



등록특허 10-2259109



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월01일  
(11) 등록번호 10-2259109  
(24) 등록일자 2021년05월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 14/725* (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)  
*A61K 38/00* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
*C12N 5/0783* (2010.01) *C12N 5/16* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07K 14/7051* (2013.01)  
*A61K 35/17* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7029016
- (22) 출원일자(국제) 2017년03월16일  
심사청구일자 2019년04월17일
- (85) 번역문제출일자 2018년10월08일
- (65) 공개번호 10-2018-0118783
- (43) 공개일자 2018년10월31일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/056260
- (87) 국제공개번호 WO 2017/158103  
국제공개일자 2017년09월21일
- (30) 우선권주장  
1604492.7 2016년03월16일 영국(GB)  
62/308,975 2016년03월16일 미국(US)

- (56) 선행기술조사문헌  
WO2015075939 A1  
Clin. Devel. Immunol., Vol. 2010, Article ID567594(2010.)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 김경미

(54) 발명의 명칭 암에 대한 면역요법에서의 사용을 위하여 형질주입된 T 세포 및 T 세포 수용체

**(57) 요 약**

본 설명은 암 세포의 표적화를 위한 종양 관련 항원(TAA)에 결합하는 T 세포 수용체(TCR), 이를 발현하는 세포, 이의 생산 방법 및 이를 사용한 암 치료의 방법에 관한 것이다. 특히 본 설명은 KVLEHVVVRV(서열 식별 번호 1)의 아미노산 서열을 갖는 MAG-003과 같은, 펩티드와 함께 HLA 클래스 I 또는 II 분자에 결합하는 TCR 및 그 변이

(뒷면에 계속)

**대 표 도** - 도1



체에 관한 것이다. 본 설명은 또한 면역요법 방법에서의 사용을 위한 펩티드, 단백질, 핵산 및 세포에 관한 것이다. 특히 본 발명은 암의 면역요법에 관한 것이다. 본 설명은 또한 예를 들어 항종양 면역 반응을 촉진시키거나 T 세포를 생체외 자극하여 환자로 이전시키는 백신 조성물의 활성 약학적 성분으로 작용할 수 있는 종양 관련 T 세포 펩티드 에피톱 단독 또는 기타 종양 관련 펩티드와의 병용에 관한 것이다. 주조직적합 복합체(MHC)의 분자에 결합된 펩티드 또는 그러한 펩티드는 항체, 가용성 T 세포 수용체 및 기타 결합하는 분자의 표적이 될 수도 있다.

(52) CPC특허분류

*A61K 38/00* (2013.01)

*A61P 35/00* (2018.01)

*C12N 5/0636* (2013.01)

*C12N 5/163* (2013.01)

*C12N 2510/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

8 내지 14개 아미노산 길이의 웨티드에 포함되고 인간 백혈구 항원(HLA) 클래스 I 문자와 복합체를 형성하는 서열번호 1의 아미노산 서열에 특이적이고 선택적으로 결합하는 항원 인식 구축물로서,

상기 항원 인식 구축물이 T 세포 수용체(TCR)  $\alpha$  가변영역 및 TCR  $\beta$  가변영역, 또는 TCR  $\gamma$  가변영역 및 TCR  $\delta$  가변영역을 포함하되,

(i) TCR  $\alpha$  가변영역 또는 TCR  $\gamma$  가변영역이 서열 식별 번호 58, 59 및 60의 아미노산 서열을 갖는 상보 결정 영역(CDR)을 포함하고, TCR  $\beta$  가변영역 또는 TCR  $\delta$  가변영역이 서열 식별 번호 66, 67 및 68의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하거나,

(ii) TCR  $\alpha$  가변영역 또는 TCR  $\gamma$  가변영역이 서열 식별 번호 42, 43 및 44의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하고, TCR  $\beta$  가변영역 또는 TCR  $\delta$  가변영역이 서열 식별 번호 50, 51 및 52의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하거나,

(iii) TCR  $\alpha$  가변영역 또는 TCR  $\gamma$  가변영역이 서열 식별 번호 74, 75 및 76의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하고, TCR  $\beta$  가변영역 또는 TCR  $\delta$  가변영역이 서열 식별 번호 82, 83 및 84의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하고,

상기 항원 인식 구축물이 하나 이하의 아미노산 치환을 갖는 각 CDR 아미노산 서열을 포함하는,

항원 인식 구축물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항원 인식 구축물이 항체 또는 그의 유도체 또는 단편,  $\alpha/\beta$ -TCR 또는 그의 단편 또는 유도체, 또는  $\gamma/\delta$ -TCR 또는 그의 단편 또는 유도체인, 항원 인식 구축물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 항체가 이중특이적 항체인, 항원 인식 구축물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항원 인식 구축물이 시험대상자에서 면역 반응을 유도할 수 있는, 항원 인식 구축물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 면역 반응이 인터페론(IFN)  $\gamma$  수준 증가의 특징을 가지는, 항원 인식 구축물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

인간화, 키메라화 및/또는 쥐과화되는 항원 인식 구축물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

TCR  $\alpha$  또는  $\gamma$  사슬, 및/또는 TCR  $\beta$  또는  $\delta$  사슬을 포함하되,

TCR  $\alpha$  또는  $\gamma$  사슬 서열이 서열 식별 번호 58 내지 60의 아미노산 서열을 갖는 CDR1 내지 CDR3 서열을 포함하고, TCR  $\beta$  또는  $\delta$  사슬 서열이 서열 식별 번호 66 내지 68의 아미노산 서열을 갖는 CDR1 내지 CDR3 서열을 포함하거나;

TCR  $\alpha$  또는  $\gamma$  사슬 서열이 서열 식별 번호 42 내지 44의 아미노산 서열을 갖는 CDR1 내지 CDR3 서열을 포함하고, TCR  $\beta$  또는  $\delta$  사슬 서열이 서열 식별 번호 50 내지 52의 아미노산 서열을 갖는 CDR1 내지 CDR3 서열을 포함하거나;

TCR  $\alpha$  또는  $\gamma$  사슬 서열이 서열 식별 번호 74 내지 76의 아미노산 서열을 갖는 CDR1 내지 CDR3 서열을 포함하고, TCR  $\beta$  또는  $\delta$  사슬 서열이 서열 식별 번호 82 내지 84의 아미노산 서열을 갖는 CDR1 내지 CDR3 서열을 포함하는, 항원 인식 구축물.

## 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 구축물이 적어도 하나의 TCR  $\alpha$  및 하나의 TCR  $\beta$  사슬 서열을 포함하는 TCR 또는 그의 단편이고,

(i) 상기 TCR  $\alpha$  사슬 서열이 서열 식별 번호 57의 아미노산 서열을 갖는 가변 영역 서열을 포함하거나 서열 식별 번호 57의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 영역 서열을 포함하고, 상기 서열 식별 번호 57의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 영역 서열이 서열 식별 번호 58, 59 및 60의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하며, 상기 CDR 서열이 변형되지 않은 것이고,

상기 TCR  $\beta$  사슬 서열이 서열 식별 번호 65의 아미노산 서열을 갖는 가변 영역 서열을 포함하거나 서열 식별 번호 65의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 영역 서열을 포함하고, 상기 서열 식별 번호 65의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 영역 서열이 서열 식별 번호 66, 67 및 68의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하며, 상기 CDR 서열이 변형되지 않은 것이거나, 또는

(ii) 상기 TCR  $\alpha$  사슬 서열이 서열 식별 번호 41의 아미노산 서열을 갖는 가변 영역 서열을 포함하거나 서열 식별 번호 41의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 영역 서열을 포함하고, 상기 서열 식별 번호 41의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 영역 서열이 서열 식별 번호 42, 43 및 44의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하며, 상기 CDR 서열이 변형되지 않은 것이고,

상기 TCR  $\beta$  사슬 서열이 서열 식별 번호 49의 아미노산 서열을 갖는 가변 영역 서열을 포함하거나 서열 식별 번호 49의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 영역 서열을 포함하고, 상기 서열 식별 번호 49의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 영역 서열이 서열 식별 번호 50, 51 및 52의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하며, 상기 CDR 서열이 변형되지 않은 것이거나, 또는

(iii) 상기 TCR  $\alpha$  사슬 서열이 서열 식별 번호 73의 아미노산 서열을 갖는 가변 영역 서열을 포함하거나 서열 식별 번호 73의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 영역 서열을 포함하고, 상기 서열 식별 번호 73의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 영역 서열이 서열 식별 번호 74, 75 및 76의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하며, 상기 CDR 서열이 변형되지 않은 것이고,

상기 TCR  $\beta$  사슬 서열이 서열 식별 번호 81의 아미노산 서열을 갖는 가변 영역 서열을 포함하거나 서열 식별 번호 81의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 영역 서열을 포함하고, 상기 서열 식별 번호 81의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 가변 영역 서열이 서열 식별 번호 82, 83 및 84의 아미노산 서열을 갖는 CDR을 포함하며, 상기 CDR 서열이 변형되지 않은 것인,

항원 인식 구축물.

## 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 구축물이 적어도 하나의 TCR  $\alpha$  및 하나의 TCR  $\beta$  사슬 서열을 포함하는 TCR이고, 상기 TCR  $\alpha$  사슬 서열이 서열 식별 번호 62, 46 및 78로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%,

98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 불변 영역을 포함하고, 상기 TCR  $\beta$  사슬 서열이 서열 식별 번호 70, 54 및 86으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 불변 영역을 포함하는, 항원 인식 구축물.

### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항원 인식 구축물을 인코딩하는 핵산.

### 청구항 11

제10항에 따른 핵산을 포함하는 벡터.

### 청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항원 인식 구축물, 상기 항원 인식 구축물을 인코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

### 청구항 13

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항원 인식 구축물; 상기 항원 인식 구축물을 인코딩하는 핵산; 상기 핵산을 포함하는 벡터; 또는 상기 항원 인식 구축물, 상기 핵산 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포; 및  
약학적으로 허용가능한 담체, 안정화제 및/또는 부형제

를 포함하는, 악성 또는 양성 종양 질병을 포함하는 증식성 질병의 진단, 예방 및/또는 치료에서의 사용을 위한  
약학 조성물.

### 청구항 14

종양 관련 항원(TAA) 특이적 항원 인식 구축물을 발현하는 세포주의 제조 방법으로서,

- (a) 적절한 숙주 세포를 제공하는 단계,
  - (b) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항원 인식 구축물을 인코딩하는 코딩 서열을 포함하는 유전자 구축물을 제공하는 단계,
  - (c) 상기 적절한 숙주 세포 안으로 상기 유전자 구축물을 도입하는 단계, 및
  - (d) 상기 적절한 숙주 세포에 의해 상기 유전자 구축물을 발현하는 단계
- 를 포함하는 방법.

### 청구항 15

제14항에 있어서,

상기 항원 인식 구축물이 변형된 TCR이고, 상기 변형이, 라벨을 포함하는 기능적 도메인, 또는 막 고정 도메인을 포함하는 도메인을 추가하는 것을 포함하는, 방법.

