCAGCGGC

GSg 령키 (SEQ ID NO:71)

GCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCT P2A (SEQ ID NO:72)

ATGGCCACAGGCGAGCAACAATCTCTGCTGCTGGCCTTCGGACTGTGTCTGCTGCTGCT
GCAAGAGGGTTCCGCC HGH/SS/2 (SEQ ID NO:73)

[[TRA_VDJ 서열, 네오TCR에 대해 특이적임]]

네오TCR TRA_VDJ 서열에
대한 삽입 부위

ATATTGAGAACCCCGATCCTGCTGTGTATCAGCTGCGCGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGC
GTGTGTTTGTTC TCR-알파/불변 (SEQ ID
NO:75)

ACCGATTTGATTCTCAAAACAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCAGAGAC
AAACTGTGTAGACATGAGGTCTATGACTTCAGAGCAACAGTGTGTGGCTGGAGCA
ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCCTTCAACAACAGCAATTATCCAGAAGACACCTTCT
TCCCCAGCCCAGG

TRAC CDS/ 우측 HR 아암
(SEQ ID NO:76)

TAAAGGCGAGCTTTGGTGCCTTCGACAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCC
CAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAACTCCTCTGATTGGTGCTCGGCCCTATCCATTGCC
ACCAAAACCCTCTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACAC
GGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCT
CTCCAACGTAGTTCTCTGCTGCTGCTGCTTGTCTCAGACTGTTGCCCTTACTGCTCTTAGG
CCTCATTTAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCTCTCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTT
CCCAGCTACATAAGTCAGTCTCACGCAGTCATCAITTAACCCCAATCACTGATTGTGCCGG
CACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAAAAGTCAAGATGAGGGGTGCCCCA
GAGGAAGCACCATTTAGTTGGGGGAGGCCATCTGTAGCTGGGAAAAAGTCCAATAAATTT
CAGATTGGAATGTGTTTAACTCAGGGTTGAGAAAAACAGTACCTTCAGGACAAAAAGTCAG
GGAAAGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAG
GACCTATAGAGGCTGGGACAGAGGCTCAATGAGAAAGGAGAGGACGACGAGGCATGA
GTTGAATGAAGGAGGCGCGGCTCACAGGGCTTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAG

우측 HR 아암 (SEQ ID
NO:77)

GCTAGC

(SEQ ID NO:78)

도면7v

CGCGTTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCT
CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATTAAGATACGAGCGTTCCCCCTGGAAG
CTCCCTGCTGCGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCT
TCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCAIAGCTCACGCTGTAAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTT
CGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTATCCGG
TAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG
GTACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTCTACAGAGTCTTGAAGTGTGGCC
TAACTACGGCTACACTAGAAAGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTT
CGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAACCAACCGCTGGTAGCGGTGTTTT
TTTGTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAGATCCTTTGATCT

**pBR322_기절 (SEQ ID
NO:79)**

TTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAAATGAAAACCTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCA
TATTTTGA AAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGAT
GGCAAGATCCTGGTATCGGCTCGCATTCGCACTCGTCCAACATCAATACAACTATTAATTTTC
CCCTCGTCAAAAAATAAGGTTATCAAGTGAAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGA
GAATGGCAAAAAGTTTATGCAATTTCTTCAGACTTGTTCACAGGGCCAGCCATTAACGCTCGTC
ATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCTGAGGCCAGACGAAAA
TAGCGGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAAC
ACTGCCAGCGCATCAACAATTTTCACTGAATCAGGAATTTCTTAATACCTGGAAATGCTG
TTTTCCGGGGATCGAGTGTGAGTAACCATGATCATCAGGAGTACGGATAAATGCTTG
ATGTCGGAAGAGGCAATAATTTCCGTACGCCAGTTTATGCTGACCATCTCATCTGTAACATCA
TTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAACAACACTCTGGCGCATGGGCTTCCATACAAG
CGAATGATTGTGCACCTGATGTGCCCGACATATCGCGAGCCCAATTATACCAATATAAATCAG
CATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGGCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGCTCAT

**카나마이신 저항성
(KanR2) (SEQ ID NO:80)**

AACACCCCTTGTTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTATTTGTTCAATGATGATAATTTTATC
TTGTGCAATGTAAATCAGAGATTGTGAGACAC

**카나마이신 프로모터 (SEQ
ID NO:81)**

도면7vi

CD8 산물 3 산물 핵산 서열

ACATTAAAAACACAAAAATCCTACGGAAATACTGAAGAATGAGTCTCAGCACTAAGGAAAAAGC
CTCCAGCAGCTCCTGCTTTCTGAGGGTGAAGGATAGACGCTGTGGCTCTGCATGACTCACTA
GCACTCTATCACGGGCCATATTTCTGCAAGGTCAGTGGCTCCAACCTAACATTTGTTGGTACTT
TACAGTTTATTAAATAGATGTTTATATGGAGAAGCTCTCATTTCTTCAGAAAGAGCCGTGGCT
AGGAAAGGTGGATGAGGCACCAATTCATTTGCAAGGTGAATTCCTGAGATGTAAGGAGCT
GCTGTGACTTGTCAAGGCCCTTATTCGAGTAACGGTGAAGTGTGGGCTTAGACGCAAGTG
TTCTGATTTATAGTTCAAAACTCTATCAATGAGAGCAATCTCTGGTATGTGATAGATT
CCCACTTAATGCCACATACCAATAAACCTCCCATCTGCTAATGCCCAAGCCTAAGTTGGGGA
GACCACTCCAGATTCGAAGATGACAGTTTGTCTTGTGGGCTTTTCCATGCTGCTGCTTTA
CTGTGCCAGAGTTATATGCTGGGTTTTGAAAGAAGATCCTATTAATAAAGAATAAGCAGT
ATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAAGTTTCTTGAGTGGCAAGCCAGCCCTGCGCTGAACG
TTCACTGAATCAATGAGCCCTTGGCCAAAGATGATAGCTGTGCTGTCCCTGAGTCCCACTC
CATCAGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTATTTCCGATATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCC
AGCCCCACAGAGCCCCGCTGTTCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCCTGGGTTGGGGCA
AAGAGGGAAATGAGATCAATGCTTAACCTGATCTCTTGTCCACAG

좌측 HR 아암 (SEQ ID NO:83)

ATATCCAGAACCCTGACCCCTGCCGTGTACCAAGTGAAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAAGTCTG
TCTGCCCTATTC

TRAC CDS (SEQ ID NO:84)

GAATTGCGGCTCCGGA

GSG 링커 1 (SEQ ID NO:85)

GCCACTAAGTTCAGCCTGTGAAGCAGGCCGGGACGTTGAGGAAAAACCCCGGTCT

P2A (SEQ ID NO:86)

도면8i

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCTCTGCGGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCGCCAGGCC
G **CD8A** 신호 펩티드 (SEQ ID NO:87)

AGCCAGTTCGGGTGTGCGCGCTGGATCGGACCTGGAACCTGGGCGAGACAGTGGAGCTG
AAGTGCCAGGTGTGTGCCAACCCGACGTCGGGCTGCTGCTCTTCCAGCGCGCG
GGCGCGCCAGTCCCACCTTCTCTATACCTCTCCAAACAAGCCCCAAGGCGCCGAG
GGGTGGACACCCAGCGGTTCTCGGGCAAGGTTGGGGACACCTTCTCTCACCCTG
AGCGACTTCGCGCGAGAGAACGAGGGCTACTATTCTGCTCGGCCCTGAGCAACTCCATCAT
GTACTCAGCCACTTGTGCGGCTTCTCTGCGAAGCGAACCCACGACGCGCAGCGCCG
GACCAACAACCGCGCGCCACCATGCGTGCAGCCCTGTCCCTGGCCCAAGAGCGGTG
CCGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGCTGGACTTCGCTGTGAT

CD8A 세포외 도메인 (SEQ ID NO:88)

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCGGACTGTGGGTCCTTCTCTGCTCACTGGTTATCACC
CD8A 막횡단 도메인 (SEQ ID NO:89)

CACCTGTGTCGGCGGAGGAGAGCCCGGCTTGTTCATGAACAATTTACAAA **CD8B** 세포내 도메인 (SEQ ID NO:90)

AGGGCTAAACGG 푸린 절단 부위(SEQ ID NO:91)

GAAATTCGGCTCCGGA **GSG** 링커 (SEQ ID NO:92)

GCCACTAATTCTCCCTGTTGAACAAGGCTGGCGATGTGAAGAAAAACCCCGTCT **P2A** (SEQ ID NO:93)

ATGGCCACCGGCTTAGAACAAAGCCTGCTGCTTTTGGCCTGCTCTGCTCCCATGGCTC **HGH/5S/2** (SEQ ID NO:94)
CAAGAAGGATCTGCT

도면8ii

[[TRB_VDJ 서열, 네오TCR에 대해 특이적임]]

네오TCR TRB_VDJ 서열에
대한 삽입 부위

CTGAAAAACGTTGCCCTCCAAAAAGTGGCCGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCCGAGATCAGCC
ACACACAGAAAGCCACACTGCTGTGCTGGCTACCGGCTTACCCCGATCAGTGGAACCTG
TCTTGGTGGGTCAACGGGCAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACAGATCCCGAGCCTCTGA
AAGAACAGCCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCCTGTCTAGCAGACTGAGAGTGTCGCG
CACCTTCTGGCAGAAACCCAGAAACCACTTCAAGATGCCAGGTCCAGTTCTACGGCCTGAGCG
AGAACGATGAGTGGACCCAGGACAGAGCCCAAGCCTGTGACACAGATCGTCTGCCGAAG
CCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCGAGTCAATACAGCAGGCGGTGCTGTGC
CACCATCCTGTATGAGATCCTGCTCGGGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGCTGTGCTCT
GGTGTGATGGCTATGGTCTCCCGGAGCGCATCCCCGAGGCC

TCR-베타/불변 (SEQ ID
NO:96)

CGGGCCCAAGCGG

푸린 절단 부위 (SEQ ID NO:97)

GGCAGCGGC

GS6 링커 (SEQ ID NO:98)

GCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGCGGACGCTGGAGGAGAACCCTCCGCCCT P2A (SEQ ID NO:99)

ATGGCCACAGGCGCAGCAACAATCTCTGCTGCTGGCCTTCGGAGCTGCTGTCTGCCCTGGCT HGH/SS/2 (SEQ ID NO:100)
GCAAGAGGGTTCCGCC

[[TRA_VDJ 서열, 네오TCR에 대해 특이적임]]

네오TCR TRA_VDJ 서열에
대한 삽입 부위

ATATTCAGAACCCCGATCCTGCTGTGTATCAGCTGCGCGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGC TCR-알파/불변 (SEQ ID
GTGTGTTGTTC NO:102)

ACCGATTTTGATTCTCAAACAATATGTGCACAAAGTAAGGATTCTGATGTATATACACAGAC
AAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGTGGCTGAGCA
ACAACTGACTTTGCATGTGCAACGCTTCAACAACAGCATTAATCCAGAAAGACACCTTCT
TCCCCAGCCCAAG

TRAC CDS/ 우측 HR 아암
(SEQ ID NO:103)

TAAGGGCAGCTTTGGTGCTTCGACGGCTGTTTCTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCC
CAGAGCTGTGTCATGATGCTAAAACTCCTGATTGGTGTCTCGGCTTATCCATTGCC
ACCAAAACCTCTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTCTGGCAGTCCAGAGAATGACAC
GGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGAGAGGGCACGTGCCCAAGCCTCAGTCT
CTCCACTGAGTTCCTGCTGCTGCTGCTTGTGCTCAGACTGTTGCCCTTACTGCTCTTAGG
CCTCATTTAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCTCTCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTT
CCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCACTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGG
CACATGAATGCACCAAGGTGTTGAAGTGAAGGAATTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGCCCCA
GAGGAAGCACCATTTAGTTGGGGAGGCCCATCTGTCAAGCTGGGAAAAAGTCCAATAACTT
CAGATTGGAATGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAAGTCAAG
GGAAGGGCTCTGAAGAATACTACTGAAGATACCAAGCCCTACCAAGGGCAGGGGAGAG
GACCTATAGAGGCTGGGACAGAGACTCAATGAGAAAAAGAGAAGCAGCAGGCATGA
GTTGAATGAAGGAGGCGGGGCTCACAGGGCTTCTAGGCCATGAGAGGGTAGACAG

우측 HR 아암 (SEQ ID
NO:104)

GCTAGC

(SEQ ID NO:105)

도면8iv

CGCGTTGCTGGCGTTTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAATCGACGCT
CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGACTATAAAGATACGAGGCGTTTCCCTGGAAAG
CTCCCTCGCGCTCTCTGTTCGACCCTGCGGCTTACGGATACCTGTCGCTTTCTCCCT
TCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTCTCAGTTGGGTAGGTCGTT
CGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGACGGAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGG
TAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG
GTACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTTCTTGAAGTGTGGCC
TAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTT
CGAAAAAAGAGTTGGTAGCTTGTGATCCGGCAAAACAACCAACCGCTGTAGCGGTGTTTT
TTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT

**pBR322_기질 (Seq ID
NO.:106)**

TTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCA
TATTTTGA AAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGAT
GGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCGACTCGTCCAACATCAATACCACTATTAAATTTC
CCCTCGTCAAAAAATPAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGCTGA
GAATGGCAAAAGTTTATGCAATTTCTTCCAGACTTGTTCACAGAGGCCAATTAACGCTCGTC
ATCAAAATCACCTCGCATCAACCAAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCTGAGCCAGACGAAA
TAGCGGATCGCTGTTAAAAAGGACAATTACAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAAAC
ACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACTGAAATCAGGATATCTTCTAATACCTGGAATGCTG
TTTTTCCGGGGATCGAGTGTGTAGTAACCATGATCATCAGGAGTACGGATPAAAATGCTTG
ATGTCGGGAAGAAGGCATAAATTCCTGACGCAAGTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAAACATCA
TTGGCAACGCTACCTTTGCGCATGTTTCAGAAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAG
CGATAGATTGTGCACTGATTGCGGACATTATCGGAGCCCATTTATACCATATAAATCAG
CATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGCTCAT

**카나마이신 저항성
(kanR2) (Seq ID NO.:107)**

AACACCCCTTGTAATAGTTTATGTGAAGCAGACAGTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTATC
TTGTGCAATGTACATCAGAGATTTTGAGACAC

**카나마이신 프로모터 (Seq
ID NO.:108)**

CD8 산물 4 산물 핵산 서열

ACATTAAAAACACAAAAATCTCTACGGAAATACTGAAAGAATGAGTCTCAGCAGCTAAGGAAAAAGC
CTCCAGCAGCTCCTGCTTTCTGAGGGGTGAAGGATAGACGCTGTGCTGCACTGACTCAGTAC
GCACTCTATCAGGGCCATATTTCTGAGGGTCAGTGGCTCCAACTAACATTTGTTGGTACTT
TACAGTTTATTAAATAGATGTTTATGGAAGAGCTCTCATTTCTTCAGAAAGAGCCTGGCT
AGGAAAGGTGATGAGGCCATATTCATTTTGCAAGGTGAAATTCCTGAGATGTAAGGAGCT
GCTGTGACTTGGTCAAGGCCCTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAAGTG
TTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGCAATCTCTGTAATGTGATAGATTT
CCCACTTAATGCCAACATACCATAAAACCTCCCATTTCTGTAATGCCAGCTAAAGTTGGGA
GACCACTCCAGATTCGAAGATGTACAGTTTGCTTGTGGCTTTTCCCATGGCTGCTTTTA
CTGCCAGAGTTATATTTGCTGGGGTTTTGAAGAAAGATCTATTAATTAATAAAGAATAAGCAGT
ATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAAGTTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCTGGCCGTGAACG
TTCACTGAAATCATGGCCTTTGGCCAAAGATTGATAGCTTGTGCTGAGTCCAGTCCAGTC
CATCAGAGCAGCTGTTTCTAAGATGCTATTTCCGTAATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCC
AGCCCCACAGAGCCCCGCTTGTTCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCTGGGTTGGGGCA
AAGAGGGAAATGAGATCATGTCTTAACCTGATCTTGTGCCACAG

좌측 HR 아암 (SEQ ID
NO:110)

ATATCCAGAACCTTGACCCCTGCCGTGTACCACTGAGAAGACTTAATCCAGTGACAAGTCTG
TCTGCTATTTC

TRAC CDS (SEQ ID NO:111)

GAATTGGGCTCCGGA

GSG 링커 1 (SEQ ID NO:112)

GCCACTAAGCTTACGCTGTGAAGCAGGCCGGGACGTTGAGGAAAAACCCCGGTCTCT

P2A (SEQ ID NO:113)

도면9i

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCC
G **CD8A** 신호 펩타이드 (SEQ ID NO:114)

AGCCAGTTCGGGTGTCGCCGTGGATCGGACCTGGAACCTGGCGAGACAGTGGAGCTG
AAGTGCCAGGTGCTGTGTCCAACCCGACGTCGGGTGCTGCTGCTCCAGCGCGCGG
GCGCGCGCCAGTCCCACTTCTCTATACCTCTCCCAAAACAAGCCCAAGCGCGCGAG
GGGCTGGACACCCAGCGGTTCTGGGCAAGAGGTTGGGGACACCTTCGCTCACCTG
AGCGACTTCGCGCGAGAGAAGAGAGGGCTACTATTCTGCTGCGCCTGAGCAACTCCATCAI
GTACTTCAGCCACTTCGTGCGGTCTTCTGCGCAAGCGAAAGCCACGACGAGCCAGCGCGC
GACCAACCAACACCGCGCGCCACCATCGCGTCGACAGCCCTGTCCTGCGCCAGAGGCGTG
CCGGCCAGCGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCTGTGAT

CD8A 세포외 도메인 (SEQ ID NO:115)

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGTCCTTCTCCTGTCAGTGTTATCACCC **CD8A** 막횡단 도메인 (SEQ ID NO:116)

TGTGTCAGGTGCCCGCACCCGAAGGGCCCAAGCAGAGCGGATGTCTCAGATCAAGAGACTCC **CD4** 세포내 도메인 (SEQ ID NO:117)

AGGGCTAAACGGG 푸린 절단 부위 (SEQ ID NO:118)

GAATTGGGCTCCGGA GS6 링크 (SEQ ID NO:119)

GCCACTAAGTTCTCCCTGTTGAAACAGGCTGGCGATGTTGAAGAAACCCCGTCTT **P2A** (SEQ ID NO:120)

ATGGCCACCGGCTTAGAACAAGCCTGTGCTGCTTTTGGCCTGCTGCTCCCATGGCTC **HGH/SS/2** (SEQ ID NO:121)
CAAGAAAGGATCTGCT

도면9ii

[[TRB_VDJ 서열, 네오.TCR에 대해 특이 적임]]

네오.TCR TRB_VDJ 서열에
대한 삽입 부위

CTGAAAAACGTTGTTCCCTCCAAAAAGTGGCCGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCC
ACACACAGAAAAAGCCACACTGCTGTGTCTGGCTACCGGCTTCTACCCCGATCACGTGGAAGT
TCTTGGTGGGTCAACGGGCAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTCTGA
AAGAACAGCCCCGCTCTGAACGACAGCCGCTACTGCTGTCTAGCAGACTGAGAGTGTCCGC
CACCTTCTGGCAGAAACCCAGAAACCACTTCAAGTGCAGGTCAGTTCTACGGCCTGAGCG
AGAACGATGAGTGGATCCAGGACAGAGGCCAAGCCTGTGACACAGATCGTCTGCCGAAG
CCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTACAGCGAGTATACCAAGCAGAGGGCGTGTCTGTC
CACCATCCTGTATGAGATCCTGCTCGGCAAGGCCACACTGTACGCTGTGCTGCTGCTCT
GGTGTGATGGCTATGGTCTCCCGGAGCGCATCCCCGAGGCC

TCR-베타/불변 (SEQ ID
NO:123)

CGGGCCCAAGCGG

푸린 절단 부위 (SEQ ID NO:124)

GGCAGCGGC

GSG 링커 (SEQ ID NO:125)

GCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGCGCAGTGGAGGAGAACCCCGGCCCT P2A (SEQ ID NO:126)

ATGGCCACAGGCGCAGCAACATCTCTGCTGCTGGCCTTCGGACTGCTGTCTGCCCTGGCT HGH/SS/2 (SEQ ID NO:127)
GCAAGAGGGGTTCCGCC

[[TRA_VDJ 서열, 네오.TCR에 대해 특이 적임]]

네오.TCR TRA_VDJ 서열에
대한 삽입 부위

ATATTCAGAACCCCGATCCTGCTGTGTATCAGCTGCGCGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGC
GTGTGTTGTTTC TCR-알파/불변 (SEQ ID
NO:129)

도면9iii

ACCGATTTGATTCTCAAAACAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCAGAGAC
AAACTGTGTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGTGGCTGGAGCA
ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAACGCCCTTCAACAACAGCATTAATCCAGAAAGACACCTTCT
TCCCAGCCCAGG

TRAC CDS/ 우측 HR 아암
(SEQ ID NO:130)

TAAGGGCAGCTTTGGTGCCCTTGCAGGCTGTTCCTTGCTTCAAGGAATGCCAGGTTCTGCC
CAGAGCTGTGTCAATGATGTCTAAACCTCCTGTATTGGTGTCTCGGCTTATCCATTGCC
ACCAAAACCCTCTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTGTTCTGGCAGTCCAGAGATGACAC
GGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCT
CTCCAACTGAGTTCTGCTGCTGCTGCTGCTTGTCTCAGACTGTTGCCCTTACTGCTCTTAGG
CCTCATTTCTAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCTCTCTCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTT
CCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCAGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGG
CACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAATAAGTCAAGATGAGGGGTGCCCA
GAGGAAGCACCATTTAGTTGGGGGAGGCCATCTGTCAAGTGGGAAAAAGTCCAATTAACCTT
CAGATTGGAATGTGTTTAACTCAGGGTTGAGAAAAACAGCTACCTTCAAGACAAAAAGTCAG
GGAAGGGCTCTTGAAAGAAATGTACTTGAAGATACCAAGCCCTACCAAGGGCAGGGGAGAG
GACCTATAGAGGCGCTGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGAGAGGAGCAGGCGCATGA
GTTGAATGAAGGAGGCGGGCGGCTCACAGGGCTTCTAAGGCCATGAGAGGGTAGACAG