### 청구항 16

삭제

### 청구항 17

삭제

### 청구항 18

삭제

### 청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

삭제

**발명의 설명****기술 분야****배경 기술**

[0001]

T 세포 기반의 면역요법은 종양 관련 또는 종양 특정 단백질로부터 유래된 펩티드 에피톱을 표적으로 하며, 이는 주조직적합 복합체(MHC)의 분자에 의해 제시된다. 종양 관련 항원(TAA)은 해당 종양의 세포에서 보통 상향조절되는 같은 원천의 변형되지 않은 세포들에 비해서, 발현된 효소, 수용체, 전사 인자 등과 같은 모든 단백질 클래스에서 유도된 펩티드일 수 있다.

[0002]

세포 면역 반응의 특정 요소는 종양 세포를 특정하게 인식하고 파괴하는 능력이 있다. 종양 침윤 세포 모집단 또는 말초 혈액으로부터 T 세포의 분리는 그러한 세포가 암에 대한 자연 면역 방어에서 중요한 역할을 수행함을 시사한다. 특히 CD8-양성 T 세포는 세포질에 위치한 단백질이나 결손 리보솜 산물들(DRIPS)로부터 유래된 보통 8 내지 10개의 주 조직적합 복합체(MHC)-포함 펩티드의 클래스 I 분자를 인지하며, 이 반응에서 중요한 역할을 한다. 인간의 MHC 분자도 인간 백혈구 항원(HLA)로 지정된다.

[0003]

MAGEA4는 MAGEA 유전자 계열의 구성원이다. MAGEA4 단백질 및 mRNA의 발현은 다양한 암의 발생과 예후와 연관되어 왔다. MAG-003, 즉, KVLEHVVVRV(서열 식별 번호 1)는 MAGEA4(아미노산 286-294)의 HLA-A\*0201 제한 세포독성 T 립프구(CTL) 에피톱이다. (Jia et al. 2010; Wu et al. 2011)의 전문이 참조문헌으로 여기에 포함된다. MAG-003은 HLA-A<sup>\*</sup>0201-양성 PBMC 그리고 HLA-A\*0201/Kb 유전자 삽입 마우스로부터 시험관 내에서 펩티드 특이적 CTL을 촉발한다. MAG-003 유도 CTL은 HLA-A\*0201 제한 방식으로 세포를 용해시키며, MAG-003이 HLA-A\*0201 제약 CTL 에피톱임을 보여준다.

[0004]

MHC 분자에는 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II의 두 클래스가 있다. 펩티드와 MHC 클래스 I 분자의 복합체는 적절한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 CD8 양성 T 세포에 의해서 인식되는 반면, 펩티드와 MHC 클래스 II 분자의 복합체는 적절한 TCR을 갖는 CD4 양성 조력 T 세포에 의해 인식된다. CD8 및 CD4에 의존하는 두 유형의 반응이 협동 및 상승 작용을 통해 항종양 효과에 기여하므로, 종양 연관 항원들 및 상응하는 T 세포 수용체들의 식별 및 특성화는 종양 백신 및 세포 용법 등 암 면역 요법의 개발에 중요하다.

[0005]

MHC 클래스 I 의존 면역 반응에서, 펩티드는 종양 세포에 의해 발현되는 어떤 MHC 클래스 I 분자와 결합할 수 있어야 하며 또한 특정한 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 T 세포에 의해 인식될 수 있어야 한다. 그러므로, TAA는 종양 백신 및 세포 요법에 제한되지 않되 이를 포함하는 T 세포 기반 요법의 개발에 있어서 시작점이 된다.

[0006]

본 설명에 따른 특정 TCR(예: 가용성 TCR 또는 세포 표면 TCR) 및 항체 또는 다른 결합 분자(복합체)에 의해 펩티드-MHC를 표적화하는 경우, 기저 펩티드의 면역원성을 이차적인 것이다. 이러한 경우 그 제시가 결정 요인이다.

[0007]

암 요법을 위한 분자 표적화 약물의 개발에서 진전이 있었지만, 암 세포에 고도로 특이적인 분자를 특이적으로 표적화하는 새로운 항암 제제의 개발 요구가 여전히 업계에 존재한다. 본 설명은 MAG-003에 특이적으로 결합하는 신규 MAG-003 TCR, 핵산, 백터 및 숙주 세포를 제공하며; 또한 암의 치료에서 그러한 분자의 사용 방법을 제공함으로써 그러한 요구를 해결한다.

**발명의 내용**

- [0008] 본 설명은 알파 사슬 및/또는 베타 사슬("알파/베타 TCR")을 포함하는 T 세포 수용체(TCR)에 관한 것이다. 다른 구현에서, 본 설명은 감마 사슬 및/또는 엘타 사슬("감마/엘타 TCR")을 포함하는 TCR에 관한 것이다.
- [0009] 본 설명은 또한 TCR들, 개별 TCR 하위 단위(단일 또는 조합) 및 그 하위 도메인, 가용성 TCR(sTCRs), 예를 들어 본래의 TCR 및 클로닝된 TCR에 존재하지 않는 불변 도메인 잔기들 사이에 적어도 하나의 이황화 사슬만 결합을 갖는 가용성 알파/베타 이합체 TCR들(상기 TCR들은 자가조직의 또는 동종 이용의 T 세포 또는 T 세포 전구 세포로 조작됨) 그리고 이를 만드는 방법은 물론 상기 TCR을 갖는 다른 세포들에 관한 것이다.
- [0010] 본 발명은 또한 MAG-003 펩티드-HLA 분자 복합체에 특이적으로 결합하는 TCR에 관한 것으로, MAG-003 펩티드는 KVLEHVVRV(서열 식별 번호 1) 및 서열 식별 번호 2 내지 서열 식별 번호 24에 보이는 것들과 같은 이들의 변이체들로부터 선택된다. 한 구현에서 HLA 분자는 HLA-A\*02이다.
- [0011] 본 설명은 또한 표 2에 나와 있는 TCR 알파 가변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성, 바람직하게는 90% 서열 동일성을 갖는 TCR 알파 가변 도메인; 그리고 표 2에 나와 있는 TCR 베타 변수 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성, 바람직하게는 90% 서열 동일성을 갖는 TCR 베타 가변 도메인을 포함하는 TCR에 관한 것이다.
- [0012] 한 구현에서, TCR 알파 가변 도메인은 표 2에 나와 있는 TCR 알파 도메인에 대해 적어도 하나의 돌연변이를 가지며; 및/또는 TCR 베타 가변 도메인은 표 2에 나와 있는 TCR 알파 도메인에 대해 적어도 하나의 돌연변이를 갖는다. 한 구현에서, TCR 알파 가변 도메인 및/또는 TCR 베타 가변 도메인에서 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 TCR은 MAG-003 펩티드-HLA 분자 복합체에 대해 결합 친화도 및/또는 결합 반감기를 가지며, 이 반감기는 비돌연변이 TCR 알파 도메인 및/또는 비돌연변이 TCR 베타 가변 도메인을 포함하는 TCR의 그것의 적어도 2배이다.
- [0013] 본 설명의 TCR 알파 사슬은 또한 표 2에 나와 있는 TCR 알파 불변 도메인에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 TCR 알파 불변 도메인을 포함할 수 있다. 본 설명의 TCR 베타 사슬은 또한 표 2에 나와 있는 TCR 베타 불변 도메인에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 TCR 베타 불변 도메인을 포함할 수 있다.
- [0014] 본 설명은 TCR 알파 사슬을 또한 TCR 알파 막횡단 도메인 및/또는 TCR 알파 세포간 도메인을 포함할 수 있다. 본 설명은 TCR 베타 사슬을 또한 TCR 베타 막횡단 도메인 및/또는 TCR 베타 세포간 도메인을 포함할 수 있다.
- [0015] 본 설명은 또한 표 2에 밝혀진 하나 이상의 알파 사슬 상보 결정 영역(CDR)을 포함하는 TCR 알파 사슬 그리고 표 2에 나와 있는 CDR에 대해 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 치환을 갖는 그 변이체에 관한 것이다. 또한 표 2에 나와 있는 CDR1, CDR2 및 CDR3로부터 선택되는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 TCR 알파 사슬이 기술된다. 또한 표 2에 나와 있는 알파 사슬 CDR3을 포함하는 TCR 알파 사슬이 기술된다.
- [0016] 본 설명은 또한 표 2에 밝혀진 하나 이상의 베타 사슬 상보 결정 영역(CDR)을 포함하는 TCR 베타 사슬 그리고 표 2에 나와 있는 CDR에 대해 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 치환을 갖는 그 변이체에 관한 것이다. 또한 표 2에 나와 있는 CDR1, CDR2 및 CDR3로부터 선택되는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 TCR 베타 사슬이 기술된다. 또한 표 2에 나와 있는 베타 사슬 CDR3을 포함하는 TCR 베타 사슬이 기술된다.
- [0017] 본 설명은 또한 본 설명의 TCR을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분리된 또는 재조합 핵산에 관한 것이다. 한 구현에서, 본 설명의 핵산은 표 2에 나와 있는 TCR 알파 사슬 및 TCR 베타 사슬을 인코딩한다.
- [0018] 본 설명은 또한 여기서 기술된, TCR 알파 사슬, 베타 사슬 또는 둘 다를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0019] 본 설명은 또한 여기서 기술된, TCR 알파 사슬, 베타 사슬 또는 둘 다를 인코딩하는 핵산을 발현하는 재조합 발현 벡터를 포함하는 분리된 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0020] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 재조합 발현 벡터를 포함하는 분리된 숙주 세포에 관한 것으로, 바람직하게는 그 세포가 말초 혈액 림프구(PBL), 더욱 바람직하게는 CD4 또는 CD8 양성 T 림프구이다.
- [0021] 본 설명은 또한 본 설명의 재조합 발현 벡터를 포함하는 분리된 PBL에 관한 것으로, PBL은 CD8+ T 세포 또는 CD4+ T 세포이다.
- [0022] 본 설명은 여기에 기술된 적어도 한 개의 숙주 세포를 포함하는 세포의 모집단에 관한 것이다.
- [0023] 본 설명은 또한 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포암, 뇌암, 위암, 결장직장암, 간세포암, 췌장암, 전립선암,

백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암, 식도암과 같은 증식성 질병의 치료에서의 사용을 위한 본 설명의 TCR 및 숙주 세포에 관한 것이다.

[0024] 한 양태에서, 숙주 세포가 본 설명에 따른 적어도 하나의 TCR을 인코딩하는 핵산으로 형질주입된 CD8+ T 세포 또는 CD4+ T 세포이며, TCR은 표 2에 밝혀진 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 양태에서, 그러한 숙주 세포는 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포암, 뇌암, 위암, 결장직장암, 간세포암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암, 식도암 그리고 바람직하게는 비소세포 폐암의 면역요법에서 사용된다.

[0025] 본 설명은 또한 여기서 기술된 TCR, 핵산, 벡터 또는 숙주 세포와 암 세포가 접촉하는 것을 포함하는 암 세포의 살해 또는 수 감소의 방법에 관한 것이다. 또한 여기서 기술된 TCR, 핵산, 벡터 또는 숙주 세포를 필요로 하는 시험대상자에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료의 방법도 제공된다.