우측 HR 아암 (SEQ ID
NO:131)

GCTAGC

(SEQ ID NO:132)

도면9iv

CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCT
CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGACAGGACTATAAGATACCAAGCGTTCCCTCGAAG
CTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGCCCTTCTCCCT
TCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTAGTCTGTT
CGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAAGCCGACCGCTGCCCTTATCCGG
TAATATCGTCTTGAGTCCAAACCGGTAAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG
GTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGAGCGGTGTACAGAGTTCTTGAAGTGTGGCC
TAACTACGGCTACACTAGAAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTGTCTGAAGCCAGTTACCTT
CGAAAAAAGAGTTGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGTAGCGGTGTTTTT
TTTGTTCGAAGCAGCAGATTACGGCGAAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTGATCT

**pBR322_기원(SEQ ID
NO:133)**

TTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAAATGAAACTGCAATTTATCATATCAGGATTATCAATACCA
TATTTTGAAGAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGAGAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGAT
GGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTGTCCAACATCAATACAACCTAATTAATTTC
CCCTCGTCAAAAAATAAGGTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGA
GAAATGGCAAAAGTTATGCATTTCTTCAGACTTGTTCACAGAGGCCAGCCATTACGCTCGTC
ATCAAAATCACTCGCATCAACCAAAACGTTATTCATTCGTGATTGCGCTGAGCCAGACGAAAA
TACGCGATCGCTGTAAAGGACAATTACAACAGGAATGCAATGCAACCGGCGCAGGAAC
ACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTTCTTAATACCTGGAATGCTG
TTTTTCCGGGATCGCAGTGGTGAAGTAACCATGCAATCATCAGGAGTAGCGGATAAAAATGCTTG
ATGTCGGAAGAGGCAATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAAACATCA
TTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAG
CGATAGATTGTGCGACCTGATGGCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATATACCATATAAATCAG
CATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCAT

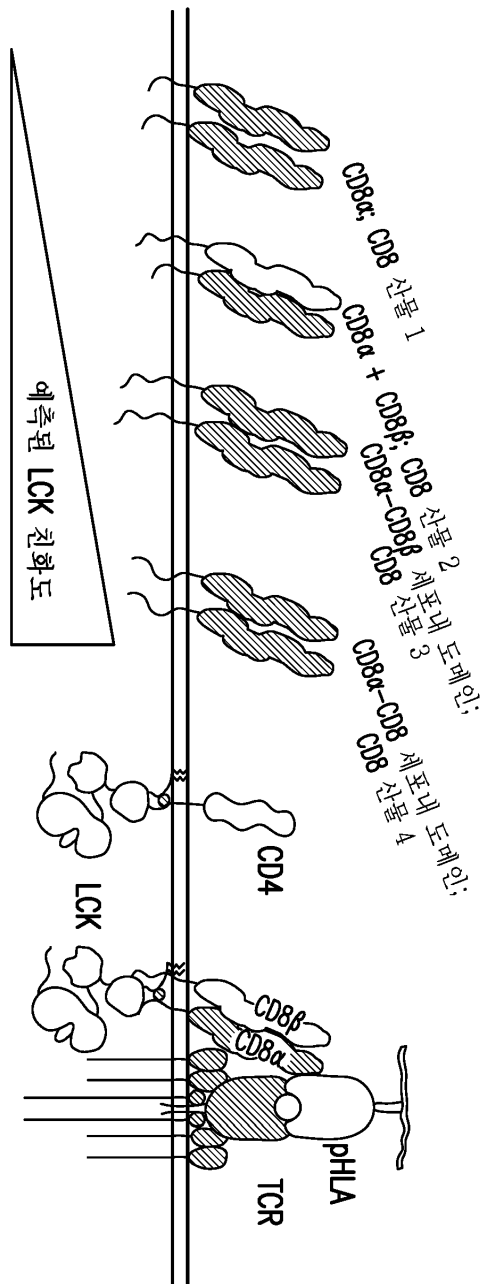
**카나마이신 저항성
(KanR2) (SEQ ID NO:134)**

AACACCCCTTGATTAAGTCTTATGTAAGCAGACAGTTTATTTGTTATGATGATATATTTTATC
TTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC

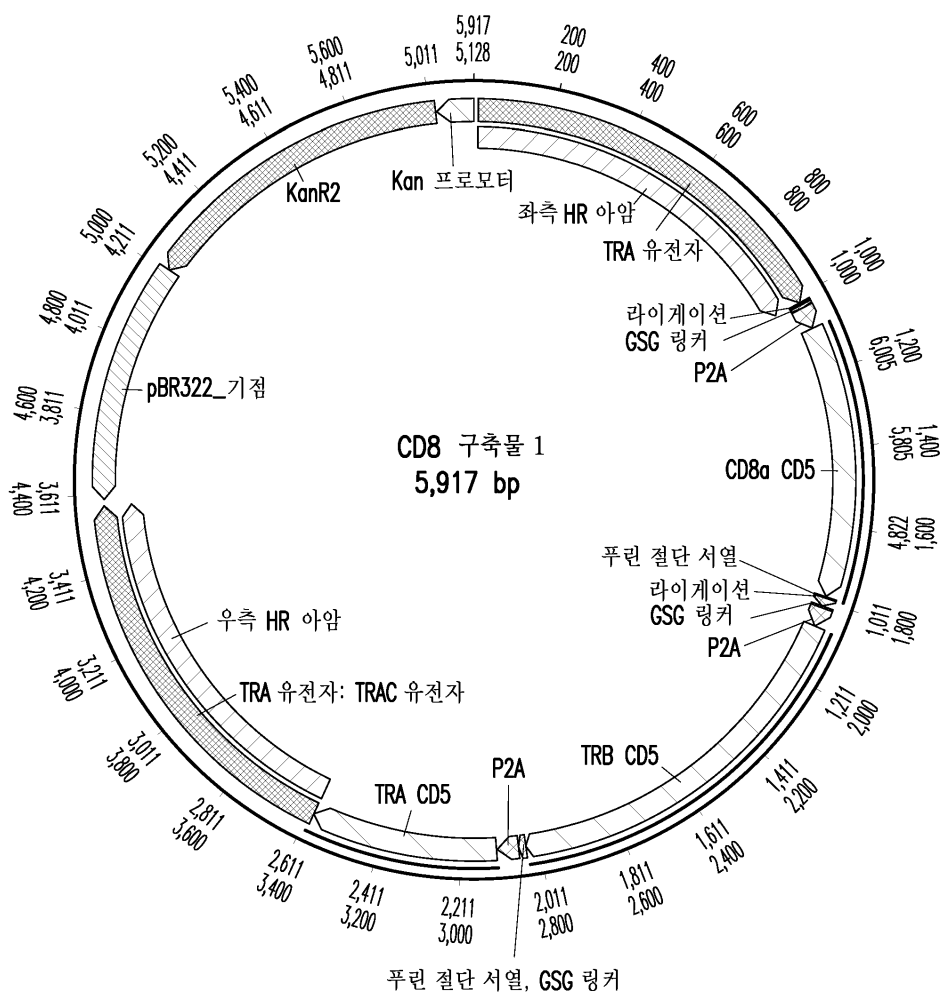
**카나마이신 프로모터(SEQ
ID NO:135)**

46면

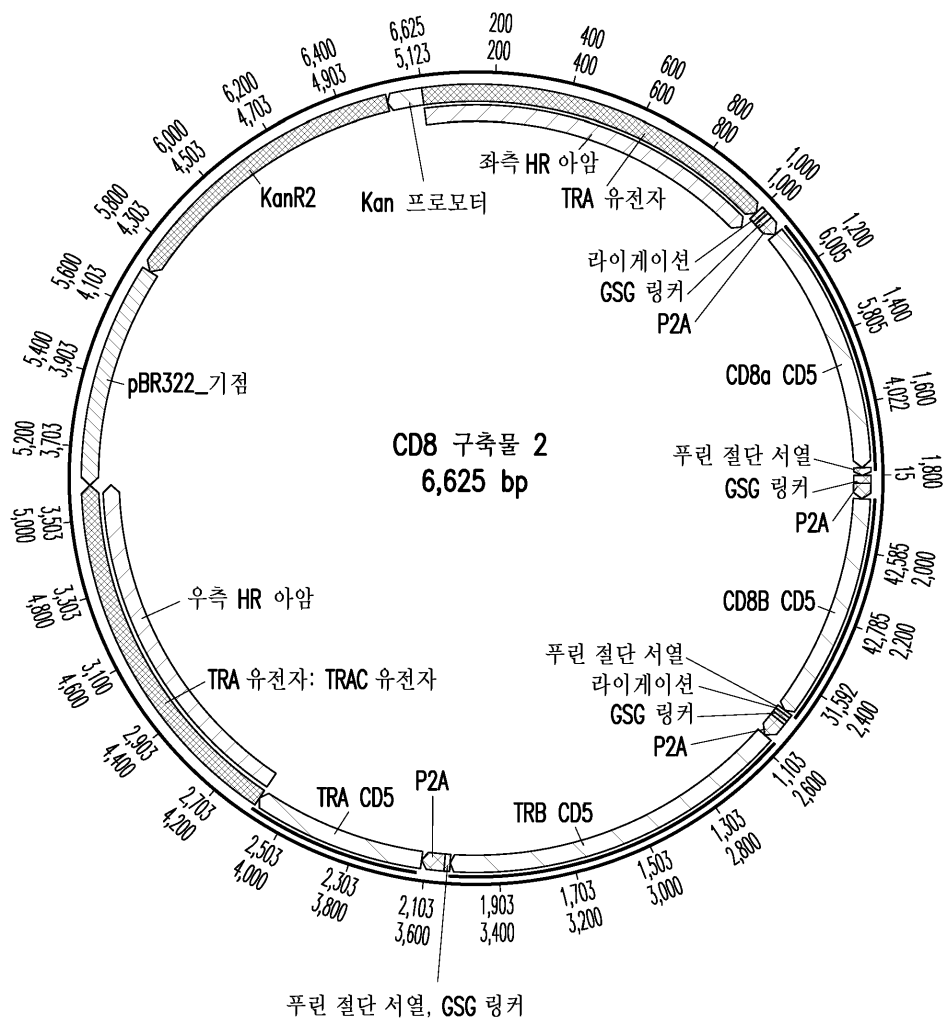
도면 10



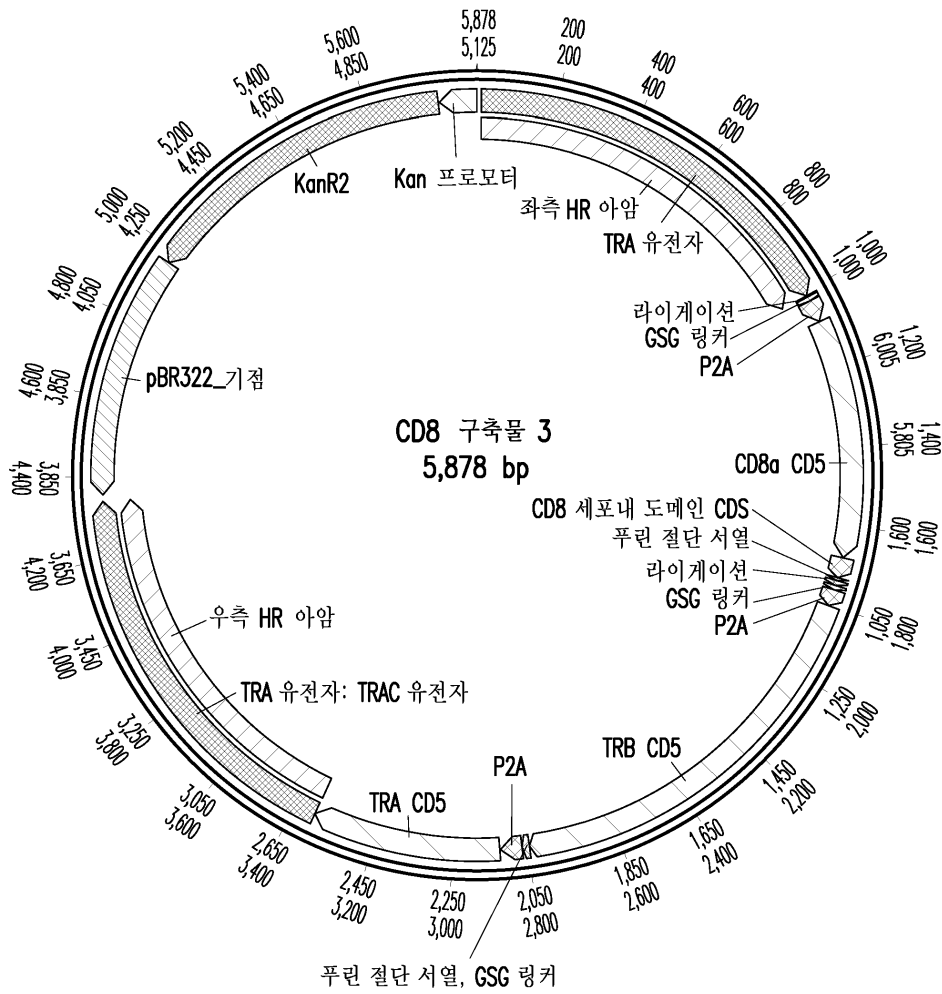
도면 11a



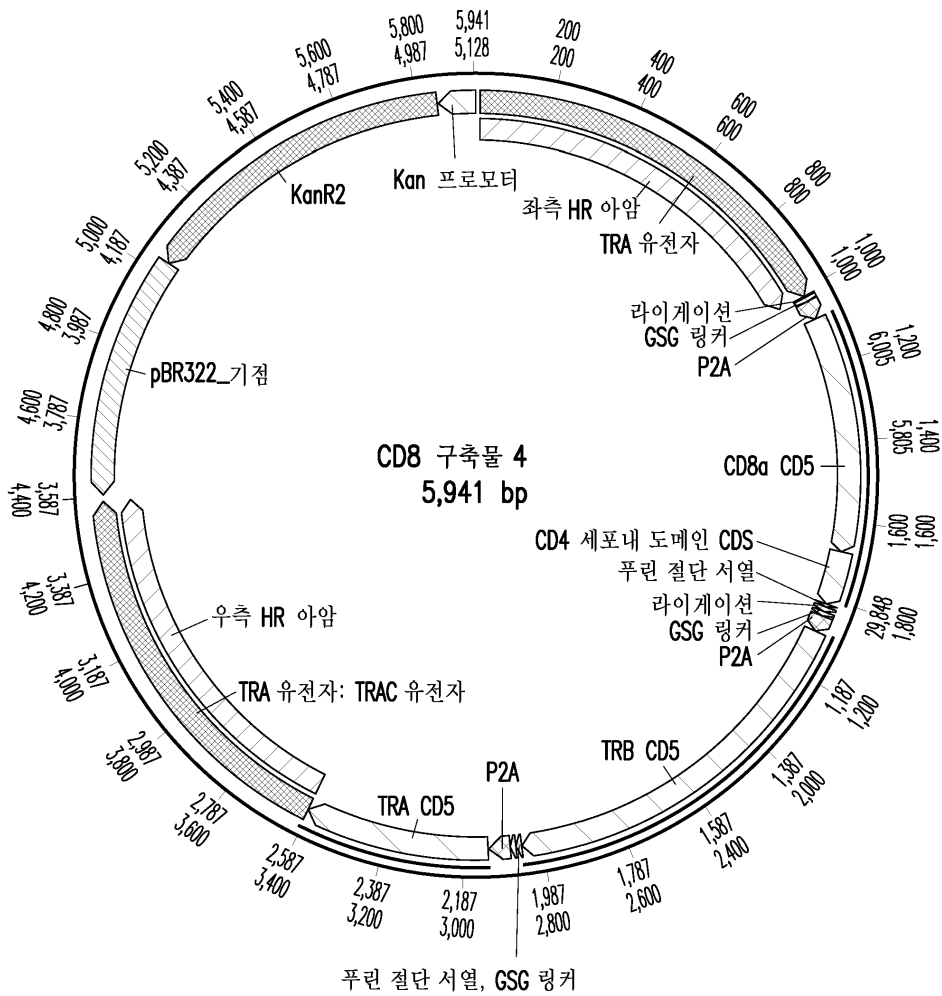
도면 11b



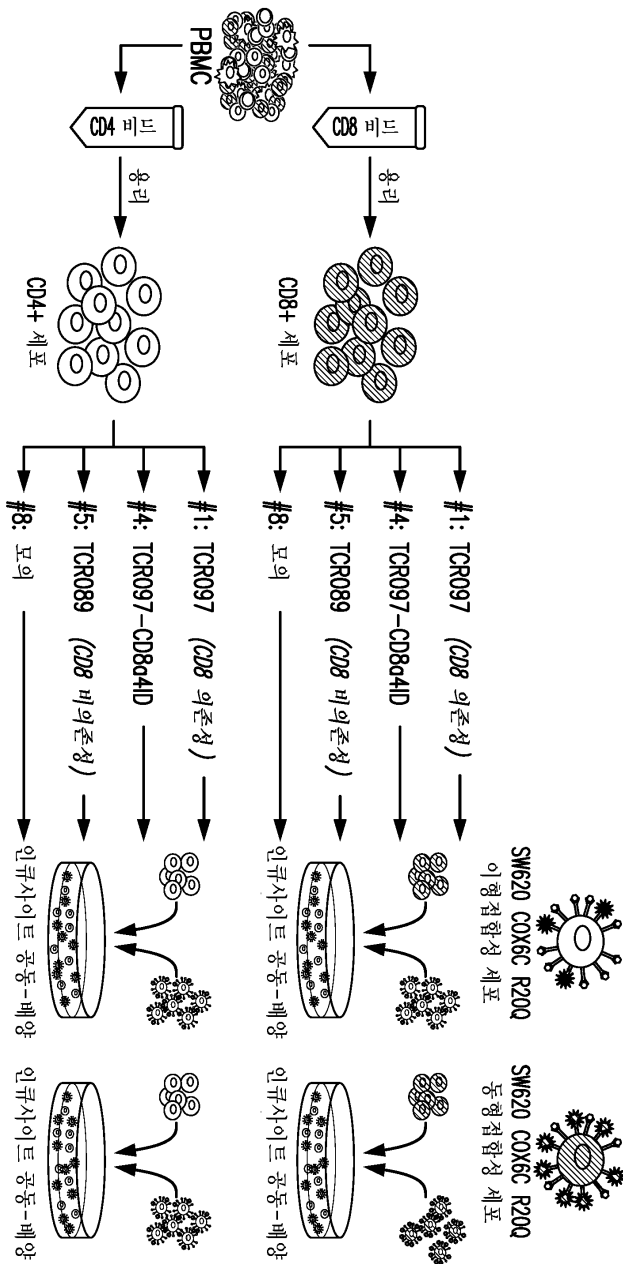
도면11c



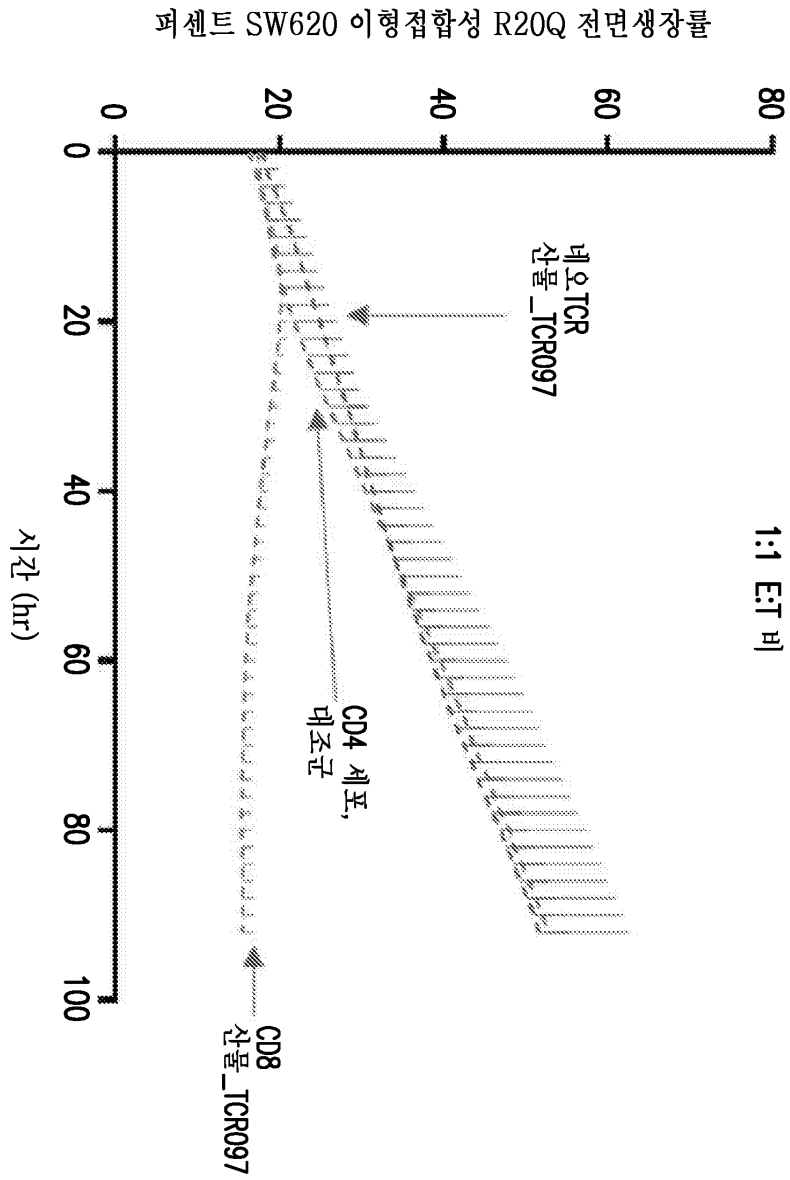
도면11d



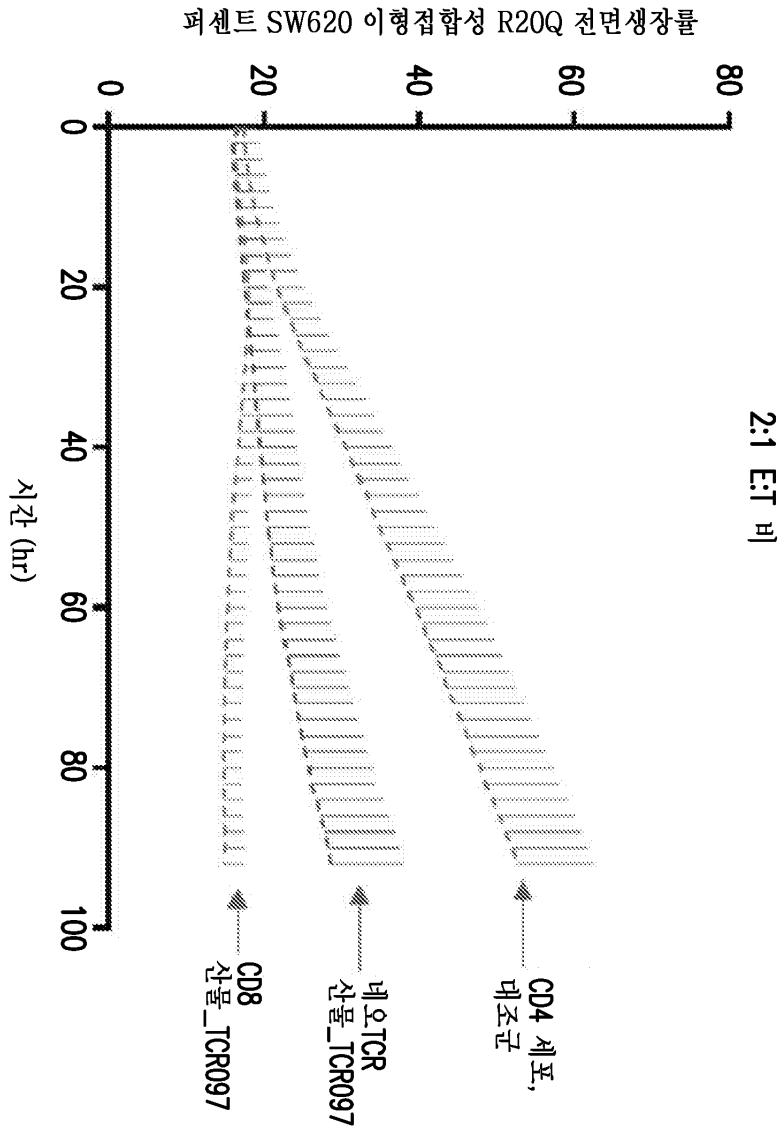
도면12



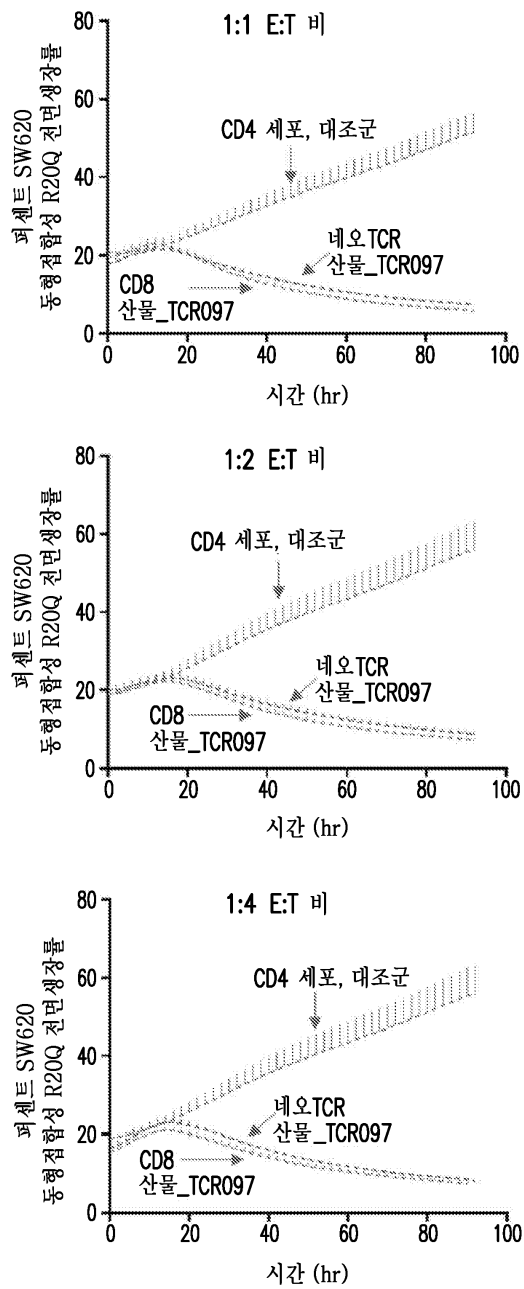
도면13a



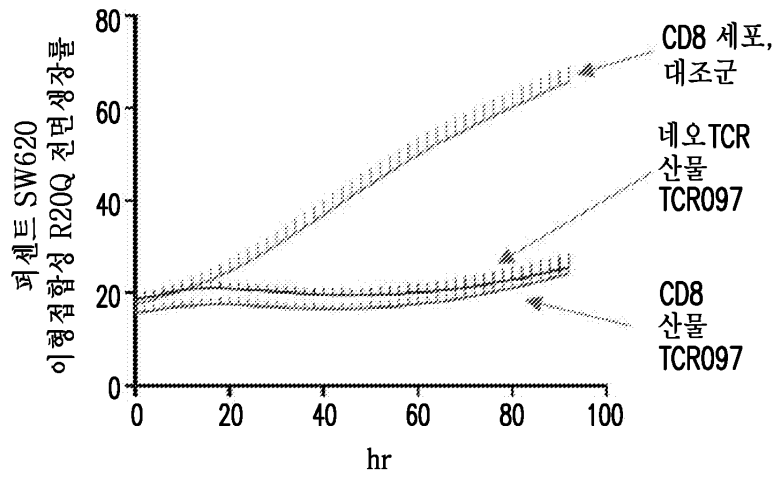
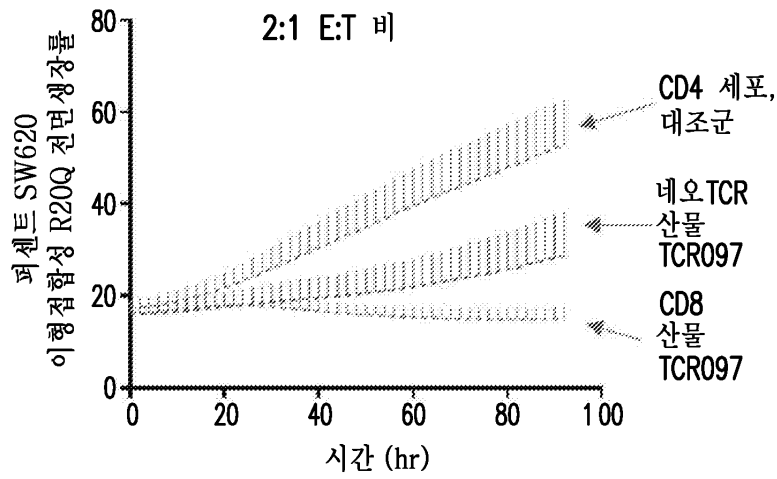
도면13b



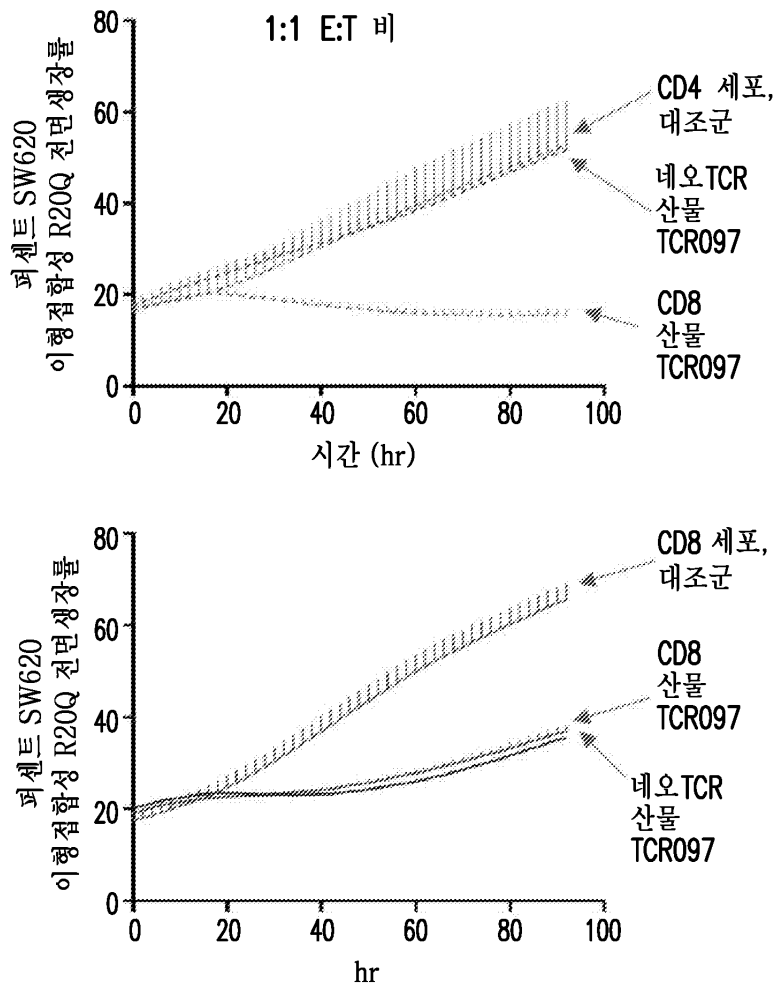
도면14



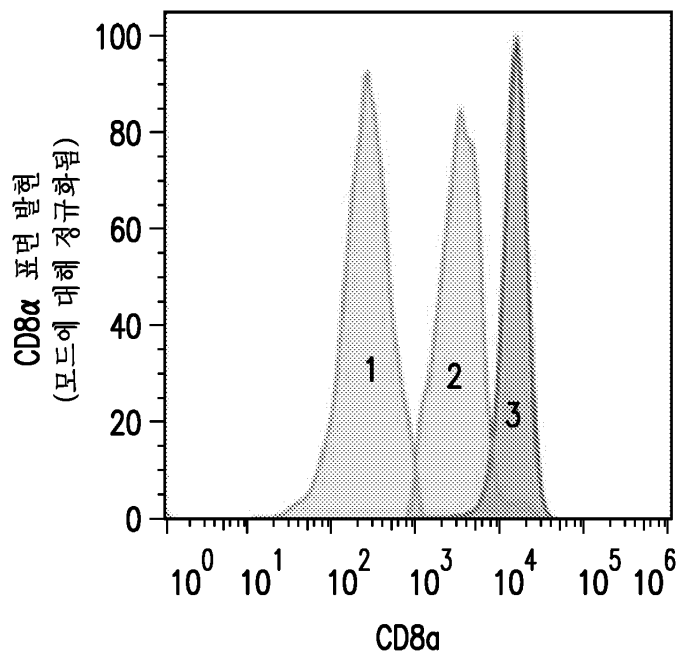
도면15a



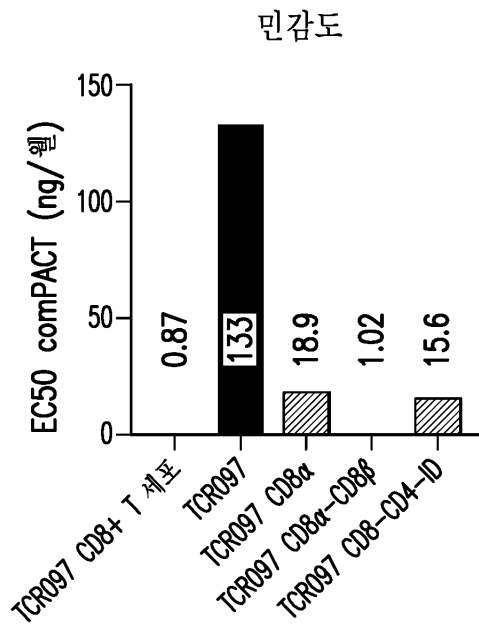
도면15b



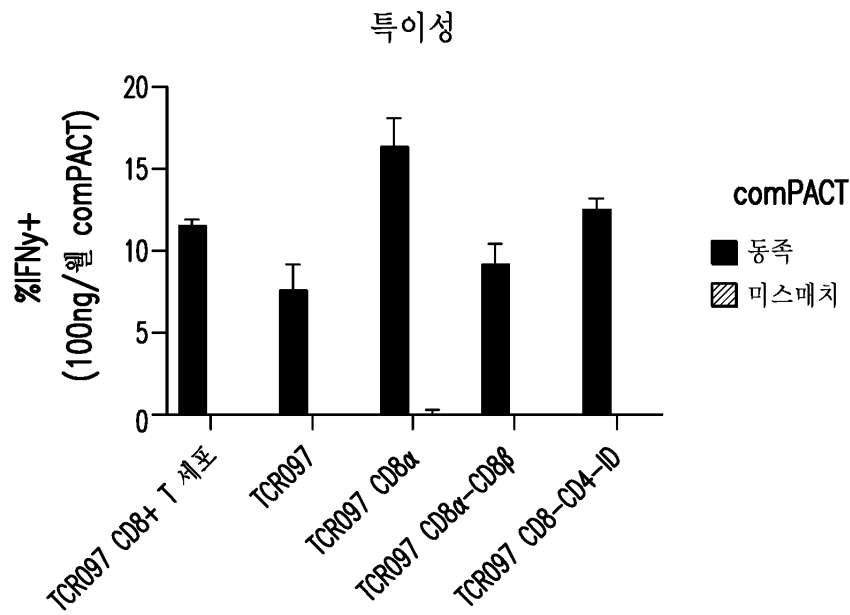
도면16



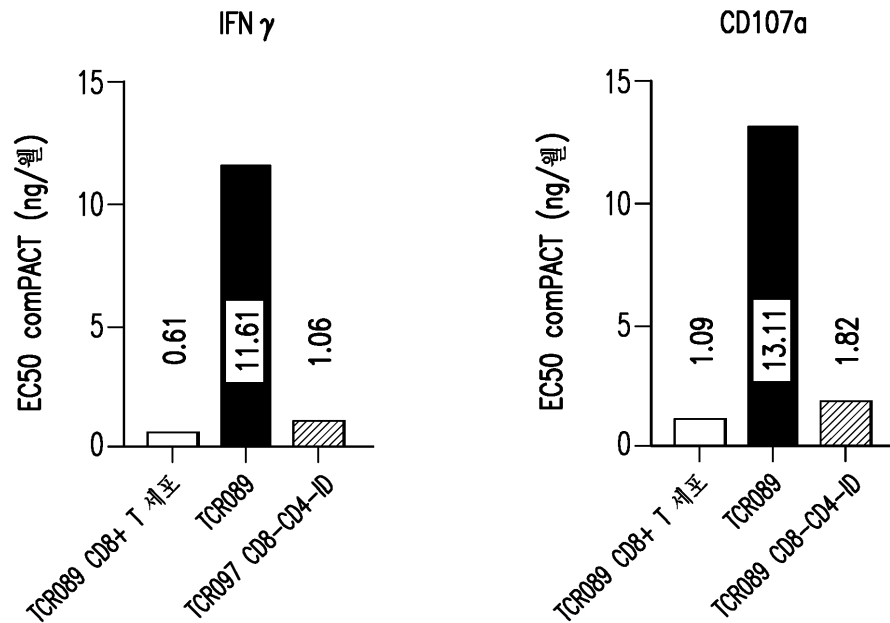
도면17a



도면17b



도면18



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> PACT PHARMA, INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF CANCER USING A CD8
ENGINEERED T CELL THERAPY

<130> 087520.0145

<140><141><150> 62/841,748

<151> 2019-05-01

<150> 62/841,753

<151> 2019-05-01

<160> 148

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 926

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Left Homology Arm_NeoTCR Product

<400> 1

acattaaaaa cacaaaatcc tacggaaata ctgaagaatg agtctcagca ctaaggaaaa 60

gcctccagca gctcctgctt tctgaggggtg aaggatagac gctgtggctc tgcattgactc 120

actagcactc tatcacggcc atattctggc agggctcagt gctccaacta acatttgttt 180

ggtactttac agtttattaa atagatgttt atatggagaa gctctcattt ctttctcaga 240

agagcctggc taggaagggtg gatgaggcac catattcatt ttgcagggtga aattcctgag 300

atgtaaggag ctgctgtgac ttgctcaagg cttatatcg agtaaacggt agtgctgggg 360

cttagacgca ggtgttctga tttatagttc aaaacctcta tcaatgagag agcaatctcc 420

tggtaatgtg atagatttcc caacttaatg ccaacatacc ataaacctcc cattctgcta 480

atgcccagcc taagttgggg agaccactcc agattccaag atgtacagtt tgctttgctg 540

ggcctttttc ccatgcctgc ctttactctg ccagagtta attgctgggg ttttgaagaa 600

gatacctatta aataaaagaa taagcagtat tattaagtag ccttgcatth caggtttcct 660

tgagtggcag gccaggcctg gccgtgaacg ttcactgaaa tcatggcctc ttggccaaga 720

ttgatagctt gtgcctgtcc ctgagtcacca gtccatcacg agcagctggt ttctaagatg 780

ctatttcccg tataaagcat gagaccgtga cttgccagcc ccacagagcc cgccttctgt 840

ccatcactgg catctggact ccagcctggg ttggggcaaa gagggaaatg agatcatgtc 900

ctaaccctga tctcttctgc ccacag 926

<210> 2

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TRAC CDS I_NeoTCR Product

<400> 2

atatccagaa cctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt 60

ctgtctgcct attc 74

<210> 3

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

GSG Linker_NeoTCR Product

<400> 3	
gaattcggct ccgga	15
<210> 4	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
P2A 1_NeoTCR Product	
<400> 4	
gccactaact tctccctgtt gaaacaggct ggcgatgttg aagaaaaccc cggtcct	57
<210> 5	
<211> 78	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
HGH Signal Sequence and Furin sequence_NeoTCR Product	
<400> 5	
atggccaccg gctctagaac aagcctgctg ctcgcttttg gccctgctctg cctcccatgg	60
ctccaagaag gatctgct	78
<210> 6	
<211> 345	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
Exemplary TRB_VDJ (TCR097)_NeoTCR Product	
<400> 6	
aatgctggtg tctactcagac cccaaaattc cgcctcctga agataggaca gagcatgaca	60
ctgcagtgtg cccaggatat gaaccataac tacatgtact ggtatcgaca agaccaggc	120
atggggctga agctgattta ttattcagtt ggtgctggta tctactgataa aggagaagtc	180
ccgaatggct acaacgtctc cagatcaacc acagaggatt tcccgtcag gctggagttg	240
gtgctccct cccagacatc tgtgtacttc tgtgccagct ccctacaggt tccctacaat	300
gagcagttct tcgggccagg gacacggctc accgtgctag aggac	345
<210> 7	

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TRBC Constant Region_NeoTCR Product

<400> 7

ctgaaaaacg tgttcctcc aaaagtggcc gtgttcgagc cttctgaggc cgagatcagc 60
cacacacaga aagccacact cgtgtgtctg gctaccggct tctaccccga tcacgtggaa 120

ctgtcttggg gggtaaacgg caaagagggtg cacagcggcg tcagcacaga tccccagcct 180
ctgaaagaac agcccgtctt gaacgacagc cgctactgcc tgtctagcag actgagagtg 240
tccgccacct tctggcagaa cccagaaaac cacttcagat gccaggtcca gttctacggc 300
ctgagcgaga acgatgagtg gacccaggac agagccaagc ctgtgacaca gatcgtgtct 360
gccgaagcct ggggcagagc cgattgtggc ttaccagcg agtcatacca gcagggcgtg 420
ctgtctgcca ccactctgta tgagatcttg ctggcaagg ccacactgta cgctgtgtctg 480
gtgtctgtct tggtgtgat ggctatggc tcccgaggagc gcatccccga ggcc 534

<210> 8

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Furin cleavage site_NeoTCR Product

<400> 8

cgggccaagc gg 12

<210> 9

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

GSG Linker_NeoTCR Product

<400> 9

ggcagcggc 9

<210> 10

<211> 57

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

P2A_NeoTCR Product

<400> 10

gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc ggcgacgtgg aggagaaccc cggccct 57

<210> 11

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

HGH SS_NeoTCR Product

<400> 11

atggccacag gcagcagaac atctctgctg ctggccttcg gactgctgtg tctgccttgg 60

ctgcaagagg gttccgcc 78

<210> 12

<211> 337

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Exemplary TRA-VDJ (TCR097)_NeoTCR Product