[0026] 다른 양태에서, 본 설명은 하기 식 I에 따른 아미노산 서열을 포함하는 MAG-003 펩티드, 예를 들어 분리된 펩티드에 관한 것이다:

[식 I]

$X_1X_2\text{LEHVVRX}_3$  (서열 식별 번호 25)

상기 식에서,

$X_1$ 은 아미노산 K 및 Y에서 선택되고,  $X_2$ 는 아미노산 V, L 및 A에서 선택되고,  $X_3$ 는 V, L, A 및 I에서 선택되며, 또한 상기 펩티드는 HLA 클래스 I 또는 클래스 II 문자에 결합하며/하거나 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도한다. 한 양태에서, 상기 펩티드는 기저 전장 폴리펩티드가 아니다.

[0031] 바람직한 것은 서열 식별 번호 1 또는 서열 식별 번호 1에 대해 적어도 66%, 바람직하게는 적어도 77% 그리고 더욱 바람직하게는 88% 상동성인(바람직하게는 적어도 77% 또는 적어도 88% 동일한) 이의 변이체 서열로 구성된 군으로부터 선택된 서열(상기 변이체는 HLA 클래스 I 또는 클래스 II 문자에 결합하며/하거나 상기 펩티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하며) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것으로, 상기 펩티드는 기저 전장 폴리펩티드가 아니다.

[0032] 본 설명은 또한 서열 식별 번호 1 또는 서열 식별 번호 1에 대해 적어도 66%, 바람직하게는 77% 그리고 더욱 바람직하게는 88% 상동성인(바람직하게는 적어도 77% 또는 적어도 88% 동일한)로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 본 발명의 펩티드에 관한 것으로, 상기 펩티드나 그 변이체는 바람직하게는 8개 내지 100개, 바람직하게는 8개 내지 30개, 가장 바람직하게는 8개 내지 14개 아미노산의 전장을 갖는다.

[0033] 다음 표는 본 설명에 따른 예의 펩티드들 그리고 그 해당 서열 식별 번호들을 보여준다. 한 양태에서, 표 1의 펩티드는 HLA-A\*02에 결합할 수 있다. 다른 양태에서, 여기서 기술된 TCR은 표 1의 하나 이상의 펩티드에 결합하거나 특이적으로 결합할 수 있다.

[표 1]

[0035]

본 설명에 따른 웨티드

서열 식별 번호	서열
1	KVLEHVVVRV
2	KVLEHVVRL
3	KVLEHVVRA
4	KVLEHVVRI
5	KLLEHVVVRV
6	KLLEHVVRL
7	KLLEHVVRA
8	KLLEHVVRI
9	KALEHVVVRV
10	KALEHVVRL
11	KALEHVVRA
12	KALEHVVRI
13	YLLEHVVVRV
14	YLLEHVVRL
15	YLLEHVVRA
16	YLLEHVVRI
17	YALEHVVVRV
18	YALEHVVRL
19	YALEHVVRA
20	YALEHVVRI
21	YVLEHVVVRV
22	YVLEHVVRL
23	YVLEHVVRA
24	YVLEHVVRI

[0036]

한 양태에서, 본 설명은 여기서 기술된 하나 이상의 웨티드를 사용하는 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포암, 뇌암, 위암, 결장직장암, 간세포암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암, 식도암과 같은 증식성 질병의 치료에 관한 것이다.

[0038]

특히 바람직하기로는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24로 구성된 군으로부터 선택된 본 설명에 따른 단독 또는 조합의 웨티드이다. 더 바람직하기로는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24(표 1 참조)로 구성된 군으로부터 선택된 단일 또는 조합의 웨티드들 그리고 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포암, 뇌암, 위암, 결장직장암, 간세포 암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암, 식도암 그리고 바람직하게는 비소세포 폐암의 면역요법에서의 이들의 사용이다.

[0039]

한 양태에서, 본 설명은 HLA 클래스 I 또는 길이 변이체와 같은 연장된 형태의 HLA 클래스 II의 분자에 결합하는 능력을 가진 본 설명에 따른 웨티드에 관한 것이다.

[0040]

한 양태에서, 또한 본 설명에 따른 웨티드에 관한 것으로 상기 웨티드(각각)는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24에 따른 아미노산 서열을 포함하거나 서열로 구성되거나 필수적으로 구성된다.

[0041]

본 설명은 또한 본 설명에 따른 웨티드에 관한 것으로 상기 웨티드는 변형되고/거나 비웨티드 결합을 포함한다.

[0042]

본 설명은 또한 본 설명에 따른 웨티드에 관한 것으로, 상기 웨티드는 융합 단백질의 일부이며 특히 HLA-DR 항원 연관된 불변 사슬(Ii)의 N-말단 바람직하게는 그 80 N-말단 아미노산에 융합되거나 또는 예를 들어 수지상 세포에 특이적인 항체와 같은 항체에(또는 그 서열 안으로) 융합된다.

[0043]

본 설명은 또한 본 설명에 따른 웨티드를 인코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본 설명은 또한 DNA, cDNA, PNA, RNA 또는 이들의 조합인 본 설명에 따른 핵산에 관한 것이다.

[0044]

본 설명은 또한 본 설명에 따른 핵산을 발현할 수 있고/거나 발현하는 발현 벡터에 관한 것이다.

[0045]

본 설명은 또한 질병의 치료에서 그리고 의학에서 특히 암의 치료에서의 사용을 위한 본 설명에 따른 웨티드,

본 설명에 따른 핵산 또는 본 설명에 따른 발현 벡터에 관한 것이다.

- [0046] 본 설명은 또한 본 설명의 웨티드 또는 MHC와 본 설명에 따른 상기 웨티드의 복합체들을 특이적으로 결합시키는 항체들 그리고 그러한 항체를 만드는 방법에 관한 것이다.
- [0047] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 핵산을 또는 전에 설명한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0048] 본 설명은 또한 항원 제시 세포인 그리고 바람직하게는 수지상 세포인 본 설명에 따른 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0049] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 웨티드의 생산 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 설명에 따른 숙주 세포의 배양 및 상기 숙주 세포 또는 그 배양 배지로부터의 웨티드 분리를 포함한다.
- [0050] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 방법에 관한 것으로, 충분한 수량의 항원을 항원 제시 세포와 접촉시킴으로써 그 항원이 적합한 항원 제시 세포 또는 인공 항원 제시 세포의 표면에 발현된 클래스 I 또는 II MHC 분자 위에 로딩되거나 항원/클래스 I 또는 II MHC 복합체 단량체의 사량체화에 의해 그 항원이 클래스 I 또는 II MHC 사합체 위에 로딩된다.
- [0051] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 방법에 관한 것으로, 그 항원 제시 세포가 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24를 포함하며, 바람직하게는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24를 포함하는 상기 웨티드를 발현할 수 있거나 발현하는 발현 벡터 또는 그 변이체 아미노산 서열을 포함한다.
- [0052] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 방법에 의해 생산된 활성화 T 림프구에 관한 것으로, 이 때 T 세포가 본 설명에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리웨티드를 발현하는 세포를 선택적으로 인지한다.
- [0053] 본 설명은 또한 환자에서 암을 사멸 및/또는 세포를 억제하는 방법에 관한 것으로 암 세포가 본 설명에 따른 일체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리웨티드를 이상 발현하며, 상기 방법은 본 설명에 따라 생산된 효과적인 수의 T 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0054] 본 설명은 또한 약제로서 또는 약제의 제조에 있어 여기서 기술된 일체의 웨티드, 여기서 기술된 핵산, 여기서 기술된 발현 벡터, 여기서 기술된 세포, 여기서 기술된 활성화 T 림프구, 본 설명에 따른 T 세포 수용체 항체 또는 기타 웨티드 및/또는 웨티드-MHC 결합 분자의 사용에 관한 것이다. 한 양태에서, 그 약제는 암에 대해 활성이다.
- [0055] 바람직하게는 상기 약제가 세포 표면, 백신 또는 TCR, 가용성 TCR 또는 항체에 근거한 단백질이다.
- [0056] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 사용에 관한 것으로, 상기 암 세포는 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포암, 뇌암, 위암, 결장직장암, 간세포암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암, 식도암 그리고 바람직하게는 비소세포 폐암이다.
- [0057] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 웨티드에 근거한 바이오마커에 관한 것으로, 여기서는 암 바람직하게는 비소세포 폐암의 진단에 사용할 수 있는 "표적"으로 부른다. 이 마커는 웨티드(들) 자체의 과다제시 또는 상용하는 유전자(들)의 과발현일 수 있다. 이 포함되는 또한 치료, 바람직하게는 면역요법, 가장 바람직하게는 바이오마커에 의해 확인된 동일한 표적을 표적화하는 면역요법의 성공의 확률을 예측하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 가용성 TCR은 관심 대상의 MHC와 복합체인 웨티드의 존재 검출을 위해 종양의 일부를 염색하는데 사용할 수 있다. 선택적으로, 항체 또는 가용성 TCR은 면역 자극 도메인 또는 독소와 같은 추가의 작용기 기능을 보유한다.
- [0058] 본 설명은 또한 적어도 하나의 상기 표적을 인식하는 TCR의 확인, 바람직하게는 T 세포를 활성화하는 상기 TCR의 확인에 대한 이러한 신규 표적의 사용에 관한 것이다.
- [0059] 본 설명은 또한 암 치료의 환경에서 이러한 신규 표적들의 사용에 관한 것이다.

### **도면의 간단한 설명**

- [0060] 도 1은 건강한 조직과 암에서 MAG-003 웨티드 제시를 보여준다.

도 2 내지 4는 암과 건강한 조직에서 MAG-003 발현을 보여준다.

도 5 내지 7은 MAG-003 웨티드(서열 식별 번호 1) 또는 상동성이지만 관련 없는 웨티드 RABGAP1L-001(서열 식별 번호 91), AXIN1-001(서열 식별 번호 92), ANO5-001(서열 식별 번호 93), TPX2-001(서열 식별 번호 94),

SYNE3-001(서열 식별 번호 95), MIA3-001(서열 식별 번호 96), HERC4-001(서열 식별 번호 97), PSME2-001(서열 식별 번호 98), HEATR5A-001(서열 식별 번호 99) 또는 CNOT1-003(서열 식별 번호 100) 또는 대조 웨티드 NYESO1-001(서열 식별 번호 101)로 로딩된 표적 세포와의 공동 배양 후, TCR들인 R7P1D5, R20P1H7 및 R10P2G12(표 2)의 알파 및 베타 RNA로 전기천공된 CD8+ T 세포로부터 IFN γ 방출을 각각 보여준다. IFN γ 방출 데이터는 두 가지 다른 공여자(공여자 1은 오른쪽 X축, 공여자 2는 왼쪽 X축)로부터 유래된 CD8+ T 세포로 취득했다. RNA 전기천공된 CD8+ T 세포 단독으로 또는 로딩되지 않은 표적 세포와 공동 배양된 것이 대조의 역할을 했다.

도 8은 TCR인 R7P1D5, R20P1H7 및 R10P2G12(표 2)의 알파 및 베타 사슬 RNA로 전기천공된 CD8+ T 세포의 MHC/MAG-003 사합체 또는 MHC/NYESO1-001 사합체 염색을 각각 보여준다. MHC/NYESO1-001 복합체에 특이적으로 결합하는 1G4 TCR의 RNA로 전기천공된 CD8+ T 세포 그리고 모의 전기천공된 CD8+ T 세포가 대조의 역할을 했다.

도 9 내지 11은 MAG-003 웨티드(서열 식별 번호 1) 또는 서열 식별 번호 1의 1-9 위치에서의 다양한 MAG-003 알라닌 치환 변이체를 로딩한 표적 세포와 공동 배양 후, TCR의 R7P1D5, R20P1H7 및 R10P2G12(표 2)의 알파 및 베타 사슬 RNA로 전기천공된 CD8+ T 세포로부터의 IFN γ 방출을 각각 보여준다. RNA 전기천공된 CD8+ T 세포 단독 또는 대조 웨티드 NYESO1-001로 로딩된 표적 세포 또는 로딩되지 않은 표적 세포와의 공동 배양된 것이 대조의 역할을 했다. IFN γ 방출 데이터는 두 가지 다른 공여자(공여자 1은 오른쪽 X축, 공여자 2는 왼쪽 X축)로부터 유래된 CD8+ T 세포로 취득했다.

도 12는 A-375 흑색종 세포주, T98G 아교모세포종 세포주 및 SK-BR-3 유방암 세포주와 공동 배양 후, TCR인 (A) R7P1D5, (B) R20P1H7 및 (C) R10P2G12의 알파 및 베타 사슬 RNA로 각각 전기천공된 CD8+ T 세포로부터의 IFN γ 방출을 보여준다. RNA 전기천공된 CD8+ T 세포 단독이 대조 역할을 했다.

도 13에서 TCR인 R7P1D5, R10P2G12, R20P1H7, 모의 또는 대조 TCR 1G4(서열 식별 번호 X)를 코딩하는 RNA로 형질주입된 T 세포를 여러 일차적인 인간의 건강한 조직 세포들(약자는 표 13 참조), 표적 음성 종양 세포주 MCF-7 및 MAGEA4 양성 및 NY-ESO1 양성 세포주 A-375 그리고 NCI-H1755와 공동 배양했다. T 세포에서 TCR인 R7P1D5, R10P2G12, R20P1H7 및 1G4 발현은 RNA 백터를 사용한 전기천공으로 달성했다. 인간의 건강한 조직 세포 배양은 TCR인 R7P1D5, R10P2G12 또는 R20P1H7에 대해 유의한 TCR 매개 인식 및 T 세포 활성화를 유도하지 않았다. E:T 비율 1:1, 각 20,000 세포 그리고 20시간 후 복제물로부터 IFN-γ 방출 평균이 ELISA의 측정치로 나와 있다. 오류 막대는 표준 편차를 나타낸다. TCR 형질주입된 T 세포로부터만의 IFN-γ 방출 그리고 표적 세포와 관심 대상의 TCR을 발현하지 않는 T 세포의 공동 배양에 기인한 IFN-γ 방출을 빼서 결과를 정규화했다.

도 14는 6개의 다른 렌티바이러스 구축물(R71-R78)로 형질도입 후 R7P1D5 TCR 도입 유전자 발현에 대해 스크리닝한 4명의 공여자의 누적 데이터를 나타낸다. CD3+/CD8+ T 세포는 형질도입 후 96시간 시점에 MHC/MAG-003 사합체 결합의 비율에 대해 유세포 분석법으로 분석했다. MHC/MAG-003 사합체로 염색한 비형질도입 T 세포(NT) 그리고 MHC/NYESO1-001 사합체로 염색한 1G4 (NY-ESO1) TCR 형질도입 T 세포를 각각 음성 및 양성 대조로 사용했다. 세포는 라이브 CD3+CD8+ 모집단에서 게이팅을 실행했다.

도 15의 A는 종양 세포주 A375를 발현하는 MAGEA4와 MAGEA4 음성 종양 세포주 MCF-7의 공동 배양 시 IFN γ 생산으로 측정된 R7P1D5 TCR 형질도입된 T 세포의 작용기 반응을 나타낸다. R7P1D5 TCR을 인코딩하는 R73 렌티바이러스의 농축 상청액으로 형질도입된 T 세포를 비형질도입 세포(NT)와 비교했으며, 둘 모두 4명의 건강한 공여자의 PBMC로부터 유래했다. 결과는 3회 반복의 평균 ± SEM으로 제시된다. B는 감소하는 농도의 MAG-003 웨티드로 펠스된 T2 표적 세포와의 공동 배양 시, 2명의 건강한 공여자(공여자 6 및 7)의 PBMC로부터 R7P1D5 TCR 형질도입된 (R73 렌티바이러스) T 세포의 IFN γ 반응을 나타낸다. 결과는 혈질도입 후 96시간 시점에 측정된 3회 반복 측정치의 평균 ± SEM으로 제시된다.

도 16의 A 및 B는 4시간 Cr51 방출 분석에서 여러 E:T 비율에 따라 종양 세포주 A375를 발현하는 MAGEA4에 대해 측정된 R7P1D5 TCR(R73 렌티바이러스) 형질도입 및 비형질도입 T 세포(NT)의 세포독성 반응을 나타낸다. 결과는 3-4회 반복의 평균 ± SEM으로 제시된다. C는 40:1의 E:T 비율에서 MAGEA4 발현(A375) 및 MAGEA4 음성(MCF-7) 종양 표적의 항원 특이적 살해를 나타낸는 5명 공여자로부터 생성된 7개 R7P1D5 TCR(R73 렌티바이러스) 형질도입된 T 세포 생성물로부터 얻은 조합된 데이터를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 본 설명은 알파 사슬 및/또는 베타 사슬("알파/베타 TCR")을 포함하는 T 세포 수용체(TCR)에 관한 것이다. 또한 MHC 분자에 의해 제시되는 경우 TCR 및 항체에 결합할 수 있는 MAG-003 웨티드가 제공된다. 본 설명은 또한 본

설명의 TCR 및 웹티드를 발현하는 핵산, 벡터 및 숙주 세포; 그리고 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0062] 그러므로 본 발명의 목적은 제1 양태에서 서열 식별 번호 44, 52, 60, 68, 76 및 84로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 바람직하게는 100% 서열 동일성을 갖는 적어도 하나의 상보 결정 영역(CDR) 3을 포함하는 항원 인식 구축물에 의해 해결된다.

[0063] 본 발명에 따른 항원 인식 구축물은 바람직하게는 항체 또는 그 유도체나 단편, 또는 T 세포 수용체(TCR) 또는 그 유도체나 단편으로부터 선택된다. 본 발명의 항체나 TCR의 유도체나 단편은 바람직하게 모 분자의 항원 결합/인식 능력, 특히 상기 설명된 특이성 및/또는 선택성을 보유해야 한다. 그러한 결합 기능성은 여기서 정의된 CDR3 영역의 존재에 의해 유지될 수 있다.

[0064] 본 발명의 한 양태에서, 발명의 TCR은 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 의존 방식으로 TAA 항원을 인식할 수 있다. 여기서 사용된 "MHC 클래스 I 의존 방식"은 MHC 클래스 I 분자의 환경 내에서 TCR이 TAA 항원에 결합 시 면역 반응을 유발한다는 의미이다. MHC 클래스 I 분자는 당업계에서 알려진 일체의 MHC 클래스 I 분자일 수 있으며, 예를 들어 HLA-A 분자이다. 본 발명의 바람직한 한 구현에서, MHC 클래스 I 분자는 HLA-A\*02 분자이다.

[0065] 본 발명은 단일 사슬 항원 인식 구축물과 이중 사슬 인식 구축물 모두를 제공한다.

[0066] 한 구현에서, TCR 알파 가변 도메인은 표 2에 나와 있는 TCR 알파 도메인에 대해 적어도 하나의 돌연변이를 가지며; 및/또는 TCR 베타 가변 도메인은 표 2에 나와 있는 TCR 알파 도메인에 대해 적어도 하나의 돌연변이를 갖는다. 한 구현에서, TCR 알파 가변 도메인 및/또는 TCR 베타 가변 도메인에서 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 TCR은 TAA 웹티드-HLA 분자 복합체에 대해 결합 친화도 및/또는 결합 반감기를 가지며, 이 반감기는 비돌연변이 TCR 알파 도메인 및/또는 비돌연변이 TCR 베타 가변 도메인을 포함하는 TCR 반감기의 적어도 2배이다.

[0067] 본 설명의 TCR 알파 사슬은 TCR 알파 막횡단 도메인 및/또는 TCR 알파 세포내 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 본 설명의 TCR 베타 사슬은 TCR 베타 막횡단 도메인 및/또는 TCR 베타 세포내 도메인을 추가로 포함할 수 있다.

[0068] 본 발명은 특히 항원 인식 구축물 또는 그 단편이나 유도체로서 TCR을 제공한다. TCR은 바람직하게는 인간의 TCR이며, 이는 인간 TCR 유전자로부터 생성되므로 인간 TCR 서열을 포함하는 것으로 이해된다. 더 나아가, 본 발명의 TCR은 인간 기원의 TCR이며 표 1에 언급된 본 발명의 TAA 항원을 특이적으로 인식하는 특징을 가진다.

[0069] 본 발명의 또 다른 구현은 면역 반응을 유도하는 상기 설명의 항원 인식 구축물을 추가적으로 또는 대안적으로 제공하는데, 바람직하게는 그 면역 반응이 인터페론(IFN)  $\gamma$  수준의 증가의 특징을 가진다.

[0070] 본 발명의 TCR은 단일 사슬  $\alpha$  또는  $\beta$ , 또는  $\gamma$  및  $\delta$ , 분자로서 또는  $\alpha$  및  $\beta$  사슬 또는  $\gamma$  및  $\delta$  사슬 둘 다로 구성되는 이중 사슬 구축물로 제공될 수 있다.

[0071] 가장 바람직하게는, 공개 내용이 여기서 공개된 TCR 사슬(표 2 참조)의 CDR1에서 CDR3 영역의 하나, 둘 또는 모두를 포함하는 항원 인식 구축물을 지칭하는 일부 추가적인 구현에서, 그러한 항원 인식 구축물이 바람직할 수 있으며, 이는 셋 또는 둘 이하 그리고 바람직하게는 단 하나의 변형된 아미노산 잔기를 갖는 본 발명의 해당 CDR 서열을 포함한다. 변형된 아미노산 잔기는 아미노산 삽입, 결손 또는 치환으로부터 선택될 수 있다. 가장 바람직한 것은 셋, 둘 바람직하게는 단 하나의 변형된 아미노산 잔기가 해당 CDR 서열의 첫 번째 또는 마지막 아미노산 잔기이다. 변형이 치환인 경우, 일부 구현에서는 그러한 치환이 바람직하게 보존적 아미노산 치환이다.

[0072] 본 발명의 TCR은 일체의 포유동물(예: 인간, 쥐, 원숭이, 토끼, 당나귀, 생쥐)과 같은 일체의 적절한 종으로부터 유래된 불변 영역을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 한 구현에서, 발명의 TCR은 인간 불변 영역을 추가로 포함한다. 일부 바람직한 구현에서, 본 발명의 TCR의 불변 영역은 TCR 발현과 안정성을 증가시킬 수 있는, 예를 들어, 이질성 서열 바람직하게는 마우스 서열의 도입에 의해 약간 변경될 수 있다.