<400> 12

gtcagacag tctctcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gaccgtgacc 60

ctgagctgca catatgacac cagtgagagt gattattatt tattcttgta caagcgcct 120

cccagcaggc agatgattct cggtattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaaca 180

gagaatcggtt ttctctgtgaa cttccagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca 240

gactcacagc tgggggatgc cgcgatgtat ttctgtgctt ttgggaactt caacaaattt 300

tactttggat ctgggaccaa actcaatgta aaaccaa 337

<210> 13

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TCR-alpha/constant_NeoTCR Product

<400> 13

atattcagaa ccccgatcct gctgtgtatc agctgcgcca cagcaagagc agcgacaaga	60
gcgtgtgttt gtgc	74

<210> 14

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TRAC CDS/Right HR arm_NeoTCR Product

<400> 14

accgattttg attctcaaac aaatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca	60
gacaaaaactg tgctagacat gaggtctatg gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg	120
agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac	180
accttcttcc ccagcccagg	200

<210> 15

<211> 800

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Right HR arm_NeoTCR Product

<400> 15

taagggcagc tttggtgcct tcgcaggctg tttccttgct tcaggaatgg ccaggttctg	60
cccagagctc tggtaaatga tgtctaaaac tctctgatt ggtggtctcg gccttatcca	120
ttgccaccaa aaccctcttt ttactaagaa acagttagcc ttgttctggc agtccagaga	180
atgacacggg aaaaaagcag atgaagagaa ggtggcagga gagggcacgt ggcccagcct	240
cagtctctcc aactgagttc ctgcctgcct gcctttgctc agactgtttg ccccttactg	300
ctcttctagg cctcattcta agccccctct ccaagttgcc tctccttatt tctccctgtc	360
tgccaaaaaa tctttccag ctcactaagt cagtctcag cagtcactca ttaaccacc	420

aatcactgat tgtgccgcca catgaatgca ccaggtgttg aagtggagga attaaaaagt	480
---	-----

cagatgaggg gtgtgccag aggaagcacc attctagttg ggggagcca tctgtcagct	540
---	-----

gggaaaagtc caaataactt cagattggaa tgtgttttaa ctcagggttg agaaaacagc 600
 taccttcagg acaaaagtca gggaagggtc ctctgaagaa atgctacttg aagataccag 660
 ccctaccaag ggcagggaga ggaccctata gaggcctggg acaggagctc aatgagaaag 720
 gagaagagca gcaggcatga gttgaatgaa ggaggcaggg ccgggtcaca ggccttcta 780
 ggccatgaga gggtagacag 800

<210> 16

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Artificial Sequence_NeoTCR Product

<400> 16

gctagc 6

<210> 17

<211> 620

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

pBR322_origin_NeoTCR Product

<400> 17

cgcggtgctg gcgtttttcc ataggtccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg 60

ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg 120

aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt 180

tctcccttcg ggaagcgctg cgctttctca tagctcacgc ttaggtatc tcagttcggt 240

gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacct cccgttcagc ccgaccgctg 300

cgctttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact 360

ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt 420

cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct 480

gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac 540

cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc 600

tcaagaagat cctttgatct 620

<210> 18

<211> 810

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Kanamycin resistance gene (KanR2) _NeoTCR Product

<400> 18

ttagaaaaac tcacgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat	60
accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca	120
taggatggca agatcctggt atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc	180
tattaatttc cctcgtcaa aaataagggt atcaagttag aaatcacat gagtgacgac	240
tgaatccggt gagaatggca aaagtttatg catctttttc cagacttggt caacaggcca	300
gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacaaaa ccgttattca ttcgtgattg	360
cgcctgagcc agacgaaata cgcgatcgtc gttaaaagga caattacaaa caggaatcga	420
atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata tttcacctg aatcaggata	480
ttcttctaac acctggaatg ctgtttttcc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc	540
atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt	600
tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgcat gtttcagaaa	660
caactctggc gcatcgggct tcccatataa gcgatagatt gtcgcacctg attgcccgc	720
attatcgca gccatttat accatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg	780
cctcgacgtt tccggttgaa tatggctcat	810

<210> 19

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Kanamycin promoter _NeoTCR Product

<400> 19

aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcacg atgatatatt	60
tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt ttgagacac	99

<210> 20

<211> 5137

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Complete NeoTCR Product construct with TCR97 insertion_NeoTCR

Product

<400> 20

ggtaccacat taaaaacaca aaatcctacg gaaatactga agaatgagtc tcagcactaa	60
ggaaaagcct ccagcagctc ctgctttctg aggggtgaagg atagacgctg tggctctgca	120
tgactcacta gcactctatc acggccatat tctggcaggg tcagtggctc caactaacat	180
ttgttttgta ctttacagtt tattaaatag atgtttatat ggagaagctc tcatttcttt	240
ctcagaagag cctggctagg aaggtaggatg aggcaccata ttcattttgc aggtgaaatt	300
cctgagatgt aaggagctgc tgtgacttgc tcaaggcctt atatcgagta aacggtagtg	360
ctggggctta gacgcaggtg ttctgattta tagttcaaaa cctctatcaa tgagagagca	420
atctcctggt aatgtgatag atttccaac ttaatgcaa cataccataa acctccatt	480
ctgctaatac ccagcctaag ttggggagac cactccagat tccaagatgt acagtttgct	540
ttgctgggcc ttttcccat gcctgccttt actctgccag agttatattg ctggggtttt	600
gaagaagatc ctattaaata aaagaataag cagtattatt aagtagccct gcatttcagg	660
tttccttgag tggcaggcca ggccctggccg tgaacgttca ctgaaatcat ggccctcttg	720
ccaagattga tagcttctgc ctgtccctga gtcccagtc atcacgagca gctggtttct	780
aagatgctat ttcccgtata aagcatgaga ccgtgacttg ccagccccac agagccccgc	840
ccttgtccat cactggcatc tggactccag cctgggttgg ggcaaagagg gaaatgagat	900
catgtcctaa cctgatcct cttgtccac agatatccag aacctgacc ctgccgtgta	960
ccagctgaga gactctaat ccagtacaa gtctgtctgc ctattcgaat tcggctccgg	1020
agccactaac ttctccctgt tgaaacaggc tggcgaatgt gaagaaaacc ccggtcctat	1080
ggccaccggc tctagaacaa gcctgctgct cgcttttggc ctgctctgcc tcccatggct	1140
ccaagaagga tctgctaata ctggtgtcac tcagacccca aaattccga tctgaagat	1200
aggacagagc atgacactgc agtgtacca ggatatgaac cataactaca tgtactggta	1260
tcgacaagac ccaggcattg ggctgaagct gatttattat tcagttgggt ctggtatcac	1320
tgataaagga gaagtccga atggctacaa cgtctccaga tcaaccacag aggatttccc	1380
gctcaggctg gatttggctg ctccctccca gacatctgtg tacttctgtg ccagctccct	1440
acaggttccc tacaatgagc agttcttcgg gccagggaca cggtcacccg tgctagagga	1500
cctgaaaaac gtgttccctc caaaagtggc cgtgttcgag ccttctgagg ccgagatcag	1560

ccacacacag aaagccacac tcgtgtgtct ggctaccggc ttctaccccg atcacgtgga	1620
actgtcttgg tgggtcaacg gcaaagaggt gcacagcggc gtcagcacag atccccagcc	1680
tctgaaagaa cagcccgtct tgaacgacag ccgctactgc ctgtctagca gactgagagt	1740
gtccgccacc ttctggcaga accccagaaa ccacttcaga tgccaggtcc agttctacgg	1800
cctgagcgag aacgatgagt ggaccagga cagagccaag cctgtgacac agatcgtgtc	1860
tgccgaagcc tggggcagag ccgattgtgg ctttaccagc gagtcatacc agcagggcgt	1920
gctgtctgcc accatcctgt atgagatcct gctcggcaag gccacactgt acgctgtgct	1980
gggtgtctgt ctggtgtcga tggctatggt ctcccgaggag cgcatcccg aggcccgggc	2040
caagcggggc agcggcgcca ccaacttcag cctgctgaag caggccggcg acgtggagga	2100
gaaccccgcc cctatggcca caggcagcag aacatctctg ctgctggcct tcggactgct	2160
gtgtctgcct tggtgtcaag agggttccgc cgctcagaca gtcactcagt ctcaaccaga	2220
gatgtctgtg caggaggcag agaccgtgac cctgagctgc acatatgaca ccagtgagag	2280
tgattattat ttattctggt acaagcagcc tcccagcagg cagatgattc tcgttattcg	2340
ccaagaagct tataagcaac agaatgcaac agagaatcgt ttctctgtga acttcagaa	2400
agcagccaaa tccttcagtc tcaagatctc agactcacag ctgggggatg ccgcgatgta	2460
tttctgtgct ttgggaact tcaacaaatt ttactttgga tctgggacca aactcaatgt	2520
aaaacaaat attcagaacc ccgatcctgc tgtgtatcag ctgcgcgaca gcaagagcag	2580
cgacaagagc gtgtgtttgt tcaccgattt tgattctcaa acaaatgtgt cacaaagtaa	2640
ggattctgat gtgtatatca cagacaaaac tgtgctagac atgaggtcta tggacttcaa	2700
gagcaacagt gcgtggcct ggagcaacaa atctgacttt gcatgtgcaa acgccttcaa	2760
caacagcatt attccagaag acaccttctt cccagccca ggtaagggca gctttggtgc	2820
cttcgcaggc tgtttccttg cttcaggaat ggccaggttc tgcccagagc tctggtcaat	2880
gatgtctaaa actcctctga ttggtggtct cggccttata cattgccacc aaaacctct	2940
ttttactaag aaacagtgag ccttgttctg gcagtcagga gaatgacacg ggaaaaaagc	3000
agatgaagag aaggtggcag gagagggcac gtggcccagc ctcagtctct ccaactgagt	3060
tcctgcctgc ctgccttgc tcagactgtt tgccccttac tgctcttcta ggcctcattc	3120
taagccccct ctccaagtig cctctcctta ttctccctg tctgccaaaa aatctttccc	3180
agctcactaa gtcagtctca cgcagtcact cattaacca ccaatcactg attgtgccgg	3240
cacatgaatg caccaggigt tgaagtggag gaattaaaaa gtcagatgag ggggtgtgcc	3300
agaggaagca ccattctagt tgggggagcc catctgtcag ctgggaaaag tccaaataac	3360
ttcagattgg aatgtgtttt aactcagggt tgagaaaaca gctaccttca ggacaaaagt	3420

caggggaaggg ctctctgaag aaatgctact tgaagatacc agccctacca agggcagggg 3480
gaggacccta tagaggcctg ggacaggagc tcaatgagaa aggagaagag cagcaggcat 3540

gagttgaatg aaggaggcag ggccgggtca cagggccttc taggcatga gagggtagac 3600
aggctagccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa 3660
aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt 3720
ccccctggaa gtcacctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg 3780
tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc 3840
agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 3900
gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta 3960

tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct 4020
acagagtctt tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggtatc 4080
tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa 4140
caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa 4200
aaagatctc aagaagatcc ttgatcttt agaaaaactc atcgagcatc aaatgaaact 4260
gcaatttatt catatcagga ttatcaatac catatttttg aaaaagccgt ttctgtaatg 4320
aaggagaaaa ctcaccgagg cagttccata ggatggcaag atcctggtat cggctctgca 4380

ttccgactcg tccaacatca atacaacctt ttaatttccc ctctcaaaa ataaggttat 4440
caagtgagaa atcacatga gtgacgactg aatccggtga gaatggcaaa agtttatgca 4500
tttctttcca gacttgttca acagccagc cattacgctc gtcacaaaa tcaactcgcat 4560
caaccaaacc gtiattcatt cgtgattgcg cctgagccag acgaaatacg cgatcgctgt 4620
taaaaggaca attacaaaca ggaatcgaat gcaaccggcg caggaacact gccagcgcat 4680
caacaatatt ttcacctgaa tcaggatatt cttctaatac ctggaatgct gtttttccgg 4740
ggatcgcatg ggtgagtaac catgcatcat caggagtacg gataaaatgc ttgatggtcg 4800

gaagaggcat aaattccgtc agccagttaa gtctgacct ctcatctgta acatcattgg 4860
caacgtacc ttigccatgt ttcagaaaca actctggcgc atcgggcttc ccatacaagc 4920
gatagattgt cgcacctgat tgcccgacat tatcgcgagc ccatttatac ccatataaat 4980
cagcatccat gttggaattt aatcgcggcc tcgacgttcc cgttgaata tggctcataa 5040
cacccttgtt attactgttt atgtaagcag acagttttat tgttcatgat gatataat 5100
tatcttgtgc aatgtaacat cagagatttt gagacac 5137

<210> 21

<211> 5140

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Complete NeoTCR Product construct with TCR89 insertion_NeoTCR
Product

<400> 21

ggtaccacat taaaaacaca aaatcctacg gaaatactga agaatgagtc tcagcactaa	60
ggaaaagcct ccagcagctc ctgctttctg aggggtgaagg atagacgctg tggctctgca	120
tgactcacta gcactctatc acggccatat tctggcaggg tcagtggctc caactaacat	180
ttgtttggta ctttacagtt tattaaatag atgtttatat ggagaagctc tcatttcttt	240
ctcagaagag cctggctagg aaggtggatg aggcaccata ttcattttgc aggtgaaatt	300
cctgagatgt aaggagctgc tgtgacttgc tcaaggcctt atatcgagta aacggtagtg	360
ctggggctta gacgcaggtg ttctgattta tagttcaaaa cctctatcaa tgagagagca	420
atctcctggt aatgtgatag atttcccaac ttaatgcaa cataccataa accteccatt	480
ctgctaatgc ccagcctaag ttggggagac cactccagat tccaagatgt acagtttgct	540
ttgctgggcc tttttcccat gcctgccttt actctgccag agttatattg ctggggtttt	600
gaagaagatc ctattaaata aaagaataag cagtattatt aagtagccct gcatttcagg	660
tttccttgag tggcaggcca ggccctggccg tgaacgttca ctgaaatcat ggccctcttg	720
ccaagattga tagcttgtgc ctgtccctga gtcccagtc atcacgagca gctggtttct	780
aagatgctat ttcccgtata aagcatgaga ccgtgacttg ccagccccac agagccccgc	840
ccttgtccat cactggcatc tggactccag cctgggttgg ggcaaagagg gaaatgagat	900
catgtcctaa cctgatcct cttgtccac agatatccag aacctgacc ctgccgtgta	960
ccagctgaga gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcgaat tcggctccgg	1020
agccactaac ttctccctgt tgaaacaggc tggcgatgtt gaagaaaacc ccggtcctat	1080
ggccaccggc tctagaacaa gcctgctgct cgtttttggc ctgctctgcc tcccatgget	1140
ccaagaagga tctgctgatg ctggaatcac ccagagccca agatacaaga tcacagagac	1200
aggaaggcag gtgaccttga tgtgtcacca gacttggagc cacagctata tgttctggta	1260
tcgacaagac ctgggacatg ggctgaggct gatctattac tcagcagctg ctgatattac	1320
agataaagga gaagtctccg atggctatgt tgtctccaga tccaagacag agaatttccc	1380
cctcactctg gactcageta cccgtccca gacatctgtg tatttctgcg ccagcagtga	1440
ggacagttac gagcagtact tcgggccggg caccaggctc acggtcacag aggacctgaa	1500

aaacgtgttc cctccaaaag tggccgtgtt cgagccttct gaggccgaga tcagccacac 1560

acagaaagcc acactcgtgt gtctggctac cggtcttctac cccgatcacg tggaactgtc 1620

ttggtgggtc aacggcaaag aggtgcacag cggcgtcagc acagatcccc agcctctgaa 1680

agaacagccc gccttgaacg acagccgcta ctgcctgtct agcagactga gagtgtccgc 1740

caccttctgg cagaacccca gaaaccactt cagatgccag gtccagttct acggcctgag 1800

cgagaacgat gagtggaccc aggacagagc caagcctgtg acacagatcg tgtctgccga 1860

agcctggggc agagccgatt gtggctttac cagcgagtca taccagcagg gcgtgtgtgc 1920

tgccaccatc ctgtatgaga tctgtctcgg caaggccaca ctgtacgtg tgctggtgtc 1980

tgctctggtg ctgatggcta tggctccccg ggagcgcata cccgaggccc gggccaagcg 2040

gggcagcggc gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc ggcgacgtgg aggagaaccc 2100

cggccctatg gccacaggca gcagaacatc tctgtgtgtg gccttcggac tgctgtgtct 2160

gccttggctg caagagggtt ccgccgcca gtacgtgacc cagcctgaca tccacatcac 2220

tgtctctgaa ggagcctcac tggagttgag atgtaactat tcctatgggg caacacctta 2280

tctcttctgg tatgtccagt ccccgggcca aggcctccag ctgtctctga agtacttttc 2340

aggagacact ctggttcaag gcattaaagg ctttgaggct gaatttaaga ggagtcaatc 2400

tctcttcaat ctgaggaaac cctctgtgca ttggagtgat gctgtctagt acttctgtgc 2460

tgtgggtgaa ttggacacag gctttcagaa acttgtatct ggaactggca cccgacttct 2520

ggtcagtcca aatattcaga accccgatcc tgctgtgtat cagctgcgcg acagcaagag 2580

cagcgacaag agcgtgtgtt tgttcaccga ttttgattct caaacaatg tgtcacaag 2640

taaggattct gatgtgtata tcacagacaa aactgtgcta gacatgaggt ctatggactt 2700

caagagcaac agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt 2760

caacaacagc attattccag aagacacctt ctccccagc ccaggttaagg gcagctttgg 2820

tgccttcgca ggctgtttcc ttgcttcagg aatggccagg ttctgcccag agctctggtc 2880

aatgatgtct aaaactcctc tgattggtgg tctcggcctt atccattgcc accaaaaccc 2940

tctttttact aagaaacagt gagccttggt ctggcagtc agagaatgac acgggaaaaa 3000

agcagatgaa gagaaggigg caggagaggg cacgtggccc agcctcagtc tctccaactg 3060

agttcctgcc tgcctgcctt tgcctcagact gtttgcctt tactgtctt ctaggcctca 3120

ttctaagccc ctcttccaag ttgcctctcc ttatttctcc ctgtctgcca aaaaatcttt 3180

cccagctcac taagtcagtc tcacgcagtc actcattaac ccaccaatca ctgattgtgc 3240

cggcacatga atgcaccagg tgttgaagtg gaggaattaa aaagtcagat gaggggtgtg 3300
 cccagaggaa gcaccattct agttggggga gcccatctgt cagctgggaa aagtccaaat 3360
 aacttcagat tggaatgtgt ttttaactcag ggttgagaaa acagctacct tcaggacaaa 3420
 agtcagggaa gggctctctg aagaaatgct acttgaagat accagcccta ccaagggcag 3480
 ggagaggacc ctatagaggc ctgggacagg agctcaatga gaaaggagaa gaggcagcagg 3540
 catgagttga atgaaggagg cagggccggg tcacagggcc ttctaggcca tgagagggtg 3600
 gacaggctag ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac 3660

 aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg 3720
 ttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga cctgcccgt taccggatac 3780
 ctgtccgctt ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtag 3840
 ctgagttcgg ttaggttctg tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag 3900
 cccgaccgct gcgccttacc cggttaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac 3960
 ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt 4020
 gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaagaac agtatttggg 4080

 atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 4140
 aaacaaacca ccgctggtag cggtaggtttt ttgttttga agcagcagat tacgcgcaga 4200
 aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc tttagaaaaa ctcatcgagc atcaaatgaa 4260
 actgcaattt attcatalca ggattatcaa taccatattt ttgaaaaagc cgtttctgta 4320
 atgaaggaga aaactaccg aggcagttcc ataggatggc aagatcctgg tatcggtctg 4380
 cgattccgac tcgtccaaca tcaatacaac ctattaattt cccctcgta aaaataaggt 4440
 tatcaagtga gaaatcacca tgagtacga ctgaatccgg tgagaatggc aaaagtttat 4500

 gcattttctt ccagacttgt tcaacaggcc agccattacg ctgctcatca aaatcactcg 4560
 catcaaccaa accgttatct attcgtgatt gcgcctgagc cagacgaaat acgcgatcgc 4620
 tgttaaaagg acaattaca acaggaatcg aatgcaaccg gcgcaggaac actgccagcg 4680
 catcaacaat attttacct gaatcaggat attcttctaa tacctggaat gctgtttttc 4740
 cggggatcgc agtggtagt aaccatgcat catcaggagt acggataaaa tgcttgatgg 4800
 tcggaagagg cataaattcc gtcagccagt ttagtctgac catctcatct gtaacatcat 4860
 tggcaacgct acctttgcca tgtttcagaa acaactctgg cgcatcgggc ttcccataca 4920

 agcgatagat tctgcacct gattgcccga cattatcgcg agccattta tacccatata 4980
 aatcagcatc catgttggaa tttaatcgcg gcctcgacgt ttcccggtga atatggctca 5040
 taacaccctt tgtattactg tttatgtaag cagacagttt tattgttcat gatgatata 5100

ttttatcttg tgcaatgtaa catcagagat tttagagacac 5140

<210> 22

<211> 926

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Left HR arm_CD8 Product 1

<400> 22

acattaaaaa cacaaaatcc tacggaaata ctgaagaatg agtctcagca ctaaggaaaa 60

gcctccagca gctcctgctt tctgagggtg aaggatagac gctgtggctc tgcattgactc 120

actagcactc tatcacggcc atattctggc agggctcagt gctccaacta acatttgctt 180

ggctactttac agtttattaa atagatgttt atatggagaa gctctcattt ctttctcaga 240

agagcctggc taggaagggt gatgaggcac catattcatt ttgcagggtga aattcctgag 300

atgtaaggag ctgctgtgac ttgtcaagg ctttatatcg agtaaacggt agtgcctggg 360

cttagacgca gggtttctga tttatagttc aaaacctcta tcaatgagag agcaatctcc 420

tggtaatgtg atagatttcc caacttaatg ccaacatacc ataaacctcc cattctgcta 480

atgcccagcc taagttgggg agaccactcc agattccaag atgtacagtt tgctttgctg 540

ggcctttttc ccatgcctgc ctttactctg ccagagtat attgctgggg ttttgaagaa 600

gacctatta aataaaagaa taagcagtat tattaagtag ccctgcattt caggtttctt 660

tgagtggcag gccaggcctg gccgtgaacg ttcactgaaa tcatggcctc ttggccaaga 720

ttgatagctt gtgcctgtcc ctgagtccca gtccatcacg agcagctggt ttctaagatg 780

ctatttcccg tataaagcat gagaccgtga cttgccagcc ccacagagcc ccgcccttgt 840

ccatcactgg catctggact ccagcctggg ttggggcaaa gagggaaatg agatcatgtc 900

ctaaccctga tcctcttgct ccacag 926

<210> 23

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TRAC CDS_CD8 Product 1

<400> 23

atatccagaa cctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaatcc agtgacaagt 60

ctgtctgcct attc 74
 <210> 24
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

GSG Linker_CD8 Product 1

<400> 24
 gaattcggct ccgga 15
 <210> 25
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

P2A_CD8 Product 1

<400> 25
 gccactaact tcagcctgtt gaagcaggcc ggcgacgttg aggaaaaccc cggctct 57
 <210> 26
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8A Signal peptide_CD8 Product 1

<400> 26
 atggccttac cagtgaccgc cttgtcctcg ccgctggcct tgctgtcca cgccgccagg 60
 ccg 63
 <210> 27
 <211> 483
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8A Extracellular domain_CD8 Product 1

<400> 27

agccagttcc ggggtgtcgcc gctggatcgg acctggaacc tgggcgagac agtggagctg 60
aagtgccagg tgctgctgtc caaccgacg tcgggctgct cgtggctctt ccagccgcgc 120
ggcgccgcgc ccagtcaccac ctctctcta tacctctccc aaaacaagcc caaggcggcc 180

gaggggctgg acaccagcg gttctcgggc aagaggttgg gggacacctt cgtctcacc 240
ctgagcgact tccgccgaga gaacgagggc tactatttct gctcgccct gagcaactcc 300
atcatgtact tcagccactt cgtgccgtc ttcctgccag cgaagccac cacgacgcca 360
gcgccgcgac caccaacacc ggcgcccacc atcgctgc agccctgtc cctgcgcca 420
gaggcgtgcc ggccagcggc gggggcgca gtgcacacga gggggctgga ctgcgctgt 480
gat 483

<210> 28

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8A transmembrane domain_CD8 Product 1

<400> 28

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtgggtcc ttctctgtc actggtatc 60
acc 63

<210> 29

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8A Intracellular domain_CD8 Product 1

<400> 29

ctttactgca accacaggaa ccgaagacgt gtttgcaa atgtcccgcc tgtggtcaaa 60

tcgggagaca agccagcct ttcggcgaga tacgtc 96

<210> 30

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Furin cleavage site_CD8 Product 1

<400> 30

agggctaaac gg

12

<210> 31

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

GSG Linker_CD8 Product 1

<400> 31

gaattcggct ccgga

15

<210> 32

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

P2A_CD8 Product 1

<400> 32

gccactaact tctccctgtt gaaacaggct ggcatgttg aagaaaaccc cggctcct

57

<210> 33

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

HGH/SS/2_CD8 Product 1

<400> 33

atggccaccg gctctagaac aagcctgctg ctgcttttg gcctgctctg cctcccatgg

60

ctccaagaag gatctgct

78

<210> 34

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Exemplary TRB_VDJ (TCR097) _CD8 Product 1

<400> 34

aatgctggtg tcactcagac cccaaaattc cgcacacctga agataggaca gagcatgaca	60
ctgcagtgtga cccaggatat gaaccataac tacatgtact ggtatcgaca agacccaggc	120
atggggctga agctgattta ttattcagtt ggtgctggta tcactgataa aggagaagtc	180
ccgaatggct acaacgtctc cagatcaacc acagaggatt tcccgtcag gctggagttg	240
gctgctccct cccagacatc tgtgtacttc tgtgccagct ccctacaggt tccctacaat	300

gagcagttct tcgggccagg gacacggctc accgtgctag aggac	345
---	-----

<210> 35

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TCR-beta/constant_CD8 Product 1

<400> 35

ctgaaaaacg tgttcctcc aaaagtggcc gtgttcgagc cttctgagc cgagatcagc	60
cacacacaga aagccacact cgtgtgtctg gctaccggct tctacccga tcacgtggaa	120
ctgtcttggt gggtaacgg caaagaggcg cacagcggcg tcagcacaga tccccagcct	180
ctgaaagaac agcccgtct gaacgacagc cgctactgcc tgtctagcag actgagagtg	240

tccgccacct tctggcagaa cccagaaaac cacttcagat gccagggtcca gttctacggc	300
ctgagcgaga acgatgagtg gaccaggac agagccaagc ctgtgacaca gatcgtgtct	360
gccgaagcct ggggcagagc cgattgtggc ttaccagcg agtcatacca gcagggcgtg	420
ctgtctgcca ccatcctgta tgagatcctg ctggcaagg ccacactgta cgctgtgctg	480
gtgtctgctc tgggtctgat ggctatggc tccgggagc gcatccccga ggcc	534

<210> 36

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Furin cleavage site_CD8 Product 1

<400> 36

cgggccaagc gg	12
---------------	----

<210> 37
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 GSG linker_CD8 Product 1
 <400> 37
 ggcagcggc 9
 <210> 38
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 P2A_CD8 Product 1
 <400> 38
 gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc ggcgacgtgg aggagaaccc cggccct 57
 <210> 39
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 HGH/SS_CD8 Product 1
 <400> 39
 atggccacag gcagcagaac atctctgctg ctggccttcg gactgctgtg tctgccttgg 60
 ctgcaagagg gttccgcc 78
 <210> 40
 <211> 337
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Exemplary TRA-VDJ (TCR097) _CD8 Product 1
 <400> 40
 gctcagacag tactcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gaccgtgacc 60

ctgagctgca catatgacac cagtgagagt gattattatt tattctggta caagcagcct 120
cccagcaggc agatgattct cggtattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaaca 180
gagaatcggt tctctgtgaa cttccagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca 240
gactcacagc tgggggatgc cgcgatgtat ttctgtgctt ttgggaactt caacaaattt 300
tactttggat ctgggaccaa actcaatgta aaaccaa 337

<210> 41

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TCR-alpha/constant_CD8 Product 1

<400> 41

atattcagaa ccccgatcct gctgtgtatc agctgcgcga cagcaagagc agcgacaaga 60
gcgtgtgttt gttc 74

<210> 42

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TRAC CDS/right HR arm_CD8 Product 1

<400> 42

accgattttg attctcaaac aaatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca 60
gacaaaaactg tgctagacat gaggctatg gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg 120
agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac 180

acctttcttc ccagcccagg 200

<210> 43

<211> 800

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Right HR arm_CD8 Product 1

<400> 43

taagggcagc ttgggtgcct tcgcaggctg ttcccttgct tcaggaatgg ccaggttctg 60

cccagagctc tggtaaatga tgtctaaaac tcctctgatt ggtgggtctcg gccttatcca 120
 ttgccaccaa aaccctcttt ttactaagaa acagttagcc ttgttctggc agtccagaga 180
 atgacacggg aaaaaagcag atgaagagaa ggtggcagga gagggcacgt ggcccagcct 240

cagtctctcc aactgagttc ctgcctgcct gcctttgtctc agactgtttg ccccttactg 300
 ctcttctagg cctcattcta agccccctct ccaagttgcc tctccttatt tctccctgtc 360
 tgccaaaaaa tcttccag ctactaagt cagtctcacg cagtactca ttaaccacc 420
 aatcactgat tgtgccgga catgaatgca ccaggtgttg aagtggagga attaaaaagt 480
 cagatgaggg gtgtgccag aggaagcacc attctagtgt ggggagccca tctgtcagct 540
 gggaaaagtc caaataactt cagattggaa tgtgttttaa ctgaggttg agaaaacagc 600
 taccttcagg acaaaagtca gggaagggtc ctctgaagaa atgctacttg aagataccag 660

ccctaccaag ggcagggaga ggacctata gaggcctggg acaggagctc aatgagaaag 720
 gagaagagca gcaggcatga gttgaatgaa ggaggcaggg ccgggtcaca ggccttcta 780
 ggccatgaga gggtagacag 800

<210> 44

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Artificial Sequence_CD8 Product 1

<400> 44

gctagc 6

<210> 45

<211> 620

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

pBR322_origin_CD8 Product 1

<400> 45

cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg 60
 ctcaagttag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg 120
 aagctccctc gtgcgtcttc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt 180
 tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg 240

gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg 300

cgcccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact 360

ggcagcagcc actggttaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcgggtg ctacagagtt 420

cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct 480

gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac 540

cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc 600

tcaagaagat cctttgatct 620

<210> 46

<211> 810

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Kanamycin resistance (KanR2) _CD8 Product 1

<400> 46

ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatacag gattatcaat 60

accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aatcaccga ggcagttcca 120

taggatggca agatcctggt atcggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc 180

tattaatttc cctcgtcaa aaataagggt atcaagttag aatcaccat gagtgcagac 240

tgaatccggt gagaatggca aaagtttatg catttcttcc cagacttggt caacaggcca 300

gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacaaaa ccgttattca ttcgtgattg 360

cgccctgagcc agacgaaata cgcgatcgt gttaaaagga caattacaaa caggaaatcga 420

atgcaaccgg cgaggaaca ctgccagcgc atcaacaata tttcacctg aatcaggata 480

ttcttcta atctggaatg ctgtttttcc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc 540

atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt 600

tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa 660

caactctggc gcatcgggct tccatacaa gcgatagatt gtcgcacctg attgcccgcac 720

attatcgca gcccatattat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg 780

cctcgacgtt tcccgtagaa tatggctcat 810

<210> 47

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Kanamycin promoter_CD8 Product 1

<400> 47

aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcattg atgatatatt 60

tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt ttgagacac 99

<210> 48

<211> 5926

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Complete CD8 Product 1 construct with TCR97 insertion_CD8

Product 1

<400> 48

ggtaccacat taaaaacaca aaatcctacg gaaatactga agaattgagtc tcagcactaa 60

ggaaaagcct ccagcagctc ctgctttctg aggggtgaagg atagacgctg tggctctgca 120

tgactcacta gcaactctatc acggccatat tctggcaggg tcagtggctc caactaacat 180

ttgtttggta ctttacagtt tattaatatag atgtttatat ggagaagctc tcatttcttt 240

ctcagaagag cctggctagg aagggtgatg aggcaccata ttcattttgc aggtgaaatt 300

cctgagatgt aaggagctgc tgtgacttgc tcaaggcctt atatcgagta aacggtagtg 360

ctggggctta gacgcaggtg ttctgattta tagttcaaaa cctctatcaa tgagagagca 420

atctcctggt aatgtgatag atttccaac ttaatgcaa cataccataa acctccatt 480

ctgctaattgc ccagcctaag ttggggagac cactccagat tccaagatgt acagtttgct 540

ttgctgggcc tttttccat gcctgccttt actctgccag agttatattg ctgggggttt 600

gaagaagatc ctattaaata aaagaataag cagtattatt aagtagccct gcatttcagg 660

tttccttgag tggcaggcca ggcctggccg tgaacgttca ctgaaatcat ggcctcttgg 720

ccaagattga tagcttggtc ctgtccctga gtcccagtc atcacagca gctggtttct 780

aagatgctat ttcccgtata aagcatgaga ccgtgacttg ccagccccac agagccccgc 840

ccttgtccat cactggcatc tggactccag cctgggttgg ggcaaagagg gaaatgagat 900

catgtcctaa cctgatcct cttgtccac agatatccag aacctgacc ctgccgtgta 960

ccagctgaga gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcgaat tcggctccgg 1020

agccactaac ttcagcctgt tgaagcaggc cggcgacgtt gaggaaaacc ccggtcctat 1080

ggccttacca gtgaccgcct tgctcctgcc gctggccttg ctgctccacg cgcgcaggcc	1140
gagccagttc cgggtgtcgc cgctggatcg gacctggaac ctgggcgaga cagtggagct	1200
gaagtgccag gtgctgctgt ccaacccgac gtcgggctgc tcgtggctct tccagccgcg	1260
cggcgccgcc gccagtccca ctttcctcct atacctctcc caaaacaagc ccaaggcggc	1320
cgaggggctg gacaccacgc ggttctcggg caagaggttg ggggacacct tcgtcctcac	1380
cctgagcgac ttccgccgag agaacgaggg ctactatttc tgctcggccc tgagcaactc	1440
catcatgtac ttcagccact tcgtgccggt cttcctgccg gcgaagccca ccacgacgcc	1500
agcgccgcga ccaccaaac cggcgccccc catcgctcg cagcccctgt ccttcgcccc	1560
agaggcgctg cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg agggggctgg acttcgcctg	1620
tgatatctac atctgggcgc ccttggccgg gacttgtggg gtccttctcc tgtcactggt	1680
tatcaccttt tactgcaacc acaggaaccg aagacgtgtt tgcaaatgtc cccggcctgt	1740
ggtcaaatcg ggagacaagc ccagcctttc ggcgagatac gtcagggcta aacgggaatt	1800
cggctccgga gccactaact tctccctgtt gaaacaggct ggcgatgttg aagaaaacc	1860
cggctcctatg gccaccggct ctagaacaag cctgctgctc gcttttggcc tgctctgcct	1920
cccatggctc caagaaggat ctgctaattg ttgtgtcact cagaccccaa aattccgcat	1980
cctgaagata ggacagagca tgacactgca gtgtaccag gatatgaacc ataactacat	2040
gtactggtat cgacaagacc caggcatggg gctgaagctg atttattatt cagttggtgc	2100
tggtatcact gataaaggag aagtcccgaa tggtacaac gttccagat caaccacaga	2160
ggatttcccg ctgagctgg agttggctgc tccctcccag acatctgtgt acttctgtgc	2220
cagctcccta caggttccct acaatgagca gttcttcggg ccaggacac ggctcaccgt	2280
gctagaggac ctgaaaaacg tgttcctcc aaaagtggcc gtgttcgagc cttctgaggc	2340
cgagatcagc cacacacaga aagccacact cgtgtgtctg gctaccggt tctacccga	2400
tcacgtggaa ctgtcttggg gggtaacgg caaagagtg cacagcggcg tcagcacaga	2460
tccccagcct ctgaaagaac agcccgtct gaacgacagc cgctactgcc tgtctagcag	2520
actgagagtg tccgccact tctggcagaa cccagaaac cacttcagat gccaggtcca	2580
gttctacggc ctgagcgaga acgatgagt gacccaggac agagccaagc ctgtgacaca	2640
gatcgtgtct gccgaagcct ggggcagagc cgatttgtgc ttaccagcg agtcatacca	2700
gcaggcgctg ctgtctgcc ccatcctgta tgagatcctg ctggcaagg ccacactgta	2760
cgctgtgctg gtgtctgctc tgggtctgat ggctatggc tcccgggagc gcacccccga	2820

ggccccgggcc aagcggggca gcggcgccac caacttcagc ctgctgaagc aggccggcga 2880

ctgtggaggag aacccccggcc ctatggccac aggcagcaga acatctctgc tgctggcctt 2940

cggactgctg tgtctgcctt ggctgcaaga gggttccgcc gctcagacag tcaactcagtc 3000

tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gaccgtgacc ctgagctgca catatgacac 3060

cagttagagt gattattatt tattctggta caagcagcct cccagcaggc agatgattct 3120

cgttattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaaca gagaatcgtt tctctgtgaa 3180

cttcagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca gactcacagc tgggggatgc 3240

cgcgatgtat ttctgtgctt ttgggaactt caacaaattt tactttggat ctgggaccaa 3300

actcaatgta aaaccaaata ttcagaaccc cgatcctgct gtgtatcagc tgcgcgacag 3360

caagagcagc gacaagagcg tgtgtttgtt caccgatctt gattctcaa caaatgtgtc 3420

acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaaact gtgctagaca tgaggtctat 3480

ggacttcaag agcaacagtgc ctgtggcctg gagcaacaaa tctgactttg catgtgcaaa 3540

cgcttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc cccagcccag gtaagggcag 3600

ctttgggtgcc ttgcagcgtt gtttcttgc ttccaggaatg gccaggttct gccagagct 3660

ctggtcaatg atgtctaaaa ctctctgat ttgtggtctc ggccttatcc attgccacca 3720

aaacctctt tttactaaga aacagtgagc ctgtttctgg cagtccagag aatgacacgg 3780

gaaaaaagca gatgaagaga aggtggcagg agagggcacg tggcccagcc tcagtctctc 3840

caactgagtt cctgcctgcc tgcctttgct cagactgttt gcccttact gctcttctag 3900

gcctcattct aagcccttc tccaagttgc ctctcttat ttctccctgt ctgccaaaaa 3960

atctttccca gtcactaag tcagtctcac gcagtcactc attaacccac caatcactga 4020

ttgtgccgcg acatgaatgc accaggtgtt gaagtggagg aattaaag tcagatgagg 4080

ggtgtgcccc gaggaagcac cattctagtt gggggagccc atctgtcagc tgggaaaagt 4140

ccaaataact tcagattgga atgtgtttta actcagggtt gagaaaacag ctaccttcag 4200

gacaaaagtc aggaagggc tctctgaaga aatgctactt gaagatacca gccctacca 4260

gggcaggag aggaccctat agaggcctgg gacaggagct caatgagaaa ggagaagagc 4320

agcaggcatg agttgaatga aggaggcagg gccgggtcac agggccttct aggccatgag 4380

agggtagaca ggctagccgc gttgtggcg tttttccata ggctccgcc ccctgacgag 4440

catcacaaaa atcgacgtc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac 4500

caggcgtttc cccctggaag ctccctctg cgctctctg ttccgacct gccgcttacc 4560

ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctacacgtgt 4620
 aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc 4680
 gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgte ttgagtccaa cccggttaaga 4740
 cagcacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta 4800
 ggccgtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aagaacagta 4860
 tttggtatct gcgtctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga 4920
 tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg 4980

cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatcttta gaaaaactca tcgagcatca 5040
 aatgaaactg caattttatc atatcaggat tatcaatacc atatTTTTga aaaagccgtt 5100
 tctgtaatga aggagaaaa tcaccgaggc agttccatag gatggcaaga tcttggtatc 5160
 ggtctgcgat tccgactcgt ccaacatcaa tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa 5220
 taaggttatc aagtgagaaa tcacatgag tgacgactga atccggtgag aatggcaaaa 5280
 gtttatgcat ttctttccag acttggtcaa caggccagcc attacgctcg tcatcaaaat 5340
 cactgcacac aaccaaaccg ttattcattc gtgattgcgc ctgagccaga cgaaatacgc 5400

gatcgtgtgt aaaaggacaa ttacaacag gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg 5460
 ccagcgcac cacaatatTT tcacctgaat caggatattc ttctaatacc tggaatgctg 5520
 tttttccggg gatcgcagtg gtgagtaacc atgcatcacc aggagtacgg ataaaatgct 5580
 tgatggtcgg aagaggcata aattccgtca gccagtttag tctgaccatc tcatctgtaa 5640
 catcattggc aacgtacct ttgccatgtt tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc 5700
 catacaagcg atagattgtc gcacctgatt gcccacatt atcgcgagcc catttatacc 5760
 catataaatc agcatccatg ttggaattta atcgcggcct cgacgtttcc cgttgaatat 5820

ggctcataac accccttgta ttactgttta tgtaagcaga cagttttatt gttcatgatg 5880
 atatatTTTT atcttgtgca atgtaacatc agagattttg agacac 5926

<210> 49

<211> 926

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Left HR Arm_CD8 Product 2

<400> 49

acattaaaaa caaaaaatcc tacggaaata ctgaagaatg agtctcagca ctaaggaaaa 60
 gcctccagca gtcctgctt tctgagggtg aaggatagac gctgtggctc tgcattgactc 120

actagcactc tatcacggcc atattctggc agggtcagtg gctccaacta acatttgttt	180
ggtactttac agtttattaa atagatgttt atatggagaa gctctcattt ctttctcaga	240
agagcctggc taggaagggt gatgaggcac catattcatt ttgcagggtga aattcctgag	300
atgtaaggag ctgctgtgac ttgctcaagg ccttatatcg agtaaacggt agtgctgggg	360
cttagacgca ggtgtttctga tttatagtac aaaacctcta tcaatgagag agcaatctcc	420
tggtaatgtg atagatttcc caacttaatg ccaacatacc ataaacctcc cattctgcta	480
atgcccagcc taagtggggg agaccactcc agattccaag atgtacagtt tgctttgctg	540
ggcctttttc ccatgcctgc ctttactctg ccagagttat attgctgggg ttttgaagaa	600
gacacctatta aataaaagaa taagcagtat tattaagtag ccttgcatth caggtttcct	660
tgagtggcag gccaggcctg gccgtgaacg ttactgaaa tcatggcctc ttggccaaga	720
ttgatagctt gtgcctgtcc ctgagtccca gtccatcacg agcagctggt ttctaagatg	780
ctatttcccg tataaagcat gagaccgtga ctgcccagcc ccacagagcc cgccttctgt	840
ccatcactgg catctggact ccagcctggg ttggggcaaa gagggaaatg agatcatgtc	900
ctaaccctga tctcttctgc ccacag	926
<210> 50	
<211> 74	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
TRAC CDS_CD8 Product 2	
<400> 50	
atatccagaa cctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt	60
ctgtctgcct attc	74
<210> 51	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
GSG Linker_CD8 Product 2	
<400> 51	
gaattcggct ccgga	15
<210> 52	