[0073] 본 발명의 한 구현에서, 키메라 TCR이 제공되며, 여기서 TCR 사슬은 복수의 종으로부터의 서열을 포함한다. 바람직하게, 본 발명의 TCR은  $\alpha$  사슬의 인간 가변 영역 그리고 예를 들어, 쥐와 TCR  $\alpha$  사슬의 쥐와 불변 영역을 포함하는  $\alpha$  사슬을 포함할 수 있다.

[0074] 한 구현에서, 본 발명의 TCR은 상기 구현에 따른 인간 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함하는 인간 TCR이다.

[0075] 일부 구현에서 항원 인식 구축물은 쥐과화되거나 인간화된다. 이러한 용어들은 외부 종의 아미노산이 본 발명의 구축물로 도입될 때 사용된다.

[0076]

본 발명의 TCR은 단일 사슬 scTCR( scTCR)로서 제공될 수 있다. 본 발명에 따른 scTCR은 하나의 폴리펩티드 사슬에서, 바람직하게는 펩티드 링커를 통해 연결되는 전체 또는 부분 알파 사슬 서열 그리고 전체 또는 부분 베타 사슬 서열을 포함해야 한다. scTCR은 제1 TCR 사슬(예: 알파 사슬)의 가변 영역의 폴리펩티드 그리고 전체(전장) 제2 TCR 사슬(예: 베타 사슬)의 폴리펩티드 또는 이의 반대를 포함할 수 있다. 더욱이, scTCR은 두 개 이상의 폴리펩티드를 함께 연결하는 하나 이상의 링커를 선택적으로 포함할 수 있다. 링커는 예를 들어 펩티드일 수 있으며, 이는 여기서 기술된 바와 같이 두 개의 단일 사슬을 함께 연결한다. 또한 본 발명의 그러한 scTCR도 제공되며, 이것은 IL-2, IL-7 또는 IL-15와 같은 인간 사이토킨에 융합된다.

[0077]

본 발명에 따른 항원 인식 구축물은 적어도 2개의 scTCR 분자를 포함하는 다합체 복합체의 형태로서 제공될 수 있으며, 상기 scTCR 분자는 적어도 1개의 비오틴 모이어티 또는 다른 교차하는 분자/링커에 각각 융합되며 또한 상기 scTCR은 비오틴-스트렙타비딘 상호작용에 의해 상호연결되어 상기 다합체 복합체의 형성을 허용한다. 다합체 TCR 생성에 대해 당업계에서 알려진 유사한 접근방식 또한 가능하며 본 공개 내용에 포함된다. 또한 2개가 넘는 본 발명의 scTCR을 포함하는 더 높은 차수의 다합체 복합체가 제공된다.

[0078]

본 발명의 목적 상, TCR이란 적어도 하나의 TCR 알파 또는 감마 및/또는 TCR 베타 또는 델타 가변 도메인을 갖는 모이어티이다. 일반적으로 이에는 TCR 알파 가변 도메인과 TCR 베타 가변 도메인 모두, 대안적으로는 TCR 감마 가변 도메인과 TCR 델타 가변 도메인 모두 포함된다. 이것은  $\alpha\beta/\gamma\delta$  이질이합체일 수 있으며 또는 단일 사슬 형태일 수 있다. 입양 요법에서의 사용을 위해,  $\alpha\beta$  또는  $\gamma\delta$  이질이합체 TCR은 예를 들어 세포질 및 막 횡단 도메인을 모두 갖는 전장 사슬로서 형질주입될 수 있다. 원한다면, 해당 불변 도메인의 잔기 사이에 도입된 이황화 결합이 존재할 수 있다.

[0079]

바람직한 한 구현에서, 항원 인식 구축물은 인간 TCR이거나 이의 단편 또는 유도체이다. 인간 TCR 또는 이의 단편 또는 유도체는 TCR이며, 이것은 상응하는 인간 TCR 서열의 50% 이상을 구성한다. 바람직하게, TCR 서열의 적은 부분만 인공적 기원이거나 다른 종으로부터 유래한다. 하지만 키메라 TCR, 예를 들어 불변 도메인에서 쥐과 서열을 가진 인간 기원으로부터 유래한 것이 유리하다고 알려져 있다. 그러므로 특히 바람직한 것은 본 발명에 의거한 TCR이며, 이것은 그 불변 도메인의 세포외 부분에서 쥐과 서열을 포함한다.

[0080]

그리하여 발명의 항원 인식 구축물은 인간 백혈구 항원(HLA) 의존 방식으로, 바람직하게는 HLA-A02 의존 방식으로 그 항원을 인식할 수 있는 것이 또한 바람직하다. 본 발명의 환경 상 "HLA 의존 방식"이라는 용어는, 항원 인식 구축물이 항원성 펩티드가 상기 HLA에 의해 제시되는 경우 항원에만 결합한다는 의미이다.

[0081]

한 구현에서 본 발명에 의거한 항원 인식 구축물은 바람직하게는 면역 반응을 유도하며, 바람직하게는 그 면역 반응이 인터페론(IFN)  $\gamma$  수준의 증가의 특징을 가진다.

[0082]

또한 본 발명에 의해 제공되는 것은 여기서 기술된 어떠한 TCR(또는 그 기능적 변이체)의 부분, 예를 들어 실시 예 항목과 표 2에서 제공된 어느 하나의 TCR의 기능적 부분을 포함하는 폴리펩티드이다. 여기서 사용된 용어 "폴리펩티드"에는 올리고펩티드가 포함되며 하나 이상의 펩티드 결합에 의해 연결된 단일 사슬의 아미노산을 지칭한다. 발명의 폴리펩티드에 있어, 기능적 부분은 그것이 한 부분인 TCR(또는 그 기능적 변이체)의 연속적 아미노산을 포함하는 일체의 부분일 수 있으며, 단 그 기능적 부분은 바람직하게는 여기의 표 1에 공개된 바와 같이 TAA 항체에 특이적으로 결합해야 한다. TCR(또는 그 기능적 변이체)을 언급할 때 사용되는 "기능적 부분"이라는 용어는 본 발명의 TCR(또는 그 기능적 변이체)의 어떠한 일부나 단편을 지칭하며, 그 일부나 단편은 그 자체가 일부인(모 TCR 또는 그 모 기능적 변이체) TCR(또는 그 기능적 변이체)의 생물학적 활성도를 보유한다. 기능적 부분은 예를 들어, 모 TCR(또는 그 기능적 변이체)와 유사한 정도로, 같은 정도로 또는 더 높은 정도로 TAA 항원에(HLA 의존 방식으로) 특이적으로 결합하는 능력 또는 암의 검출, 치료 또는 예방하는 능력을 보유하는 TCR(또는 그 기능적 변이체)의 일부들을 망라한다. 모 TCR(또는 그 기능적 변이체)에 기준하여, 기능적 부분은 모 TCR 가변 서열(또는 그 기능적 변이체)의 예를 들어, 약 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% 이상을 포함할 수 있다.

[0083]

기능적 부분은 그 부분의 아미노 또는 카르복시 말단 또는 두 말단 모두에서 추가의 아미노산을 포함할 수 있으며, 그 추가의 아미노산은 모 TCR이나 그 기능적 변이체의 아미노산 서열에서 발견되지 않는다. 바람직하게는 추가의 아미노산이 기능적 부분의 생물학적 기능, 예를 들어 TAA 항원에 특이적으로 결합; 및/또는 암의 검출, 암의 치료나 예방 등의 능력 보유를 방해하지 않는다. 더 바람직하게는 추가의 아미노산이 모 TCR이나 그 기능적 변이체의 생물학적 활성도와 비교하여 생물학적 활성도를 강화시킨다.

[0084]

일부 경우에서, 본 발명의 구축물은 서열 식별 번호 39 내지 86(CDR 서열, 불변 및 가변 영역 그리고 전장

서열) 또는 그 기능적 단편에 따른 서열을 포함하는 하나 또는 둘의 폴리펩티드 사슬을 포함할 수 있으며, 또한 예를 들어, 면역글로불린이나 그 부분을 인코딩하는 아미노산과 같은 다른 아미노산 서열을 포함하며, 그 발명의 단백질은 융합 단백질일 수 있다. 이러한 점에서, 본 발명은 또한 적어도 하나의 다른 폴리펩티드와 함께 여기서 기술된 적어도 하나의 발명의 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 다른 폴리펩티드는 융합 단백질의 별개의 폴리펩티드로 존재할 수 있거나, 폴리펩티드로 존재할 수 있으며, 이는 여기서 기술된 발명의 폴리펩티드의 하나와 함께 틀로(일렬로) 발현된다. 다른 폴리펩티드에는 일체의 웨티드나 단백질성 분자 또는 그 부분이 포함될 수 있으며, 면역글로불린, CD3, CD4, CD8, MHC 분자, CD1 분자(예: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, 등)가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0085] 융합 단백질은 하나 이상의 발명의 폴리펩티드 사본 및/또는 하나 이상의 기타 폴리펩티드 사본을 포함할 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 발명의 폴리펩티드 및/또는 기타 폴리펩티드의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 이상의 사본을 포함할 수 있다. 융합 단백질을 만드는 적합한 방법들은 당업계에서 알려져 있으며, 예를 들면 재조합 방법이 포함된다. 본 발명의 일부 구현에서, 본 발명의 TCR(및 그 기능적 부분 및 기능적 변이체), 폴리펩티드 및 단백질은  $\alpha$  사슬과  $\beta$  사슬을 연계시키고  $\gamma$  사슬과  $\delta$  사슬을 연계시키는 링커를 포함하는 단일 단백질로서 발현될 수 있다. 이러한 점에서, TCR(및 그 기능적 변이체 및 기능적 부분) 폴리펩티드 그리고 TCR의 가변 영역의 아미노산 서열을 포함하는 본 발명의 단백질은 또한 링커 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 링커 웨티드는 숙주 세포 내 재조합 TCR(그 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함), 폴리펩티드 및/또는 단백질의 발현을 유리하게 원활하게 할 수 있다. 링커 웨티드는 임의의 적절한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 단일 사슬 TCR 구축물을 위한 링커 서열은 당업계에 잘 알려져 있다. 그러한 단일 사슬 구축물은 1개 또는 2개의 불변 도메인 서열을 추가로 포함할 수 있다. 숙주 세포에 의한 링커 웨티드를 포함하는 구축물의 발현 시, 링커 웨티드는 분할되어 분리된  $\alpha$  및  $\beta$  사슬 그리고 분리된  $\gamma$  및  $\delta$  사슬을 초래할 수도 있다.

[0086] 위에서 이미 언급된 바와 같이, 본 발명의 TCR의 결합 기능성은 항체의 틀 안에서 제공될 수 있다. 예를 들면, 추가의 3, 2 또는 1개의 N 및/또는 C 말단 틀 잔기를 포함할 수 있는 본 발명의 TCR의 CDR 서열은 항체 가변 중사슬/경사슬 서열 안으로 직접 이식될 수 있다. 다양한 문법적 형태로 사용되는 "항체"란 용어는 여기에서 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역 글로불린 활성적 부분 즉, 항체 결합 부위나 파라토프를 함유하는 분자를 지칭한다. 그러한 분자는 면역글로불린 분자의 "항원 결합 단편"으로도 불린다. 본 발명은 또한 항체 또는 그 항체 결합 부분을 제공하며, 이는 여기서 기술된 항원에 특이적으로 결합한다. 항체는 당업계에서 알려진 어떠한 유형의 면역글로불린이라도 될 수 있다. 예를 들어, 항체는 모든 아이소형의 것일 수 있으며, 예를 들면 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM 등이다. 항체는 단클론 또는 다클론일 수 있다. 항체는 자연적으로 발생하는 항체일 수 있으며, 예를 들어 생쥐, 토끼, 염소, 말, 닭, 햄스터, 인간 등 포유동물로부터 분리되며/분리되거나 정제된 항체이다. 대체적으로, 항체는 유전자 조작된 항체, 예를 들어 인간화된 항체나 키메라 항체일 수 있다. 항체는 단량체 또는 중합체 형태의 것일 수 있다.

[0087] 용어 "항체"에는 세포 내 발현 항체(intrabodies), 키메라 항체, 온전한 인간 항체, 인간화된 항체(예: "CDR-융합"에 의해 생성된), 항체 단편 및 이질접합 항체(예: 양특이성 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 등)와 같은 유전자 조작된 또는 달리 변형된 형태의 면역글로불린이 포함되지만 이로써 제한되지는 않는다. 용어 "항체"에는 시스-디아바디 및 미니바디가 포함된다. 그리하여 "항체" 또는 "항체같은 구축물"에 대해 여기서 제공되는 모든 각각의 구현은 달리 명백히 표기되지 않는 한, 양특이성 항체, 디아바디, scFv 단편, 키메라 항체 수용체(CAR) 구축물, 디아바디 및/또는 미니바디의 구현으로도 생각해 본다. 용어 "항체"에는 면역글로불린 계열의 폴리펩티드 또는 비공유적으로, 가역적으로 및 특이적 방식으로 상응하는 항원, 바람직하게는 여기서 공개된 본 발명의 TAA에 결합할 수 있는 면역글로불린의 단편을 포함하는 폴리펩티드가 포함된다. 예시적 항체의 구조 단위는 사합체를 포함한다. 일부 구현에서, 전장 항체는 각 쌍이 하나의 "경사슬" 및 하나의 "중사슬"(이황화 결합을 통해 연결됨)를 갖는 2개의 동일한 쌍으로 구성될 수 있다. 항체 구조 및 동형은 당업자에게 잘 알려져 있다(예: Janeway's Immunobiology, 제9판, 2016).

[0088] 포유동물의 인식된 면역글로불린 유전자에는 카파, 람다, 알파, 감마, 엘타, 앱실론 및 뮤 불변 영역 유전자들 그리고 무수한 면역글로불린 가변 영역 유전자들이 포함된다(면역글로불린 유전자에 관한 상세한 정보는 다음을 참조한다: Im-MunoGeneTics information system®, Lefranc M-P et al, Nucleic Acids Res. 2015 Jan, 43(Database issue):D413-22; 및 <http://www.imgt.org/>). 전장 사슬에서, 경사슬은 카파나 람다로 분류된다. 전장 사슬에서, 중사슬은 감마, 뮤, 알파, 엘타 또는 앱실론으로 분류되며, 이것은 다시 면역글로불린계인 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE를 각각 정의한다. 각 사슬의 N 말단은 항원 인식에 일차적으로 책임이 있는 약 100 내지 110개 이상의 아미노산으로 이루어진 가변 영역을 정의한다. 가변 경사슬(VL) 및 가변 중사슬(VH)은 경사슬 및

중사슬의 이러한 영역을 각각 지칭한다. 본 발명에서 사용되는 "항체"는 항체 및 그 단편의 모든 변이를 망라 한다. 그리하여 본 개념의 범위에는 전장 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 단일 사슬 항체(scFv), Fab, Fab', 그리고 동일한, 본질적으로 동일한 또는 유사한 결합 특이성을 갖는 이러한 단편들(예: F(ab')2)의 다합체 버전들이 속한다. 일부 구현에서 항체는 본 발명의 웨პ티드 TAA에 특이적으로 결합한다. 본 발명에 따른 바람직한 항원 인식 구축물에는 항체 중사슬, 바람직하게는 그 가변 도메인 또는 그 항체 결합 단편 및/또는 항체 경사슬, 바람직하게는 그 가변 도메인 또는 그 항원 결합 단편이 포함된다. 유사하게 이항화물 안정화 가변 영역 단편(dsFv)은 재조합 DNA 기술에 의해 만들 수 있지만, 본 발명의 항체 단편은 이러한 항체 단편의 예시적 유형으로 제한되지 않는다. 또한 항체나 그 항체 결합 부분은 예를 들어 방사능동위원소, 형광단(예: 플로오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 홍조(PE)), 효소(예: 알칼리성 인산분해효소, 겨자무 과산화효소) 및 원소 입자(예: 금 입자)를 포함하도록 변형시킬 수 있다. 일부 경우에서, TCR CDR3 서열은 약간 변경될 수 있지만 바람직하게는 3개 아미노산 잔기 이하로, 바람직하게는 2개만 그리고 가장 바람직하게는 서열 식별 번호 44, 52, 60, 68, 76 및 84에서 제공된 CDR3 서열에 비해 단 하나의 아미노산 위치에서 변형될 수 있다. 바람직하게는 항체는 표 2에 있는 본 발명의 TCR에 대해 표시된 바와 같이 CDR3, 바람직하게는 CDR1에서 CDR3 영역의 모든 조합을 포함하며, 각 사례에서 독립적으로, 이러한 서열에 비해 선택적으로 3개 또는 2개 이하 바람직하게는 1개의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결손을 갖는다.

[0089] 항체를 만드는 적절한 방법은 당업계에서 알려져 있다. 예를 들어, 표준 히브리도마 방법은 예를 들어 다음에 기술되어 있다: Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 5, 51 1-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), 그리고 C.A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 제8판, Garland Publishing, New York, NY (2011). 다르게는, EBV-히브리도마 방법(Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984) 및 Roder et al., Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986))과 같은 다른 방법들 그리고 박테리오파지 벡터 시스템(예: Huse et al., Science, 246, 1275-81 (1989))이 당업계에서 알려져 있다. 또한 비인간 동물에서 항체를 생산하는 방법은 예를 들어, 미국 특허 번호 5,545,806, 5,569,825 및 5,714,352, 그리고 미국 특허 출원 번호 2002/0197266에 기술되어 있다.

[0090] 본 발명의 일부 구현은 또한 TCR 또는 기능적 단편 및 폴리웨პ티드에 관한 것으로 이는 가용성 TCR이다. 여기서 사용된 용어 "가용성 T 세포 수용체"는 자연 TCR의 이질이합체 절단된 변이체를 지칭하며, 이것은 TCR α 사슬 및 β 사슬의 세포의 부분들, 예를 들면 이항화 결합에 의해 연계되지만 자연 단백질의 막횡단 및 세포질(cytosolic) 도메인이 결여된 것들을 포함한다. 용어 "가용성 T 세포 수용체 α 사슬 서열 및 가용성 T 세포 수용체 β 사슬 서열"은 막횡단 및 시토솔 도메인이 결여된 TCR α 사슬 및 β 사슬 서열을 지칭한다. 가용성 TCR α 사슬 및 β 사슬의 서열(아미노산 또는 핵산)은 자연 TCR 내 상응하는 서열과 동일할 수 있거나 상응하는 자연 TCR에 비해 변이체 가용성 TCR α 사슬 및 β 사슬을 포함할 수 있다. 여기서 사용된 용어 "가용성 T 세포 수용체"는 변이체 또는 비변이체 가용성 TCR α 사슬 및 β 사슬 서열을 망라한다. 그 변이는 가용성 TCR α 사슬 및 β 사슬 서열의 가변 또는 불변 영역에 있을 수 있으며, 아미노산 결손, 삽입, 치환 돌연변이 그리고 핵산 서열의 변경(이것은 아미노산 서열을 변경시키지 않음)을 포함할 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. 어떠한 경우에도 본 발명의 가용성 TCR은 모 분자의 결합 기능성을 보유한다.

#### 정의

[0091] 별도로 설명되지 않은 이상 여기에서 사용되는 모든 용어는 아래와 같이 정의된다.

[0092] 용어 "T 세포 수용체"(약자로 TCR)는 알파 폴리웨პ티드 사슬(알파 사슬) 및 베타 폴리웨პ티드 사슬(베타 사슬)을 포함하는 이질이합체 분자를 지칭하며, 여기서 이질이합체 수용체는 HLA 분자에 의해 제시된 웨პ티드 항원에 결합하는 능력이 있다.

[0093] "T 세포 반응"이란 용어는 특이적 증식과 시험관 내 또는 생체 내에서 유도되는 작용기 기능의 활성화를 의미한다. MHC 클래스 I 제한 세포 특성 T 세포의 경우, 작용기 기능이 웨პ티드 펠스, 웨პ티드 전조 펠스 또는 자연적 웨პ티드 제시 표적 세포들의 용해, 시토카인의 분비, 바람직하게는 웨პ티드에서 유도되는 인터페론 감마, TNF 알파, 또는 IL-2, 작용기 분자의 분비, 바람직하게는 웨პ티드에서 유도되는 그랜자임 또는 퍼로린 또는 탈과립일 수 있다.

[0094] "웨პ티드"란 용어는 여기서 이웃 아미노산의 알파 아미노와 카보닐기 사이에 웨პ티드 결합으로 보통 서로 연결되는 일련의 아미노산 잔기를 지정하기 위해 사용한다. 웨პ티드는 바람직하게는 길이가 아미노산 9개이며 짧게는 아미노산 8개일 수 있고 길게는 10, 11 또는 12개 이상일 수도 있으며, MHC 클래스 II 웨პ티드(본 설명의 웨პ티드의 더 긴 변이체)의 경우 그 길이가 길게는 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산일 수 있다.