<211>

57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

P2A_CD8 Product 2

<400> 52

gccactaact tcagcctgtt gaagcaggcc ggcgacgttg aggaaaaccc cggtcct 57

<210> 53

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8A Signal Peptide_CD8 Product 2

<400> 53

atggccttac cagtgaccgc cttgtctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccg 63

<210> 54

<211> 483

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8A Extracellular domain_CD8 Product 2

<400> 54

agccagtacc ggggtgtgcc gctggatcgg acctggaacc tgggcgagac agtggagctg 60

aagtgccagg tgctgctgtc caaccgcagc tcgggctgct cgtggctctt ccagccgcgc 120

ggcgccgcgc ccagtcacc cttctctcta tactctccc aaaacaagcc caaggcggcc 180

gaggggctgg acaccagcg gttctcgggc aagaggttgg gggacacctt cgtcctcacc 240

ctgagcgact tccgcgaga gaacgagggc tactatttct gctcggccct gagcaactcc 300

atcatgtact tcagccactt cgtgccgttc ttcttgccag cgaagccac cagcagcca 360

gcgccgcgac caccaacacc ggcccccacc atcgctgcgc agccctgtc cctgcgcca 420

gaggcgtgcc ggccagcggc gggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttcgctgt 480

gat 483

<210> 55
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 CD8A Transmembrane domain_CD8 Product 2
 <400> 55
 atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtgggtcc ttctcctgtc actggttacc 60
 acc 63
 <210> 56
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 CD8A intracellular domain_CD8 Product 2
 <400> 56
 ctttactgca accacaggaa ccgaagacgt gtttgcaaat gtccccggcc tgtggtcaaa 60
 tcgggagaca agcccagcct ttcggcgaga tacgtc 96
 <210> 57
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Furin cleavage site_CD8 Product 2
 <400> 57
 agagcaaagc gg 12
 <210> 58
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 GSG Linker_CD8 Product 2
 <400> 58

ggctccgga	9
<210> 59	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
P2A_CD8 Product 2	
<400> 59	
gtaccaatt ttagcctcct gaagcagget ggcgatgttg aggaaaaccc tggcccc	57
<210> 60	
<211> 63	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
CD8B Signal Peptide_CD8 Product 2	
<400> 60	
atgcggccgc ggctgtggct cctcttggcc gcgcagctga cagttctcca tggcaactca	60
gtc	63
<210> 61	
<211> 447	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
CD8B Extracellular domain_CD8 Product 2	
<400> 61	
ctccagcaga cccctgcata cataaagggtg caaaccaaca agatgggtgat gctgtcctgc	60
gaggctaaaa tctccctcag taacatgcgc atctactggc tgagacagcg ccaggcaccg	120
agcagtgaca gtcaccacga gttcctggcc ctctgggatt ccgcaaaagg gactatccac	180
ggtgaagagg tggaacagga gaagatagct gtgtttcggg atgcaagccg gttcattctc	240
aatctcacia gcgtgaagcc ggaagacagt ggcattctact tctgcatgat cgtcggggagc	300
cccagactga ccttcgggaa gggaactcag ctgagtgtgg ttgatttcct tcccaccact	360
gcccagccca ccaagaagtc caccctcaag aagagagtgt gccggttacc caggccagag	420

accagaagg gccactttg tagcccc 447

<210> 62

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8B Transmembrane domain_CD8 Product 2

<400> 62

atcaccttg gcctgctggt ggctggcgtc ctggttctgc tggtttcct gggagtggcc 60

atc 63

<210> 63

<211> 57

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8B Intracellular domain_CD8 Product 2

<400> 63

cacctgtgct gccggcggag gagagcccgg ctctgtttca tgaacaatt ttacaaa 57

<210> 64

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Furin cleavage site_CD8 Product 2

<400> 64

agggctaaac gg 12

<210> 65

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

GSG Linker_CD8 Product 2

<400> 65

gaattcggct ccgga 15

<210> 66

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

P2A_CD8 Product 2

<400> 66

gccactaact tctccctgtt gaaacagct ggcatgttg aagaaaacc cggtcct 57

<210> 67

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

HGH/SS/2_CD8 Product 2

<400> 67

atggccaccg gctctagaac aagcctgtg ctgcgttttg gctgctctg cctcccatgg 60

ctccaagaag gatctgct 78

<210> 68

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Exemplary TRB_VDJ (TCR097) _CD8 Product 2

<400> 68

aatgctgggtg tactcagac cccaaaattc cgcctcctga agataggaca gagcatgaca 60

ctgcagtgtg cccaggatat gaaccataac tacatgtact ggtatcgaca agaccaggc 120

atggggctga agctgattta ttattcagtt ggtgctggta tactgataa aggagaagtc 180

ccgaatggct acaacgtctc cagatcaacc acagaggatt tcccgtcag gctggagttg 240

gtgctccct cccagacatc tgtgtacttc tgtgccagct ccctacaggt tcctacaat 300

gagcagttct tcgggccagg gacacggctc accgtgctag aggac 345

<210> 69

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TCR-beta/constant_CD8 Product 2

<400> 69

ctgaaaaacg tgttcctcc aaaagtggcc gtgttcgagc cttctgagc cgagatcagc 60

cacacacaga aagccacact cgtgtgtctg gctaccggct tctacccga tcacgtggaa 120

ctgtcttggt gggtaaacgg caaagaggtg cacagcggcg tcagcacaga tccccagcct 180

ctgaaagaac agcccgtct gaacgacagc cgctactgcc tgtctagcag actgagagtg 240

tccgccacct tctggcagaa cccagaaac cacttcagat gccaggtcca gttctacggc 300

ctgagcgaga acgatgagtg gaccaggac agagccaagc ctgtgacaca gatcgtgtct 360

gccgaagcct ggggcagagc cgattgtggc ttaccagcg agtcatacca gcagggcgtg 420

ctgtctgcca ccatcctgta tgagatcctg ctggcaagg ccacactgta cgctgtgtg 480

gtgtctgtc tgggtctgat ggctatggc tccgggagc gcatcccgga ggcc 534

<210> 70

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Furin cleavage site_CD8 Product 2

<400> 70

cgggccaagc gg 12

<210> 71

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

GSG linker_CD8 Product 2

<400> 71

ggcagcggc 9

<210> 72

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

P2A_CD8 Product 2

<400> 72

gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc ggcgacgtgg aggagaaccc cggccct 57

<210> 73

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

HGH/SS_CD8 Product 2

<400> 73

atggccacag gcagcagaac atctctgctg ctggccttcg gactgctgtg tctgccttgg 60

ctgcaagagg gttccgcc 78

<210> 74

<211> 337

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Exemplary TRA-VDJ (TCR097) _CD8 Product 2

<400> 74

gtcagacag tcaactcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gaccgtgacc 60

ctgagctgca catatgacac cagtgcagat gattattatt tattctggta caagcagcct 120

cccagcaggc agatgattct cggtattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaaca 180

gagaatcggt tctctgtgaa cttccagaaa gcagccaaat cttcagttct caagatctca 240

gactcacagc tgggggatgc cgcgatgtat ttctgtgctt ttgggaactt caacaaattt 300

tactttggat ctgggaccaa actcaatgta aaaccaa 337

<210> 75

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TCR-alpha/constant_CD8 Product 2

<400> 75

atattcagaa ccccgatcct gctgtgtatc agctgcgcga cagcaagagc agcgacaaga 60

gcgtgtgttt gtic 74

<210> 76

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TRAC CDS/right HR arm_CD8 Product 2

<400> 76

accgattttg attctcaaac aaatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca 60

gacaaaactg tgctagacat gaggtctatg gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg 120

agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac 180

accttcttcc ccagcccagg 200

<210> 77

<211> 800

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Right HR arm_CD8 Product 2

<400> 77

taagggcagc ttigtgtgct tcgcaggctg tttccttgct tcaggaatgg ccaggttctg 60

cccagagctc tggtaaatga tgtctaaaac tctctgatt ggtgtgtctg gccttatcca 120

ttgccaccaa aacctctttt ttactaagaa acagttagcc ttgttctggc agtccagaga 180

atgacacggg aaaaaagcag atgaagagaa ggtggcagga gagggcacgt ggcccagcct 240

cagtctctcc aactgagttc ctgcctgcct gcctttgctc agactgtttg ccccttactg 300

ctcttctagg cctcattcta agcccccttct ccaagttgcc tctccttatt tctccctgtc 360

tgccaaaaaa tctttcccag ctactaagt cagtctcacg cagtcactca ttaaccacc 420

aatcactgat tgtgccgga catgaatgca ccagggtgtg aagtggagga attaaaaagt 480

cagatgaggg gtgtgccag aggaagcacc attctagtgt ggggagccca tctgtcagct 540

gggaaaagtc caataactt cagattggaa tgtgttttaa ctcagggttg agaaaacagc 600

taccttcagg acaaaagtca gggaagggct ctctgaagaa atgctacttg aagataccag 660
ccctaccaag ggcagggaga ggaccctata gaggcctggg acaggagctc aatgagaaag 720
gagaagagca gcaggcatga gttgaatgaa ggaggcaggg ccgggtcaca ggccttcta 780
ggccatgaga gggtagacag 800

<210> 78

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Artificial Sequence_CD8 Product 2

<400> 78

gctagc 6

<210> 79

<211> 620

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

pBR322_origin_CD8 Product 2

<400> 79

cgcggtgctg gcgtttttcc ataggtccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg 60

ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg 120

aagtccectc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgteccgctt 180

tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc ttaggtatc tcagttcggt 240

gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacct ccggttcagc ccgaccgctg 300

cgcttatecc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact 360

ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt 420

cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct 480

gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac 540

cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc 600

tcaagaagat cctttgatct 620

<210> 80

<211> 810

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Kanamycin resistance (KanR2) _CD8 Product 2

<400> 80

ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat	60
accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca	120
taggatggca agatcctggg atcggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc	180
tattaatttc cctcgtcaa aaataagggt atcaagttag aaatcaccat gaggtagcag	240
tgaatccggg gagaatggca aaagtttatg catttctttc cagacttggt caacaggcca	300
gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacaaaa ccgttattca ttcgtgattg	360
cgcttagacc agacgaaata cgcgatcgct gttaaaaagga caattacaaa caggaatcga	420
atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata tttcacctg aatcaggata	480
ttcttctaac acctggaatg ctgtttttcc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc	540
atcaggagta cggataaaat gcttgatggg cggaagaggc ataatccg tcagccagtt	600
tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgcat gtttcagaaa	660
caactctggc gcatcggggt tccatacaa gcgatagatt gtcgcacctg attgcccgac	720
attatcgca gccatttat accatataa atcagcatcc atgttgaat ttaatcgcg	780
cctcgacgtt tccggttga tatggtcat	810

<210> 81

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Kanamycin promoter_CD8 Product 2

<400> 81

aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcatt atgatatatt	60
tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt ttgagacac	99

<210> 82

<211> 6634

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Complete CD8 Product 2 construct with TCR97 insertion_CD8

Product 2

<400> 82

ggtaccacat taaaaacaca aaatcctacg gaaatactga agaatgagtc tcagcactaa	60
ggaaaagcct ccagcagctc ctgctttctg aggggtgaagg atagacgctg tggctctgca	120
tgactcacta gcactctatc acggccatat tctggcaggg tcagtggctc caactaacat	180
ttgtttggta ctttacagtt tattaaatag atgtttatat ggagaagctc tcatttcttt	240
ctcagaagag cctggctagg aagggtgatg aggcaccata ttcattttgc aggtgaaatt	300
cctgagatgt aaggagctgc tgtgacttgc tcaaggcctt atatcgagta aacggtagt	360
ctggggctta gacgcaggtg ttctgattta tagttcaaaa cctctatcaa tgagagagca	420
atctcctggt aatgtgatag atttccaac ttaatgcaa cataccataa acctccatt	480
ctgctaatac ccagcctaag ttggggagac cactccagat tccaagatgt acagtttct	540
ttgctgggccc tttttcccat gcctgccttt actctgccag agttatatgt ctggggtttt	600
gaagaagatc ctattaaata aaagaataag cagtattatt aagtagccct gcatttcagg	660
tttccttgag tggcaggcca ggccctggccg tgaacgttca ctgaaatcat ggccctcttg	720
ccaagattga tagcttgtgc ctgtccctga gtcccagtc atcacgagca gctggtttct	780
aagatgctat ttcccgtata aagcatgaga ccgtgacttg ccagccccac agagccccgc	840
ccttgtccat cactggcatc tggactccag cctgggttgg ggcaaagagg gaaatgagat	900
catgtcctaa cctgatcct cttgtccac agatatccag aacctgacc ctgccgtgta	960
ccagctgaga gactctaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcgaat tcggctccgg	1020
agccactaac ttcagcctgt tgaagcaggc cggcgacgtt gagggaaaacc ccggtcctat	1080
ggccttacca gtgaccgctt tgctcctgcc gctggccttg ctgctccag ccgccaggcc	1140
gagccagttc cgggtgtcgc gcgtggatcg gacctggaac ctgggcgaga cagtggagct	1200
gaagtgccag gtgctgtgtt ccaacccgac gtcgggctgc tcgtggctct tccagccgcg	1260
cggcgccgcc gccagtccca ctttctcct atacctctcc caaaacaagc ccaaggcggc	1320
cgaggggctg gacaccagc ggttctcggg caagaggttg ggggacacct tcgtctcac	1380
cctgagcgac ttccgccgag agaacgaggg ctactatttc tgctcgccc tgagcaactc	1440
catcatgtac ttcagccact tcgtgccgtt cttctgccca gcgaagccca ccacgacgcc	1500
agcgccgcca ccaccaaac cggcgccccc catcgctcg cagccctgt ccctgcgcc	1560
agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg agggggctgg acttcgcctg	1620

tgataatctac atctgggcgc ccttggccgg gacttgtggg gtccttctcc tgtcactggt	1680
tatcacccctt tactgcaacc acaggaaccg aagacgtgtt tgcaaatgtc cccggcctgt	1740
ggtcaaatcg ggagacaagc ccagcccttc ggcgagatac gtcagagcaa agcggggctc	1800
cggagctacc aattttagcc tcctgaagca ggctggcgat gttgaggaaa accctggtcc	1860
catgcggccg cggtgtggc tcctcttggc cgcgagctg acagtctctc atggcaactc	1920
agtccctccag cagaccctg catacataaa ggtgcaaacc aacaagatgg tgatgctgtc	1980
ctgcgaggct aaaatctccc tcagtaacat gcgcatctac tggctgagac agcggccaggc	2040
accgagcagt gacagtacc acgagttcct ggccctctgg gattccgcaa aagggactat	2100
ccacggtgaa gaggtggaac aggagaagat agctgtgttt cgggatgcaa gccggttcat	2160
tctcaatctc acaagcgtga agccggaaga cagtggcatc tacttctgca tgatcgtcgg	2220
gagccccgag ctgaccttcg ggaagggaac tcagctgagt gtggttgatt tccttcccac	2280
caactgcccag cccaccaaga agtccaccct caagaagaga gtgtgccggt taccagggcc	2340
agagaccagc aaggggccac tttgtagccc catcacccctt ggctgtctgg tggctggcgt	2400
cctggttctg ctggtttccc tgggagtggc catccacctg tctgtccggc ggaggagagc	2460
ccggcttcgt ttcatgaaac aattttacaa aagggtctaaa cggaattcgc gtcctggagc	2520
cactaacttc tcctgttga aacaggctgg cgatgttgaa gaaaaccccg gtcctatggc	2580
caccggctct agaacaagcc tgctgtctgc ttttggcctg ctctgcctcc catggctcca	2640
agaaggatct gctaagtctg gtgtcactca gaccccaaaa ttccgcatcc tgaagatagg	2700
acagagcatg aactgcatg gtaccagga tatgaacat aactacatgt actggtatcg	2760
acaagaccca ggcatggggc tgaagctgat ttattattca gttggtgctg gtatcactga	2820
taaaggagaa gtcccgaatg gctacaacgt ctccagatca accacagagg atttcccgt	2880
caggctggag ttggctgtc cctcccagac atctgtgtac ttctgtgcca gtccttaca	2940
ggttccctac aatgagcagt tcttcgggcc agggacacgg ctaccgtgc tagaggacct	3000
gaaaaacgtg ttccctccaa aagtggccgt gttcgagcct tctgaggccg agatcagcca	3060
cacacagaaa gccacactcg tgtgtctggc taccggttc taccggatc acgtggaact	3120
gtcttgggtg gtcaacggca aagaggtgca cagcggcgtc agcacagatc cccagcctct	3180
gaaagaacag cccgctctga acgacagccg ctactgcctg tctagcagac tgagagtgtc	3240
cgccaccttc tggcagaacc ccagaaacca ctccagatgc caggctccagt tctacggcct	3300
gagcgagaac gatgagtga cccaggacag agccaagcct gtgacacaga tcgtgtctgc	3360
cgaagcctgg ggcagagccg attgtggctt taccagcgag tcataccagc agggcgtgct	3420
gtctgccacc atcctgtatg agatcctgct cggcaaggcc aactgtacg ctgtgtggt	3480

gtctgctctg gtgctgatgg ctatggcttc ccgggagcgc atccccgagg cccgggccaa 3540

gcggggcagc ggcgccacca acttcagcct gctgaagcag gccggcgacg tggaggagaa 3600

ccccggccct atggccacag gcagcagaac atctctgctg ctggccttcg gactgctgtg 3660

tctgccttgg ctgcaagagg gttccgccgc tcagacagtc actcagtctc aaccagagat 3720

gtctgtgcag gaggcagaga ccgtgaccct gagctgcaca tatgacacca gtgagagtga 3780

ttattattta ttctggtaca agcagcctcc cagcaggcag atgattctcg ttattcgcca 3840

agaagcttat aagcaacaga atgcaacaga gaatcgtttc tctgtgaact tccagaaagc 3900

agccaaatcc ttcagtctca agatctcaga ctcacagctg ggggatgccg cgatgtattt 3960

ctgtgctttt gggaacttca acaaatttta ctttggatct gggaccaaac tcaatgtaaa 4020

accaaatatt cagaaccccg atcctgctgt gtatcagctg cgcgacagca agagcagcga 4080

caagagcgtg tgtttgttca ccgattttga ttctcaaaca aatgtgtcac aaagtaagga 4140

ttctgatgtg tatatcacag acaaaactgt gctagacatg aggtctatgg acttcaagag 4200

caacagtgtc gtggcctgga gcaacaaatc tgactttgca tgtgcaaacg ctttcaacaa 4260

cagcattatt ccagaagaca cttttctccc cagcccaggt aagggcagct ttggtgcctt 4320

cgcaggctgt ttccttgctt caggaatggc caggttctgc ccagagctct ggtcaatgat 4380

gtctaaaact cctctgattg gtggctcgg ccttatccat tgccacaaa accctctttt 4440

tactaagaaa cagttagcct tgttctggca gtccagagaa tgacacggga aaaaagcaga 4500

tgaagagaag gtggcaggag agggcacgtg gcccagcctc agtctctcca actgagttcc 4560

tgctgcctg cctttgctca gactgtttgc cccttactgc tcttctaggc ctcattctaa 4620

gccccctctc caagttgcct ctcttattt ctccctgtct gccaaaaaat ctttcccagc 4680

tcactaagtc agtctcacgc agtcactcat taaccacca atcactgatt gtgccggcac 4740

atgaatgcac caggtgttga agtggaggaa ttaaaaagtc agatgagggg tgtgcccaga 4800

ggaagcacca ttctagttag gggagcccat ctgtcagctg ggaaaagtcc aaataacttc 4860

agattggaat gtgttttaac tcagggttga gaaaacagct accttcagga caaaagtcag 4920

ggaagggtc tcigaagaaa tgctacttga agataccagc cctaccaagg gcaggagag 4980

gacctatag aggcctggga caggagctca atgagaaagg agaagagcag caggcatgag 5040

ttgaatgaag gaggcagggc cgggtcacag ggccttctag gccatgagag ggtagacagg 5100

ctagcccgct tgctggcggtt ttccataggt ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat 5160

cgacgtcaa gtcagaggtg gcgaaaccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc 5220

cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc cgcttaccgg atacctgtcc 5280
gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt 5340
tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac 5400
cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg 5460
ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgctaca 5520
gagttcttga agtgggtggc taactacggc tacactagaa gaacagtatt tggatatctgc 5580
gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa 5640

accaccgctg gtagcggtagg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa 5700
ggatctcaag aagatccttt gatctttaga aaaactcatc gagcatcaaa tgaaactgca 5760
atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa aagccgtttc tgtaatgaag 5820
gagaaaaact accgaggcag ttccatagga tggcaagatc ctggtatcgg tctgcgattc 5880
cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttccctc gtcaaaaaata aggttatcaa 5940
gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa tggcaaaagt ttatgcattt 6000
ctttccagac ttgttcaaca ggccagccat tacgctcgtc atcaaaatca ctgcgatcaa 6060

ccaaaccgtt attcattcgt gattgcgcct gagccagacg aaatacgcga tcgctgttaa 6120
aaggacaatt acaaacagga atcgaatgca accggcgagc gaacactgcc agcgcatcaa 6180
caatatcttc acctgaatca ggatattctt ctaatacctg gaatgctgtt tttccgggga 6240
tcgcagtggg gagtaaccat gcatcatcag gactacggat aaaatgcttg atggtcggaa 6300
gaggcataaa ttccgtcagc cagtttagtc tgaccatctc atctgtaaca tcattggcaa 6360
cgctaccttt gccatgtttc agaaacaact ctggcgcatc gggcttccca tacaagcgat 6420
agattgtcgc acctgattgc ccgacattat cgcgagccca tttatacca tataaatcag 6480

catccatgtt ggaatttaat cgcggcctcg acgtttcccg ttgaatatgg ctcataaacac 6540
cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgatgat atatttttat 6600
cttgtgcaat gtaacatcag agattttgag acac 6634