- [0096] 더욱이 "펩티드"라는 용어는 알파 아미노기와 이웃 아미노산의 카보닐기 사이의 펩티드 결합으로 보통 서로 연결되는 아미노산 잔기의 서열에 의한 염을 포함한다. 바람직하게는 그 염은 예를 들어 염화물 또는 아세트산(삼불화아세트산) 염과 같은 약학적으로 허용가능한 펩티드의 염이다. 본 발명에 따른 펩티드의 염은 펩티드가 생체 내에서 염이 아니므로 생체 내 상태의 펩티드와는 실질적으로 다르다는 점을 유의해야 한다.
- [0097] "펩티드"라는 용어는 "올리고펩티드"도 포함한다. 여기에서 "올리고펩티드"라는 용어는 인접 아미노산의 알파 아미노기 및 카보닐기 사이에서 일반적으로 펩티드 결합으로 연결되는, 아미노산 잔기를 지정하는 데 사용된다. 본 설명에서 올리고펩티드의 길이는 올바른 에피톱이 유지되는 이상 중요하지 않다. 올리고펩티드는 일반적으로 약 30개 아미노산 잔기보다 길이가 짧고, 15개 아미노산보다 길다.
- [0098] "폴리펩티드"라는 용어는 인접 아미노산의 알파 아미노기 및 카보닐기 사이에서 일반적으로 펩티드 결합으로 연결되는, 일련의 아미노산 잔기를 지정하는 데 사용된다. 본 설명에서 폴리펩티드의 길이는 정확한 에피톱들이 유지되는 이상 중요하지 않다. 펩티드 또는 올리고 펩티드와 다르게, 폴리펩티드는 약 30개 아미노산 잔기 이상의 분자를 가지고 있는 것을 지칭한다.
- [0099] 이런 분자의 펩티드, 올리고펩티드, 단백질, 또는 폴리뉴클레오티드 코딩은 면역 반응을 유도할 수 있으면 "면역원성"(따라서 본 발명에서의 "면역원")이다. 본 설명의 경우, 면역원성은 T 세포 반응을 유도하는 능력으로 특정하게 정의된다. 그러므로, "면역원"은 면역 반응을 유도할 수 있는 분자이고, 본 설명의 경우, T 세포 반응을 유도할 수 있는 분자이다. 다른 양태에서, 면역원은 펩티드, 펩티드와 MHC의 복합체, 올리고펩티드 및/또는 특정 항체나 항체에 대한 TCR을 높이는데 사용되는 단백질일 수 있다.
- [0100] 클래스 I T 세포 "에피톱"은 적당한 친화력을 가진 MHC/펩티드 혼합물에 결합하는 T 세포 수용체에 일치하는 T 세포에 의해 인식되는 삼항 혼합물(MHC 클래스 I 알파 사슬, 베타-2-미세글로불린 및 펩티드)을 생성하는 클래스 I 또는 II MHC 수용체에 결합하는 짧은 펩티드를 필요로 한다. MHC 클래스 I 분자에 결합하는 펩티드는 일반적으로 길이가 8 내지 14개 아미노산이며, 가장 일반적으로 길이가 9개 아미노산이다.
- [0101] 특정 펩티드, 올리고펩티드 또는 폴리펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열 코딩은 자연적으로 발생하거나 합성 구축될 수도 있다. 일반적으로, 본 설명의 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질을 인코딩하는 DNA 절편은 cDNA 단편들과 짧은 올리고뉴클레오티드 링커, 또는 일련의 올리고뉴클레오티드에서 미생물이나 바이러스 오페론에서 유도된 조절 요소를 구성하는 재조합 전사 단위에서 발현될 수 있는 합성 유전자를 제공하기 위해서 조립된다.
- [0102] 여기서 사용되는 용어 "펩티드를 코딩(또는 인코딩)하는 뉴클레오티드"는 예를 들어, 수지상 세포 또는 TCR 제조에 유용한 다른 세포계에 의해 서열이 발현되는 생물학적 체계와 호환가능한 인공(사람이 만든) 시작 및 정지 코돈을 포함하는 펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열 코딩을 지칭한다.
- [0103] 여기서 사용되는 "TCR을 코딩(또는 인코딩)하는 뉴클레오티드"란 용어는 서열을 발현시키는 생물학적 체계, 예를 들어, TCR의 생산에 유용한 T 세포 또는 다른 세포 체계와 호환가능한 인공(사람이 만든) 시작 및 정지 코돈을 포함하는 펩티드에 대한 뉴클레오티드 서열 코딩을 지칭한다.
- [0104] 여기서 사용되는 핵산 서열에 대한 지칭에는 한 가닥 및 두 가닥 핵산 모두가 포함된다. 그러므로, 예를 들어 DNA의 경우 특정 서열이란 환경에서 대안적으로 나타내지 않는 한, 이러한 서열의 한 가닥 DNA, 보완이 있는 이러한 서열의 중복(두 가닥 DNA) 및 이러한 서열의 보완을 지칭한다.
- [0105] 용어 "코딩 영역"은 자연적인 계놈 환경에서 유전자의 발현 생성물에 대해 자연스럽게 또는 정상적으로 코딩하는 유전자의 부분을 지칭한다(즉, 유전자 본래의 발현 생성물에 대한 생체 내 영역 코딩).
- [0106] 코딩 영역은 비변이(정상적)이거나 변이 또는 개조된 유전자로부터 유래할 수 있거나, 또는 심지어 DNA 서열, 또는 실험실에서 DNA 합성의 당업자에게 잘 알려진 방법을 사용해서 실험실에서 전적으로 합성된 유전자로부터 유래할 수 있다.
- [0107] 용어 "발현 생성물"은 유전자의 자연 번역 제품인 폴리펩티드 또는 단백질 또는 유전적 코딩 퇴화로 인해 결과된 어떤 핵산 서열 코딩과 상응하며 그러므로 같은 아미노산을 코딩한다.
- [0108] 코딩 서열을 말할 때, 용어 "단편"은 발현 제품이 완전한 코딩 영역의 발현 생성물과 같은 생물학적 기능이나 활동을 유지하는 완전한 코딩 영역보다 적은 부분의 DNA를 지칭한다.
- [0109] 용어 "DNA 분절"은 최소한 한번 이상의 상당히 순수한 형태로 분리된 DNA에서 유도된 단편의 형태, 또는 큰 DNA 구조의 구성 요소로서 DNA 중합체를 지칭한다. 여기서 순수한 형태는 즉, 내인성 오염 물질이 없고 분절 및 표

준 생화학 방법, 예를 들면, 복제 벡터에 따른 그 구성 요소 뉴클레오티드 서열의 식별, 조작 및 복구를 가능하게 하는 양 또는 농도를 지칭한다. 이러한 분절은 일반적으로 진핵 생물 유전자에 존재하는 내부 비번역 서열, 또는 인트론에 의해 방해되지 않는 오픈 리딩 프레임의 형태로 제공된다. 비번역 DNA 서열은 동일 서열이 코딩 영역의 조작이나 발현을 방해하지 않는 오픈 리딩 프레임의 하단에 나타날 수 있다.

[0110] 용어 "프라이머"는 하나의 표준 DNA와 짹을 이를 수 있는 짧은 핵산 서열을 의미하며 DNA 폴리머라아제가 디옥시리보 뉴클레오티드 사슬 합성을 시작하는 유리 3'-OH 말단을 제공한다.

[0111] 용어 "프로모터"는 전사를 시작하기 위한 RNA 폴리머라아제의 결합에 관여하는 DNA 영역을 뜻한다.

[0112] 용어 "분리"는 물질이 원래의 환경(예: 자연적으로 발생하는 경우에는 자연 환경)에서 제거되는 것을 뜻한다. 예를 들면, 자연 발생하는 살아 있는 동물에 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 분리되지 않지만, 자연계에서 공존하는 물질의 부분 또는 전체에서 분리되는 같은 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 제거된다. 한 양태에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 운송체 및/또는 이러한 폴리뉴클레오티드의 부분이거나 폴리펩티드는 구축물의 일부일 수 있으며, 이러한 벡터 또는 구축물이 자연 환경의 일부가 아닐 때 여전히 분리될 수 있다.

[0113] 본 설명에 의거해 밝혀지는 폴리뉴클레오티드 및 재조합 또는 면역성의 폴리펩티드는 "정제된" 형태일 수도 있다. 용어 "정제"는 절대적인 순도를 필요로 하지 않는다. 오히려, 그것은 상대적인 정의를 의도하며, 관련된 당업자들이 이해하는 용어로써 상당히 정제된 제조 또는 부분적으로 정제된 제조를 포함할 수 있다. 예를 들면, cDNA 라이브러리에서 분리된 각각의 클론은 전기 영동 동일성으로 통상적으로 정제된다. 시작 물질 또는 자연 물질의 최소한 하나 이상의 순서, 바람직하게는 2 내지 3개 순서 및 더 바람직하게는 4 내지 5개 순서의 크기로 정제가 명시적으로 심사숙고된다. 또한 바람직하게는 중량으로 99.999%, 또는 최소한 99.99% 또는 99.9%; 및 심지어는 바람직하게는 99%보다 큰 순도를 가진 특허청구범위에 기재된 폴리펩티드는 명시적으로 심사숙고된다.

[0114] 본 설명에 따라 밝혀진 핵산과 폴리펩티드 발현 생성물은, 이러한 핵산 및/또는 이러한 폴리펩티드를 가진 발현 벡터뿐만 아니라, "강화된 형태"일 수 있다. 여기에서 사용되는 것처럼, 용어 "강화"는 물질의 농도가 최소한 그것의 자연적 농도(예를 들면)의 최소한 2, 5, 10, 100, 또는 1000배 정도이고, 유리하게는 0.01 중량%, 바람직하게는 최소한 약 0.1 중량% 정도임을 의미한다. 중량으로 약 0.5%, 1%, 5%, 10% 및 20% 강화된 제조 또한 계획한다. 서열, 구축물, 벡터, 클론 및 본 발명의 다른 물질들은 유리하게 강화된 또는 격리된 형태가 될 수 있다. 용어 "활성 단편"은 예를 들면 토끼 또는 쥐 및 인간을 포함한 포유류 같은 동물에게 따로 또는 선택적으로 적당한 보조제와 함께 또는 매개체로서 투여했을 때 면역 반응(즉, 면역성 활동이 있는)을 생성하고 인간과 같은 받는 동물 내에서 T 세포 반응을 자극하는 형태로 면역 반응을 나타내는 웨티드, 폴리펩티드 또는 핵산 서열의 단편을 의미한다. 그렇지 않으면, "활성 단편"은 또한 시험관 내 T 세포 반응을 유도하기 위해서 사용될 수도 있다.

[0115] 여기에서 사용되는, "부분", "분절" 및 "단편"이라는 용어는, 폴리펩티드와 관련하여 사용될 때, 서열이 더 큰 서열의 하위 집합을 형성하는 경우 아미노산 잔기와 같은 잔기의 지속적인 서열을 언급한다. 예를 들면, 만약에 폴리펩티드가 트립신이나 키모트립신 같은 일반적인 엔도펩티다아제 치료를 받는다면, 그런 치료로 인해 생기는 올리고펩티드는 폴리펩티드의 시작 부분, 분절 또는 단편을 나타낼 것이다. 폴리뉴클레오티드와 관련해서 사용될 때, 이러한 용어들은 일반적인 엔도뉴클레아제 중 어떤 것과 함께 상기 폴리뉴클레오티드의 치료에 의해 생성된 생성물을 지칭한다.