<210> 83

<211> 926

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Left HR Arm_CD8 Product 3

<400> 83

acattaaaa caaaaatcc tacggaaata ctgaagaatg agtctcagca ctaaggaaaa 60

gcctccagca gctcctgctt tctgagggtg aaggatagac gctgtggctc tgcattgactc 120

actagcactc tatcacggcc atattctggc agggtcagtg gctccaacta acatttgttt 180

ggtaactttac agtttattaa atagatgttt atatggagaa gctctcattt ctttctcaga 240

agagcctggc taggaagggt gatgaggcac catattcatt ttgcagggtga aattcctgag 300

atgtaaggag ctgctgtgac ttgctcaagg ccttatatcg agtaaaccgt agtgctgggg 360

cttagacgca ggtgttctga tttatagttc aaaacctcta tcaatgagag agcaatctcc 420

tggtaatgtg atagatttcc caactaatg ccaacatacc ataaacctcc cattctgcta 480

atgcccgacc taagttgggg agaccactcc agattccaag atgtacagtt tgctttgctg 540

ggcctttttc ccatgcctgc ctttactctg ccagagtat attgctgggg ttttgaagaa 600

gacctatta aataaaagaa taagcagtat tattaagtag ccctgcattt caggtttctt 660

tgagtggcag gccaggcctg gccgtgaacg ttcactgaaa tcatggcctc ttggccaaga 720

ttgatagctt gtgcctgtcc ctgagtccca gtccatcacg agcagctggt ttctaagatg 780

ctatttcccg tataaagcat gagaccgtga cttgccagcc ccacagagcc ccgcccttgt 840

ccatcactgg catctggact ccagcctggg ttggggcaaa gagggaaatg agatcatgtc 900

ctaaccctga tcctcttgct ccacag 926

<210> 84

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TRAC (part of homology arm) _CD8 Product 3

<400> 84

atatccagaa ccctgacct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt 60

ctgtctgcct attc 74

<210> 85

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

GSG Linker_CD8 Product 3

<400> 85

gaattcggct ccgga	15
<210> 86	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
P2A_CD8 Product 3	
<400> 86	
gccactaact tcagcctgtt gaagcaggcc ggcgacgttg aggaaaaccc cggtcct	57
<210> 87	
<211> 63	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
CD8A Signal Peptide_CD8 Product 3	
<400> 87	
atggccttac cagtgaccgc cttgtctctg ccgctggcct tgctgtcca cgccgccagg	60
ccg	63
<210> 88	
<211> 483	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
CD8A Extracellular domain_CD8 Product 3	
<400> 88	
agccagttcc ggggtgtgcc gctggatcgg acctggaacc tgggcgagac agtggagctg	60
aagtgccagg tgctgtgtc caaccgacg tcgggtgct cgtggctctt ccagccgcgc	120
ggcgccgcgc ccagtcacc cttctctcta tacctctccc aaaacaagcc caaggcggcc	180
gaggggctgg acaccagcg gttctcgggc aagaggttgg gggacacctt cgtcctcacc	240
ctgagcgact tccgccgaga gaacgagggc tactatttct gctcggcct gagcaactcc	300
atcatgtact tcagccactt cgtgccggtc ttctgccag cgaagccac cacgacgcca	360
gcgccgcgac caccaacacc ggcgccacc atcgctgc agccctgtc cctgcgcca	420

gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga ctgcgcctgt 480

gat 483

<210> 89

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8A Transmembrane domain_CD8 Product 3

<400> 89

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtgggtcc ttctcctgtc actggtatc 60

acc 63

<210> 90

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8B intracellular domain_CD8 Product 3

<400> 90

cacctgtgct gccggcggag gagagcccgg ctctgtttca tgaacaatt ttacaaa 57

<210> 91

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Furin cleavage site_CD8 Product 3

<400> 91

agggctaaac gg 12

<210> 92

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

GSG Linker_CD8 Product 3

<400> 92
gaattcggct ccgga 15

<210> 93

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

P2A_CD8 Product 3

<400> 93
gccactaact tctccctgtt gaaacaggct ggcgatgttg aagaaaaccc cggtcct 57

<210> 94

<211> 78

<212> DNA

<213>
> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

HGH/SS/2_CD8 Product 3

<400> 94
atggccaccg gctctagaac aagcctgctg ctcgcttttg gccctgctctg cctcccatgg 60
ctccaagaag gatctgct 78

<210> 95

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TRB_VDJ (TCR097)_CD8 Product 3

<400> 95
aatgctgggtg tctactcagac cccaaaattc cgcctcctga agataggaca gagcatgaca 60

ctgcagtgtg cccaggatat gaaccataac tacatgtact ggtatcgaca agaccaggc 120

atggggctga agctgattta ttattcagtt ggtgctggta tctactgataa aggagaagtc 180

ccgaatggct acaacgtctc cagatcaacc acagaggatt tcccgtcag gctggagttg 240

gtgctccct cccagacatc tgtgtacttc tgtgccagct ccctacaggt tccctacaat 300

gagcagttct tcgggccagg gacacggctc accgtgctag aggac 345

<210> 96

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TCR-beta/constant_CD8 Product 3

<400> 96

ctgaaaaacg tgttcctcc aaaagtggcc gtgttcgagc cttctgaggc cgagatcagc	60
cacacacaga aagccacact cgtgtgtctg gctaccggt tctacccga tcacgtggaa	120
ctgtcttggt gggtaaacgg caaagagggtg cacagcggcg tcagcacaga tccccagcct	180
ctgaaagaac agcccgtct gaacgacagc cgctactgcc tgtctagcag actgagagtg	240
tccgccacct tctggcagaa cccagaaac cacttcagat gccaggtcca gttctacggc	300
ctgagcgaga acgatgagtg gaccaggac agagccaagc ctgtgacaca gatcgtgtct	360
gccgaagcct ggggcagagc cgattgtggc ttaccagcg agtcatacca gcagggcgtg	420

ctgtctgcca ccactctgta tgagatcctg ctcggaagg ccacactgta cgctgtgctg	480
gtgtctgctc tgggtctgat ggctatggc tcccgaggc gcatccccga ggcc	534

<210> 97

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Furin cleavage site_CD8 Product 3

<400> 97

cgggccaagc gg	12
---------------	----

<210> 98

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

GSG linker_CD8 Product 3

<400> 98

ggcagcggc	9
-----------	---

<210> 99

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

P2A_CD8 Product 3

<400> 99

gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc ggcgacgtgg aggagaaccc cggccct 57

<210> 100

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

HGH/SS_CD8 Product 3

<400> 100

atggccacag gcagcagaac atctctgctg ctggccttcg gactgctgtg tctgccttgg 60

ctgcaagagg gttccgcc 78

<210> 101

<211> 337

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Exemplary TRA-VDJ (TCR097) _CD8 Product 3

<400> 101

gctcagacag tactcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gaccgtgacc 60

ctgagctgca catatgacac cagtgagagt gattattatt tttcttggtg caagcagcct 120

cccagcaggg agatgattct cgttatttcg caagaagctt ataagcaaca gaatgcaaca 180

gagaatcggt tctctgtgaa cttccagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca 240

gactcacagc tgggggatgc cgcatgtat tttctgtgctt ttgggaactt caacaaattt 300

tactttggat ctgggaccaa actcaatgta aaaccaa 337

<210> 102

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TCR-alpha/constant_CD8 Product 3

<400> 102

atattcagaa ccccgatcct gctgtgtatc agctgcgcga cagcaagagc agcgacaaga	60
gcgtgtgttt gtgc	74

<210> 103

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TRAC CDS/right HR arm_CD8 Product 3

<400> 103

accgattttg attctcaaac aaatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca	60
gacaaaaactg tgctagacat gaggtctatg gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg	120
agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac	180
accttcttcc ccagcccagg	200

<210> 104

<211> 800

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Right HR arm_CD8 Product 3

<400> 104

taagggcagc tttggtgcct tcgcaggctg tttccttgct tcaggaatgg ccaggttctg	60
cccagagctc tggtaaatga tgtctaaaac tctctgatt ggtggtctcg gccttatcca	120
ttgccaccaa aacctcttt ttactaagaa acagttagcc ttgttctggc agtccagaga	180
atgacacggg aaaaaagcag atgaagagaa ggtggcagga gagggcacgt ggcccagcct	240
cagtctctcc aactgagttc ctgctgcct gcctttgctc agactgtttg ccccttactg	300
ctcttctagg cctcattcta agccccctct ccaagttgcc tctccttatt tctccctgtc	360
tgccaaaaaa tctttccag ctcactaagt cagtctcag cagtcactca ttaaccacc	420
aatcactgat tgtgccggca catgaatgca ccaggtgttg aagtggagga attaaaaagt	480
cagatgaggg gtgtgccag aggaagcacc attctagttg ggggagcca tctgtcagct	540

gggaaaagtc caaataactt cagattggaa tgtgttttaa ctcagggttg agaaaacagc 600
taccttcagg acaaaagtca gggaagggtc ctctgaagaa atgctacttg aagataccag 660
ccctaccaag ggcagggaga ggaccctata gaggcctggg acaggagctc aatgagaaag 720

gagaagagca gcaggcatga gttgaatgaa ggaggcaggg ccgggtcaca ggccttcta 780
ggccatgaga gggtagacag 800

<210> 105

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Artificial Sequence_CD8 Product 3

<400> 105

gctagc 6

<210> 106

<211> 620

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

pBR322_origin_CD8 Product 3

<400> 106

cgcggtgctg gcgtttttcc ataggtccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg 60
ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg 120
aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt 180
tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc ttaggtatc tcagttcgg 240
gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg 300
cgccctatcc ggtaactatc gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact 360
ggcagcagcc actggttaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt 420

cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct 480
gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac 540
cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc 600
tcaagaagat cctttgatct 620

<210> 107

<211> 810

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Kanamycin resistance (KanR2) _CD8 Product 3

<400> 107

ttagaaaaac tcacgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatacag gattatcaat	60
accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca	120
taggatggca agatcctggc atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc	180
tattaatttc cctcgtcaa aaataagggt atcaagttag aaatcaccat gagtgcgcac	240
tgaatccggt gagaatggca aaagtattatg catttctttc cagacttggt caacaggcca	300
gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacaaaa ccgttattca ttcgtgattg	360
cgctgagcc agacgaaata cgcgatcgtc gttaaaagga caattacaaa caggaatcga	420
atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata tttcacctg aatcaggata	480
ttcttctaac acctggaatg ctgtttttcc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc	540
atcaggagta cggataaaat gcttgatggc cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt	600
tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgcat gtttcagaaa	660
caactctggc gcatcgggct tccatacaa gcgatagatt gtcgcacctg attgcccgc	720
attatcgca gccatttat accatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg	780
cctcgacgtt tccggttgaa tatggctcat	810

<210> 108

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Kanamycin promoter_CD8 Product 3

<400> 108

aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcacg atgatatatt	60
tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt ttgagacac	99

<210> 109

<211> 5887

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Complete CD8 Product 3 construct with TCR97 insertion_CD8

Product 3

<400> 109

ggtaccacat taaaaacaca aaatcctacg gaaatactga agaatgagtc tcagcactaa	60
ggaaaagcct ccagcagctc ctgctttctg aggggtgaagg atagacgctg tggctctgca	120
tgactcacta gcactctatc acggccatat tctggcaggg tcagtggctc caactaacat	180
ttgtttggta ctttacagtt tattaaatag atgtttatat ggagaagctc tcatttcttt	240
ctcagaagag cctggctagg aaggtaggatg aggcaccata ttcattttgc aggtgaaatt	300
cctgagatgt aaggagctgc tgtgacttgc tcaaggcctt atatcgagta aacggtagtg	360
ctggggctta gacgcaggtg ttctgattta tagttcaaaa cctctatcaa tgagagagca	420
atctcctggt aatgtgatag atttccaac ttaatgcaa cataccataa acctccatt	480
ctgctaattgc ccagcctaag ttggggagac cactccagat tccaagatgt acagtttgc	540
ttgctgggcc tttttcccat gcctgccttt actctgccag agttatattg ctggggtttt	600
gaagaagatc ctattaaata aaagaataag cagtattatt aagtagccct gcatttcagg	660
tttccttgag tggcaggcca ggccctggccg tgaacgttca ctgaaatcat ggccctcttg	720
ccaagattga tagcttgtgc ctgtccctga gtcccagtcc atcacgagca gctggtttct	780
aagatgctat ttcccgtata aagcatgaga ccgtgacttg ccagccccac agagccccgc	840
ccttgtccat cactggcatc tggactccag cctgggttgg ggcaaagagg gaaatgagat	900
catgtcctaa cctgatcct cttgtccac agatatccag aacctgacc ctgccgtgta	960
ccagctgaga gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcgaat tcggctccgg	1020
agccactaac ttcagcctgt tgaagcaggc cggcgacgtt gaggaaaacc ccggtcctat	1080
ggccttacca gtgaccgct tgcctctgcc gctggccttg ctgctccag ccgccaggcc	1140
gagccagttc cgggtgtgc cgctggatcg gacctggaac ctggcgaga cagtggagct	1200
gaagtgccag gtgctgtgt ccaacccgac gtcgggctgc tcgtggctct tccagccgcg	1260
cggcgccgc gccagtcca ctttctctc atacctctc caaaacaagc ccaaggcggc	1320
cgaggggctg gacaccagc ggtttctggg caagaggttg ggggacacct tcgtcctcac	1380
cctgagcgac ttccgccgag agaacgaggg ctactatttc tgctcgccc tgagcaactc	1440
catcatgtac ttcagccact tcgtgccgtt ctctctgcca gcgaagccca ccacgacgc	1500
agcgccgcga ccaccaacac cggcgccac catcgctcg cagcccctgt ccctgcgcc	1560

agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg agggggctgg acttcgcctg	1620
tgatacttac atctgggcgc ccttggccgg gacttgtggg gtccttctcc tgtcactggt	1680
tatcacccac ctgtgctgcc ggccgaggag agcccggctt cgtttcatga aacaatttta	1740
caaaagggct aaacgggaat tcggctccgg agccactaac ttctccctgt tgaacaggc	1800
tggcgatgtt gaagaaaacc ccggtcctat ggccaccggc tctagaacaa gcctgctgct	1860
cgcttttggc ctgctctgcc tcccatggct ccaagaagga tctgctaata ctggtgtcac	1920
tcagacccca aaattccgca tctgaagat aggacagagc atgacactgc agtgtacca	1980
ggatatgaac cataactaca tgtactggta tcgacaagac ccaggcatgg ggctgaagct	2040
gatttattat tcagttgggt ctggatcac tgataaagga gaagtcgga atggctacaa	2100
cgctccaga tcaaccacag aggatttccc gctcaggctg gattggctg ctccctcca	2160
gacatctgtg tacttctgtg ccagctccct acaggttccc tacaatgagc agttcttcgg	2220
gccagggaca cggctcaccg tgctagagga cctgaaaaac gtgttccctc caaagtggc	2280
ctgtttcgag cttctgagg ccgagatcag ccacacacag aaagccacac tcgtgtgtct	2340
ggctaccggc ttctacccc atcacgtgga actgtcttgg tgggtcaacg gcaaagaggt	2400
gcacagcggc gtcagcacag atccccagcc tctgaaagaa cagcccgtc tgaacacag	2460
ccgtactgc ctgtctagca gactgagagt gtccgccacc ttctggcaga accccagaaa	2520
ccacttcaga tgccaggctc agttctacgg cctgagcgag aacgatgagt ggaccagga	2580
cagagccaag cctgtgacac agatcgtgtc tgccgaagcc tggggcagag ccgattgtgg	2640
ctttaccagc gattcatacc agcagggcgt gctgtctgcc accatcctgt atgagatcct	2700
gctcggcaag gccacactgt acgctgtgct ggtgtctgct ctggtgtga tggctatggt	2760
ctccgggag cgcattccc agggccgggc caagcggggc agcggcgcca ccaattcag	2820
cctgtgaag caggccggcg acgtggagga gaacccggc cctatggcca caggcagcag	2880
aacatctctg ctgttggcct tcggactgct gtgtctgcct tggctgcaag agggttccgc	2940
cgctcagaca gtcactcagt ctcaaccaga gatgtctgtg caggaggcag agaccgtgac	3000
cctgagctgc acatatgaca ccagtggag tgattattat ttattctggt acaagcagcc	3060
tcccagcagg cagatgattc tcgttattcg ccaagaagct tataagcaac agaagcaac	3120
agagaatcgt ttctctgga acttcagaa agcagccaaa tcttcagtc tcaagatctc	3180
agactcacag ctgggggatg ccgcgatgia ttctgtgct tttgggaact tcaacaatt	3240
ttactttgga tctgggacca aactcaatgt aaaaccaaatt attcagaacc ccgactctgc	3300
tgtgtatcag ctgcgcgaca gcaagagcag cgacaagagc gtgtgtttgt tcaccgattt	3360

tgattctcaa acaaatgtgt cacaaagtaa ggattctgat gtgtatatca cagacaaaac	3420
tgtgctagac atgaggctcta tggacttcaa gagcaacagt gctgtggcct ggagcaacaa	3480
atctgacttt gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcatt attccagaag acaccttctt	3540
ccccagccca ggtaagggca gctttgggtgc ctctgcaggc tgtttccttg cttcaggaat	3600
ggccaggttc tgcccagagc tctgttcaat gatgtctaaa actcctctga ttggtggtct	3660
cggccttate cattgccacc aaaaccctct ttttactaag aaacagtgag ccttgttctg	3720
gcagtccaga gaatgacacg ggaaaaaagc agatgaagag aaggltggcag gagagggcac	3780
gtggcccagc ctgagtctct ccaactgagt tcctgcctgc ctgcctttgc tcagactgtt	3840
tgccccttac tgctcttcta ggcctcattc taagccctt ctccaagttg cctctcctta	3900
tttctcctg tctgccaaaa aatctttccc agtccactaa gtcagtctca cgcagtcact	3960
cattaaccca ccaatcactg attgtgccgg cacatgaatg caccagggtg tgaagtggag	4020
gaattaaaaa gtcagatgag ggggtgtgcc agaggaagca ccattctagt tgggggagcc	4080
catctgtcag ctgggaaaag tccaaataac ttcagattgg aatgtgtttt aactcagggt	4140
tgagaaaaca gctacctta ggacaaaagt cagggaaggg ctctctgaag aaatgtact	4200
tgaagatacc agccctacca agggcaggga gaggacccta tagaggcctg ggacaggagc	4260
tcaatgagaa aggagaagag cagcaggcat gatttgaatg aaggaggcag ggccgggtca	4320
cagggccttc taggccaatga gagggtagac aggctagccg cgttgctggc gtttttccat	4380
aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgt caagtcagag gtggcgaaac	4440
ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt gcgctctct	4500
gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg	4560
ctttctcata gtcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg	4620
ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt	4680
cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg	4740
attagcagag cgaggatatgt aggcgggtgct acagagtct tgaagtgggt gcctaactac	4800
ggctacacta gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga	4860
aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt	4920
gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt	4980
agaaaaactc atcgagcatc aaatgaaact gcaatttatt catacagga ttatcaatac	5040
catatttttg aaaaagccgt ttctgtaatg aaggagaaaa ctcaccgagg cagttccata	5100

ggatggcaag atcctgggat cggtctgcga ttcgactcg tccaacatca atacaaccta 5160
ttaaattccc ctctcaaaa ataaggttat caagtgagaa atcaccatga gtgacgactg 5220
aatccggtga gaatggcaaa agtttatgca tttctttcca gacttggtca acaggccagc 5280
cattacgctc gtcatcaaaa tcactcgcat caaccaaacc gttattcatt cgtgattgcg 5340
cctgagccag acgaaatagc cgatcgctgt taaaaggaca attacaaaca ggaatcgaat 5400
gcaaccggcg caggaacact gccagcgcat caacaatatt ttcacctgaa tcaggatatt 5460
cttctaatac ctggaatgct gtttttccgg ggatcgcagt ggtgagtaac catgcatcat 5520

caggagtacg gataaaatgc ttgatggctg gaagaggcat aaattccgtc agccagttaa 5580
gtctgacat ctcatctgta acatcattgg caacgctacc tttgccatgt ttcagaaaca 5640
actctggcgc atcgggcttc ccatacaagc gatagattgt cgcacctgat tgcccacat 5700
tatcgcgagc ccatttatac ccataataat cagcatccat gttggaattt aatcgcggcc 5760
tcgacgtttc ccgttgaata tggctcataa cacccttgt attactgttt atgtaagcag 5820
acagttttat tgttcatgat gatataattt tatcttgtgc aatgtaacat cagagatttt 5880
gagacac 5887

<210> 110

<211> 926

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Left HR Arm_CD8 Product 4

<400> 110

acattaaaa caaaaatcc tacggaaata ctgaagaatg agtctcagca ctaaggaaaa 60
gcctccagca gctcctgctt tctgagggtg aaggatagac gctgtggctc tgcattgactc 120
actagcactc tatcacggcc atattctggc agggctcagt gctccaacta acatttgttt 180
ggtactttac agtttattaa atagatgttt atatggagaa gctctcattt ctttctcaga 240
agagcctggc taggaagggt gatgaggcac catattcatt ttgcaggtga aattcctgag 300

atgtaaggag ctgctgtgac ttgctcaagg ctttatatcg agtaaacggt agtgctgggg 360
cttagacgca gggtttctga tttatagttc aaaacctcta tcaatgagag agcaatctcc 420
tggtaatgtg atagatttcc caactaatg ccaacatacc ataaacctcc cattctgcta 480
atgccagcc taagttgggg agaccactcc agattccaag atgtacagtt tgctttgctg 540
ggcctttttc ccatgcctgc ctttactctg ccagagtat attgctgggg ttttgaagaa 600
gatcctatta aataaaagaa taagcagtat tattaagtag ccctgcattt caggtttctt 660

tgagtggcag gccaggcctg gccgtgaacg ttcactgaaa tcatggcctc ttggccaaga 720

ttgatagctt gtgcctgtcc ctgagtccca gtccatcacg agcagctggt ttctaagatg 780

ctatttcccg tataaagcat gagaccgtga cttgccagcc ccacagagcc cgccttctgt 840

ccatcactgg catctggact ccagcctggg ttggggcaaa gagggaaatg agatcatgtc 900

ctaaccctga tcctcttctc ccacag 926

<210> 111

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TRAC CDS_CD8 Product 4

<400> 111

atatccagaa cctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt 60

ctgtctgcct attc 74

<210> 112

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

GSG Linker_CD8 Product 4

<400> 112

gaattcggct ccgga 15

<210> 113

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

P2A_CD8 Product 4

<400> 113

gccactaact tcagcctgtt gaagcaggcc ggcgacgttg aggaaaaccc cggtcct 57

<210> 114

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8A Signal peptide_CD8 Product 4

<400> 114

atggccttac cagtaccgc cttgctctg ccgtggcct tgctgtcca cgccgccagg	60
cgc	63

<210> 115

<211> 483

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8A Extracellular Domain_CD8 Product 4

<400> 115

agccagtcc ggggtgtgcc gctggatcgg acctggaacc tgggcgagac agtggagctg	60
aagtgccagg tgctgtgtc caaccgacg tcgggtgtc cgtggctctt ccagccgcgc	120
ggcgccgcgc ccagtcacc ctctctcta tactctccc aaaacaagcc caaggcggcc	180
gaggggctgg acaccagcg gttctcgggc aagaggttgg gggacacctt cgtcctcacc	240
ctgagcgact tccgccgaga gaacgagggc tactatttct gctcggccct gagcaactcc	300
atcatgtact tcagccactt cgtgccggtc ttctgtccag cgaagccac cagcagcca	360
gcgccgcgac caccaacacc ggcccccacc atcgctcgc agccctgtc cctgcgcca	420
gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttcgcctgt	480
gat	483

<210> 116

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8A transmembrane domain_CD8 Product 4

<400> 116

atctacatct ggcgccctt ggccgggact tgtgggttcc ttctcctgtc actggttacc	60
acc	63

<210> 117

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD4 intracellular domain_CD8 Product 4

<400> 117

tgtgtcaggt gccggcaccg aaggcgccaa gcagagcgga tgtctcagat caagagactc 60

ctcagtgaga agaagacctg ccagtgtcct caccggtttc agaagacatg tagccccatt 120

<210> 118

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Furin Cleavage site_CD8 Product 4

<400> 118

agggctaaac gg 12

<210> 119

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

GSG Linker_CD8 Product 4

<400> 119

gaattcggct ccgga 15

<210> 120

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

P2A_CD8 Product 4

<400> 120

gccactaact tctccctgtt gaaacaggct ggcatgttg aagaaaaccc cggtcct 57

<210> 121

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

HGH/SS/2_CD8 Product 4

<400> 121

atggccaccg gctctagaac aagcctgctg ctcgcttttg gcctgctctg cctcccatgg	60
ctccaagaag gatctgct	78

<210> 122

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TRB_VDJ (TCR097) _CD8 Product 4

<400> 122

aatgctgggtg tctctcagac cccaaaattc cgcctcctga agataggaca gagcatgaca	60
ctgcagtgtga cccaggatat gaaccataac tacatgtact ggtatcgaca agaccaggc	120
atggggctga agctgattta ttattcagtt ggtgctggta tctactgataa aggagaagtc	180
ccgaatggct acaacgtctc cagatcaacc acagaggatt tcccgtcag gctggagttg	240
gtgctccct cccagacatc tgtgtacttc tgtgccagct ccctacaggt tccctacaat	300
gagcatttct tcgggccagg gacacggctc accgtgctag aggac	345

<210> 123

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TCR-beta/constant_CD8 Product 4

<400> 123

ctgaaaaacg tgitccctcc aaaagtggcc gtgttcgagc cttctgagc cgagatcagc	60
cacacacaga aagccacact cgtgtgtctg gctaccggt tctaccccga tcacgtggaa	120
ctgtcttggt gggtaaacgg caaagagggtg cacagcggcg tcagcacaga tccccagcct	180
ctgaaagaac agcccgtctt gaacgacagc cgctactgcc tgtctagcag actgagagtg	240

tccgccacct tctggcagaa ccccagaaac cacttcagat gccaggtcca gttctacggc 300
ctgagcgaga acgatgagtg gaccaggac agagccaagc ctgtgacaca gatcgtgtct 360
gccgaagcct ggggcagagc cgattgtggc ttaccagcg agtcatacca gcagggcgtg 420

ctgtctgcca ccacctgtga tgagatcctg ctgggcaagg ccacactgta cgctgtgctg 480
gtgtctgtctc tgggtgctgat ggctatggc tccgggagc gcacccccga ggcc 534

<210> 124

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Furin cleavage site_CD8 Product 4

<400> 124

cgggccaagc gg 12

<210> 125

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

GSG linker_CD8 Product 4

<400> 125

ggcagcggc 9

<210> 126

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

P2A_CD8 Product 4

<400> 126

gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc ggcgacgtgg aggagaaccc cggccct 57

<210> 127

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

HGH/SS_CD8 Product 4

<400

> 127

atggccacag gcagcagaac atctctgctg ctggccttcg gactgctgtg tctgccttgg	60
ctgcaagagg gttccgcc	78

<210> 128

<211> 337

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Exemplary TRA-VDJ (TCR097) _CD8 Product 4

<400> 128

gctcagacag tcaactcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gaccgtgacc	60
ctgagctgca catatgacac cagtgagagt gattattatt tattctggta caagcagcct	120
cccagcaggc agatgattct cgttattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaaca	180

gagaatcggtt tctctgtgaa cttccagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca	240
gactcacagc tgggggatgc cgcgatgtat ttctgtgctt ttgggaactt caacaaattt	300
tactttggat ctgggaccaa actcaatgta aaaccaa	337

<210> 129

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TCR-alpha/constant_CD8 Product 4

<400> 129

atattcagaa ccccgatcct gctgtgtatc agctgcgcga cagcaagagc agcgacaaga	60
gcgtgtgttt gttc	74

<210> 130

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

TRAC CDS/right HR arm_CD8 Product 4

<400> 130

accgattttg attctcaaac aaatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca	60
gacaaaactg tgctagacat gaggtctatg gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg	120
agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac	180
accttcttcc ccagcccagg	200

<210> 131

<211> 800

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Right HR arm_CD8 Product 4

<400> 131

taagggcagc ttggtgcct tcgcaggctg tttccttgct tcaggaatgg ccaggttctg	60
cccagagctc tggatcaatga tgtctaaaac tcctctgatt ggtggtctcg gccttatcca	120
ttgccaccaa aaccctcttt ttactaagaa acagttagcc ttgttctggc agtccagaga	180
atgacacggg aaaaaagcag atgaagagaa ggtggcagga gagggcacgt ggcccagcct	240
cagtctctcc aactgagttc ctgcctgcct gcctttgctc agactgtttg ccccttactg	300

ctttcttagg cctcattcta agccccctct ccaagttgcc tctccttatt tctccctgct	360
tgccaaaaaa tctttccag ctactaagt cagtctcacg cagtcactca ttaaccaccc	420
aatcactgat tgtgccggca catgaatgca ccaggtgttg aagtggagga attaaaaagt	480
cagatgaggg gtgtgccag aggaagcacc attctagtgt ggggagccca tctgtcagct	540
gggaaaagtc caaataactt cagattggaa tgtgttttaa ctgagggttg agaaaacagc	600
taccttcagg aaaaagtc ggaagggtct ctctgaagaa atgctacttg aagataccag	660
ccctaccaag ggcagggaga ggacctata gaggcctggg acaggagctc aatgagaaag	720

gagaagagca gcaggcatga gttgaatgaa ggaggcaggg ccgggtcaca gggccttcta	780
ggccatgaga gggtagacag	800

<210> 132

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Artificial Sequence_CD8 Product 4

<400> 132

gctagc

6

<210> 133

<211> 620

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

pBR322_origin_CD8 Product 4

<400> 133

cgcggttgctg gcgtttttcc ataggtccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg 60

ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg 120

aagtccttc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt 180

tctcccttcg ggaagcgagg cgctttctca tagctcagc ttaggtatc tcagttcgg 240

gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgctg 300

cgcttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact 360

ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcgggtg ctacagagtt 420

cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttgta tctgcgctct 480

gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac 540

cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc 600

tcaagaagat ctttgatct 620

<210> 134

<211> 810

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Kanamycin resistance (KanR2) _CD8 Product 4

<400> 134

ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcataatcag gattatcaat 60

accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca 120

taggatggca agatcctggt atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc 180

tattaatttc cctcgtcaa aaataaggtt atcaagttag aaatcaccat gagtgcagac 240

tgaatccggt gagaatggca aaagtttatg cttttctttc cagacttggt caacaggcca 300
gccattacgc tgcgtcatca aatcactcgc atcaacaaaa ccgttattca ttcgtgattg 360
cgctgagcc agacgaaata cgcgatcgtc gttaaaagga caattacaaa caggaatcga 420
atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata 480

ttcttctaata accgtgaatg ctgtttttcc ggggatcgcg gtggtgagta accatgcatc 540
atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt 600
tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa 660
caactctggc gcatcgggct tccatacaa gcgatagatt gtcgcacctg attgcccgcac 720
attatcgca gccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg 780
cctcgacgtt tcccgttgaa tatggctcat 810

<210> 135

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8 Product 4 Kanamycin promoter

<400> 135

aacaccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcatt atgatatatt 60
tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt ttgagacac 99

<210> 136

<211> 5950

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Complete CD8 Product 4 construct with TCR97 insertion_CD8

Product 4

<400> 136

ggtaccacat taaaaacaca aaatcctacg gaaatactga agaatgagtc tcagcactaa 60

ggaaaagcct ccagcagctc ctgctttctg aggggtgaagg atagacgctg tggctctgca 120
tgactcacta gcaactctatc accgccatat tctggcaggg tcagtggctc caactaacat 180
ttgtttggta ctttacagtt tattaatat atgtttatat ggagaagctc tcatttcttt 240
ctcagaagag cctggctagg aagggtgatg aggcaccata ttcattttgc aggtgaaatt 300

cctgagatgt aaggagctgc tgtgacttgc tcaaggcctt atatcgagta aacggtagtg	360
ctggggctta gacgcaggtg ttctgattta tagttcaaaa cctctatcaa tgagagagca	420
atctcctggt aatgtgatag atttcccaac ttaatgcca cataccataa acctccatt	480
ctgctaatagc ccagcctaag ttggggagac cactccagat tccaagatgt acagtttgct	540
ttgctgggcc tttttcccat gctgccttt actctgccag agttatattg ctggggtttt	600
gaagaagatc ctattaaata aaagaataag cagtattatt aagtagccct gcatttcagg	660
tttccttgag tggcaggcca ggccctggccg tgaacgttca ctgaaatcat ggccctcttg	720
ccaagattga tagcttgtgc ctgtccctga gtcccagtc atcacgagca gctggtttct	780
aagatgctat ttcccgtata aagcatgaga ccgtgacttg ccagccccac agagccccgc	840
ccttgtccat cactggcatc tggactccag cctgggttgg ggcaaagagg gaaatgagat	900
catgtcctaa cctgatcct cttgtccac agatatccag aacctgacc ctgccgtgta	960
ccagctgaga gactctaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcgaat tcggctccgg	1020
agccactaac ttcagcctgt tgaagcaggc cggcgacgtt gaggaaaacc ccggtcctat	1080
ggccttacca gtgaccgct tgcctctgcc gctggccttg ctgctccag ccgccagcc	1140
gagccagttc cgggtgtcgc cgctggatcg gacctggaac ctgggcgaga cagtggagct	1200
gaagtgccag gtgctgtgt ccaaccgac gtcgggctgc tcgtggctct tccagccgcg	1260
cggcgccgc gccagtccca ctttctct atacctctc caaaacaagc ccaaggcggc	1320
cgaggggctg gacaccagc ggttctcggg caagaggttg ggggacacct tcgtctcac	1380
cctgagcgac ttccgccgag agaacgagg ctactatttc tgctcgccc tgagcaactc	1440
catcatgtac ttcagccact tcgtgccgtt cttctgcca gcgaagcca ccacgacgc	1500
agcgccgca ccaccaaac cggcgccac catcgctcg cagccctgt cctgcgccc	1560
agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg agggggctgg acttcgctg	1620
tgatatctac atctgggcgc ccttgcccg gacttgtggg gtccttctcc tgtcactggt	1680
tatcacctgt gtcaggtgcc ggcaccgaag gcgccaagca gagcggatgt ctcatgcaa	1740
gagactcctc agtgagaaga agacctgcca gtgtcctcac cggtttcaga agacatgtag	1800
ccccattagg gctaaacggg aattcggtc cgagccact aacttctccc tgttgaaca	1860
ggctggcgat gttgaagaaa acccgggtcc tatggccacc ggctctagaa caagcctgct	1920
gctcgctttt ggctgtctt gcctccatg gctccaagaa ggatctgcta atgctggtgt	1980
cactcagacc caaaaattcc gcctcctgaa gataggacag agcatgacac tgcagtgtac	2040
ccaggatatg aaccataact acatgtactg gtatcgacaa gaccaggca tggggctgaa	2100

gctgatttat tattcagttg gtgctggat cactgataaa ggagaagtcc cgaatggcta 2160

caacgtctcc agatcaacca cagaggattt cccgctcagg ctggagttgg ctgctccctc 2220

ccagacatct gtgtacttct gtgccagctc cctacagggt ccctacaatg agcagttctt 2280

cgggccaggg acacggctca ccgtgctaga ggacctgaaa aacgtgttcc ctccaaaagt 2340

ggccgtgttc gagccttctg aggccgagat cagccacaca cagaaagcca cactcgtgtg 2400

tctggctacc ggcttctacc ccgatcacgt ggaactgtct tgggtgggtca acggcaaaga 2460

ggtgcacagc ggctcagca cagatcccca gcctctgaaa gaacagcccg ctctgaacga 2520

cagccgctac tgcctgtcta gcagactgag agtgtccgcc accttctggc agaaccacag 2580

aaaccacttc agatgccagg tccagttctc cggcctgagc gagaacgatg agtggaccca 2640

ggacagagcc aagcctgtga cacagatcgt gtctgccgaa gcctggggca gagccgattg 2700

tggctttacc agcgagtcat accagcaggg cgtgctgtct gccaccatcc tgtatgagat 2760

cctgctcggc aaggccacac tgtacgtgt gtctgggtgtct gctctgggtc tgatggctat 2820

ggtctcccgg gagcgcatcc ccgaggcccg ggccaagcgg ggacgcggcg ccaccaactt 2880

cagcctgctg aagcaggccg gcgacgtgga ggagaacccc ggccctatgg ccacaggcag 2940

cagaacatct ctgctgtgg ccttcggact gctgtgtctg ccttgggtgc aagagggttc 3000

cgccgctcag acagtcactc agtctcaacc agagatgtct gtgcaggagg cagagaccgt 3060

gacctgagc tgcacatatg acaccagtga gattgattat tatttattct ggtacaagca 3120

gcctcccagc aggcagatga ttctcgttat tcgccaagaa gcttataagc aacagaatgc 3180

aacagagaat cgtttctctg tgaacttcca gaaagcagcc aaatccttca gtctcaagat 3240

ctcagactca cagctggggg atgccgcgat gtatttctgt gcttttggga acttcaacaa 3300

attttacttt ggatctggga ccaactcaa tgtaaaacca aatattcaga accccgatcc 3360

tgctgtgtat cagctgcgcg acagcaagag cagcgacaag agcgtgtgtt tgttcaccga 3420

ttttgattct caaacaatg tgtcacaag taaggattct gatgtgtata tcacagacaa 3480

aactgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac agtgcgtgtg cctggagcaa 3540

caaactcgac ttigcatgtg caaacgcctt caacaacagc attattccag aagacacctt 3600

cttccccagc ccaggttaagg gcagctttgg tgccttcgca ggctgtttcc ttgcttcagg 3660

aatggccagg ttctgccag agctctggtc aatgatgtct aaaactcctc tgattgggtg 3720

tctcggcctt atccattgcc accaaaaccc tctttttact aagaacagat gagccttgtt 3780

ctggcagtc agagaatgac acgggaaaaa agcagatgaa gagaaggtgg caggagaggg 3840

cacgtggccc agcctcagtc tctccaactg agttcctgcc tgccctgcctt tgctcagact	3900
gtttgcccct tactgtctctt ctaggcctca ttctaagccc cttctccaag ttgcctctcc	3960
ttattttctcc ctgtctgccca aaaaatcttt ccagctcac taagtcagtc tcacgcagtc	4020
actcattaac ccaccaatca ctgattgtgc cggcacatga atgcaccagg tgttgaagtg	4080
gaggaattaa aaagtcagat gaggggtgtg ccagaggaa gcaccattct agttggggga	4140
gcccattctgt cagctgggaa aagtccaaat aacttcagat tggaatgtgt tttaactcag	4200
ggttgagaaa acagctacct tcaggacaaa agtcaggga ggcctctctg aagaaatgct	4260
acttgaagat accagcccta ccaagggcag ggagaggacc ctatagagc ctgggacagg	4320
agctcaatga gaaaggagaa gagcagcagg catgagtga atgaaggagg cagggccggg	4380
tcacagggcc ttctaggcca tgagagggtg gacaggctag ccgcgttgct ggcgtttttc	4440
catagctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	4500
aacccgacag gactataaag ataccaggcg ttccccctg gaagctccct cgtgcgctct	4560
cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgct ttctcccttc gggaagcgtg	4620
gcgctttctc atagctcac ctgtaggtat ctcagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag	4680
ctgggctgtg tgcacgaacc cccgttcag cccgaccgt gcgccttacc cgtaactat	4740
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	4800
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac	4860
tacggctaca ctagaagaac agtatttgggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc	4920
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtgtttt	4980
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc	5040
tttagaaaaa ctcatcgagc atcaaatgaa actgcaattt attcatatca ggattatcaa	5100
taccatattt ttgaaaaagc cgtttctgta atgaaggaga aaactcacg aggcagttec	5160
ataggatggc aagatcctgg tatcggtctg cgattccgac tcgtccaaca tcaatacaac	5220
ctattaattt cccctcgta aaaataaggt tatcaagtga gaaatcacca tgagtgcga	5280
ctgaatccgg tgagaatggc aaaagtttat gcattttttt ccagacttgt tcaacaggec	5340
agccattacg ctgctcatca aaatcactcg catcaaccaa accgttattc attcgtgatt	5400
gcgcctgagc cagacgaaat acgcgatcgc tgttaaaagg acaattacaa acaggaatcg	5460
aatgcaaccg gcgcaggaac actgccagcg catcaacaat attttcacct gaatcaggat	5520
attcttctaa tacctggaat gctgtttttc cggggatcgc agtggtagt aaccatgcat	5580
catcaggagt acggataaaa tgcttgatgg tcggaagagg cataaattcc gtcagccagt	5640
ttagtctgac catctcatct gtaacatcat tggcaacgct accttgcca tgtttcagaa	5700

acaactctgg cgcatcgggc ttcccatata agcgatagat tgtcgcacct gattgcccga 5760
cattatcgcg agccattta taccatata aatcagcatc catgttgga ttaatcgcg 5820
gcctcgacgt ttcccgttga atatggetca taacaccct tgtattactg tttatgtaag 5880
cagacagttt tattgttcat gatgatata tttatcttg tgcaatgtaa catcagagat 5940

tttgagacac 5950

<210> 137

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

GSG Linker_CD8 Products 1, 2, 3, 4

<400> 137

Gly Ser Gly

1

<210> 138

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

P2A_CD8 Products 1, 2, 3, 4

<400> 138

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

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 139

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8alpha Signal Peptide_CD8 Products 1, 2, 3, 4

<400> 139

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 140

<211> 161

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8alpha Extracellular Domain_CD8 Products 1, 2, 3, 4

<400> 140

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

<210> 141

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8alpha Transmembrane Domain_CD8 Products 1, 2, 3, 4

<400> 141

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

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr

20

<210> 142

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8alpha Intracellular Domain_CD8 Product 1 and 2

<400> 142

Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg

1 5 10 15

Pro Val Val Lys Ser Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val

20 25 30

<210> 143

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Furin Cleavage Site_CD8 Products 1, 2, 3, 4

<400> 143

Arg Ala Lys Arg

1

<210> 144

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8beta Signal Peptide _CD8 Product 2

<400> 144

Met Arg Pro Arg Leu Trp Leu Leu Leu Ala Ala Gln Leu Thr Val Leu

1 5 10 15

His Gly Asn Ser Val

20

<210> 145

<211> 149

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8beta Extracellular Domain _CD8 Product 2

<400> 145

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

145

<210

> 146

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8beta Transmembrane Domain_CD8 Product 2

<400> 146

Ile Thr Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Val Leu Val Leu Leu Val Ser

1

5

10

15

Leu Gly Val Ala Ile

20

<210> 147

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD8beta Intracellular Domain_CD8 Products 2 and 3

<400> 147

His Leu Cys Cys Arg Arg Arg Arg Ala Arg Leu Arg Phe Met Lys Gln

1

5

10

15

Phe Tyr Lys

<210> 148

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD4 Intracellular Domain_CD8 Product 4

<400> 148

Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln
 1 5 10 15
 Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro His Arg

 20 25 30
 Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile
 35 40