[0116] 본 설명에 따라, 서열을 지칭할 때 용어 "백분율 동일성" 또는 "백분율 동일"은 설명되거나 명시된 서열("기준 서열")에 비교될 서열의 정렬 후("비교 서열") 서열이 명시된 또는 설명된 서열에 비교되는 것을 의미한다. 백분율 동일성은 하기 공식에 따라서 결정된다:

$$\text{백분율 동일성} = 100 [1 - (C/R)]$$

[0118] 상기 식에서,

[0119] C는 기준 서열과 비교 서열의 정렬의 길이에 비해 기준 서열과 비교 서열의 차이의 개수이되,

[0120] (i) 비교 서열에서 상응하는 정렬된 염기 또는 아미노산이 없는 기준 서열에 각 염기 또는 아미노산,

[0121] (ii) 기준 서열의 각 차이, 및

[0122] (iii) 비교 서열의 정렬된 기초 또는 아미노산과 다른 기준 서열에서 각 정렬된 염기 또는 아미노산은 차이를 구성하며,

- [0123] (iv) 정렬은 정렬된 서열의 위치 1에서 시작해야 하고;
- [0124] R은 비교 서열과의 정렬의 길이에 대한 기준 서열 염기 또는 아미노산의 수이고 기준 서열에 생긴 공백도 염기 또는 아미노산 개수로 계산된다.
- [0125] 만약에 위에서와 같이 계산된 비교 서열과 기준 서열 사이의 백분율 동일성이 특정 최소 백분율과 같거나 더 크면 위에서 계산된 백분율 동일성이 특정 백분율 동일성보다 작은 경우에 정렬이 있더라도 비교 서열은 기준 서열에 대해 특정한 최소 백분율 동일성이 있다.
- [0126] 본 설명에서, "상동"이라는 용어는 두 개의 아미노산 서열, 즉, 웨티드 또는 폴리웨티드 서열 사이의 동일 정도(위의 백분율 동일성 참조)를 일컫는다. 전술한 "상동"은 비교될 두 개의 서열을 최적 상태에서 나란히 정렬하여 비교하여 결정된다. 이러한 서열 상동 관계는 예를 들면 ClustalW 알고리즘을 이용하여 정렬을 만들어 계산할 수 있다. 일반적으로 사용이 가능한 서열 분석 소프트웨어, 더 구체적으로 벡터 NTI, GENETYX 또는 다른 도구들은 공용 데이터베이스에서 제공된다.
- [0127] 이 분야의 당업자는 특정 웨티드의 변이체에 의해서 유도된 T 세포가 그 웨티드 자체와 교차 반응할 수 있을지를 평가할 수 있을 것이다(Appay *et al.*, 2006; Colombetti *et al.*, 2006; Fong *et al.*, 2001; Zaremba *et al.*, 1997).
- [0128] 주어진 아미노산 서열의 "변이체"란, 발명자들이 예를 들면, 하나 또는 두 개의 아미노산 잔기의 측사슬이 변경되어 그 웨티드가 여전히 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24의 아미노산 서열로 구성된 웨티드와 실질적으로 같은 방법으로 HLA 분자와 결합할 수 있음을 의미한다. 예를 들면, 웨티드 변형에 의해 HLA-A\*02 또는 -DR과 같은 적합한 MHC 분자의 결합 흄과 상호 작용하여 결합하는 능력을 향상시키지는 않더라도 적어도 유지할 수 있으며 이에 따라 활성화된 T 림프구의 TCR과 결합할 수 있는 능력을 향상시키지 않더라도 적어도 유지한다. 유사하게, TCR 단백질의 변형에 의해 HLA-A\*02 또는 -DR과 같은 적당한 MHC 분자/KVLEHVRRV(서열 식별 번호 1) 복합체와 상호 작용하는 능력을 향상시키지는 않더라도 적어도 유지할 수 있으며 이에 따라 이는 T 세포의 활성화 능력을 향상시키지는 않더라도 적어도 유지한다.
- [0129] 이 T 세포는 그 결과로 본 발명의 한 양태에서 정의가 된 바 있는 KVLEHVRRV(서열 식별 번호 1) 등 동족의 웨티드의 자연 아미노산 서열을 포함하는 폴리웨티드를 발현하는 세포와 상호 반응을 하고 그 세포들을 죽일 수 있다. 과학 문헌 및 데이터 베이스(Rammensee *et al.*, 1999; Godkin *et al.*, 1997)에서 얻을 수 있듯이, HLA 결합 웨티드의 특정 위치는 전형적으로 HLA 수용기의 결합 모티프에 일치하는 핵심 고정 잔기이며 이는 결합 흄을 이루고 있는 폴리웨티드의 극성, 전기 물리성, 소수성 및 공간적 특성에 의해 정의된다. 한 양태에서 이 분야의 당업자는 알려진 고정 잔기를 유지함으로써 TCR의 아미노산을 변경하는 본 설명에서 주어진 능력을 가질 것이며 이러한 TCR 변이체들이 MHC 클래스 I 또는 II 분자/KVLEHVRRV(서열 식별 번호 1) 복합체와 결합할 수 있는 능력을 유지할 수 있는지를 판단할 수 있을 것이다. 본 설명의 TCR 변이체는 MHC 클래스 I 또는 II 분자/KVLEHVRRV(서열 식별 번호 1) 복합체를 결합시키는 능력을 보유한다. 본 설명의 TCR 변이체를 발현하는 T 세포는 그 결과 KVLEHVRRV(서열 식별 번호 1) 등 동족 웨티드의 자연 아미노산 서열을 포함하는 폴리웨티드를 발현하는 세포를 죽일 수 있다.
- [0130] 한 양태에서, 여기에서 밝혀진 웨티드 또는 TCR은 대안적으로 언급되지 않는 이상 다른, 가능하게는 선택적인, 웨티드 사슬 내 부위의 하나 이상의 잔기의 치환에 의해 변형될 수 있다. 바람직하게는 이러한 치환은 상기 웨티드의 아미노산 사슬의 말단에 위치한다. TCR에서는, 바람직하게는 그러한 치환이 TCR 알파 사슬 및 TCR 베타 사슬의 가변 도메인에 위치한다. 그런 치환은, 예를 들면, 소수성의 아미노산이 다른 소수성의 아미노산으로 치환되는 것처럼, 한 아미노산이 구조 및 특성이 유사한 아미노산에 의해 치환됨으로써 그 성격이 보존적일 수 있다 심지어 더 보존적인 것은 류신이 이소류신으로 치환되는 것 같이, 같거나 비슷한 크기와 화학적 특성을 가진 아미노산으로 치환되는 것이다. 자연적으로 발생하는 동종 단백질의 종족에서의 서열 변화의 연구에서, 특정 아미노산의 치환은 다른 것들보다 더 자주 허용되고 있으며, 이들은 본래의 아미노산과 치환 사이에서 크기, 전하, 극성, 및 소수성이 비슷한 상관관계를 보이며, 이것은 "보존적 치환"을 정의하는데 기본이 된다.
- [0131] 여기서 보존적 치환은 아래의 다섯 개 그룹 중 하나의 교환으로 정의된다: 그룹 1- 작은 지방족, 비극성 또는 약간 극성의 잔기(Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); 그룹 2- 극성, 음전하를 가진 잔기와 그 아미드(Asp, Asn, Glu, Gln); 그룹 3- 극성, 양전하를 가진 잔기(His, Arg, Lys); 그룹 4- 큰, 지방족, 비극성 잔기(Met, Leu, Ile, Val, Cys); 및 그룹 5- 큰, 방향족 잔기(Phe, Tyr, Trp).
- [0132] 덜 보존적 치환은 알라닌을 이소류신 잔기로 치환하는 것처럼, 비슷한 성질이지만 크기가 어느 정도 다른 아미

노산으로 치환하는 것을 포함한다. 아주 비보수적인 치환은 산성 아미노산을 극성, 또는 심지어 염기성 아미노산으로 치환하는 것을 포함할 수도 있다. 그러나 이러한 "급진적" 치환은 화학적 작용이 완전히 예측 불가능하고 급진적 치환은 단순한 화학 원리에서 예측 가능하지 않은 뜻밖의 발생이 있을 수 있기 때문에 효과가 없다고 기각할 수는 없다.

[0133] 한 양태에서, 이러한 치환은 일반적인 L-아미노산 외 다른 구조를 포함할 수 있다. 그러므로, D-아미노산을 본 설명의 항원성 웨პ티드에서 흔히 발견되는 L-아미노산으로 교체할 수 있고 본 공개에서 여전히 포함될 수 있다. 또한, 비표준 아미노산(즉, 흔히 자연적으로 발생하는 단백질성 아미노산이 아닌) 역시 본 발명에 따라 면역성과 면역성 폴리웨პ티드를 생산하기 위해서 치환 목적으로 사용될 수 있다.

[0134] 아래에서 정의된 것과 상당히 동일하거나 더 큰 항원 활성이 있는 웨პ티드의 하나 이상의 위치에서 치환이 발견되면, 이러한 치환의 조합은 조합된 치환이 웨პ티드의 항원성에 추가적 효과 또는 시너지 효과의 결과를 내는지 결정하기 위해 시험된다. 최대한으로, 웨პ티드의 4개가 넘는 위치에서 동시에 치환될 수 없을 것이다.

[0135] 여기서 사용된 용어 "쥐파" 또는 "인간"은 항원 인식 구축물 또는 TCR이나 여기서 기술된 TCR의 모든 성분(예: 상보 결정 영역(CDR), 가변 영역, 불변 영역,  $\alpha$  사슬 및/또는  $\beta$  사슬)을 지칭하는 경우 TCR(또는 그 성분)을 의미하며, 이것은 생쥐나 인간 비재배열된 TCR 자리 각각으로부터 유래한다.

#### T 세포 수용체(TCR)

[0137] 바람직한 한 구현에서, 본 설명은 표 2에 나와 있는 TCR 알파 사슬 및 그 변이체; 그리고 표 2에 나와 있는 TCR 베타 사슬 및 그 변이체를 포함하는 TCR에 관한 것이다. 한 양태에서, 여기서 기술된 TCR은 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I/ KVLEHVRRV(서열 식별 번호 1)/복합체에 또는 클래스 II/KVLEHVRRV(서열 식별 번호 1)/복합체에 결합하거나 특이적으로 결합하는 능력을 갖는다.

[0138] [표 2]

[0139]

본 설명에 따른 대표적인 TCR

TCR ID	설명	서열
R20P1H7 알파 사슬	알파 사슬	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQEGESSS LNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEEKEKERL KATLTKESFLHITAPKPEDSATYLCAVQGENSGYSTLFGKG TMLLVSPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANA FNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLNVIGF RILLLKVAGFNLLMTLRLWSS (서열 식별 번호 39)
	L 분절(TRAV20)	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSG (서열 식별 번호 40)
	V 사슬(TRAV20)	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQEGESSS LNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEEKEKERL KATLTKESFLHITAPKPEDSATYLCAVQ (서열 식별 번호 41)
	CDR1	VSGLRG (서열 식별 번호 42)
	CDR2	LYS (서열 식별 번호 43)
	CDR3	CAVQGENSGYSTLTF (서열 식별 번호 44)
	J 분절(TRAJ11)	NSGYSTLTFGKGTMILLVSP (서열 식별 번호 45)
	불변 영역(TRAC)	DIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVQSKDS YITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIPE DTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLNVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS (서열 식별 번호 46)
R20P1H7 베타 사슬	베타 사슬	MGPQLLGYYVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKLT SQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPEG YKVSERKEKRNFPLILESPSPNQTSLSYFCASSLGPGLAAYNEQF FGPGTRLTVLEDLKNVFPPEAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTD PQPLKEQPALNDSRY CLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG (서열 식별 번호 47)
	L 분절(TRBV27)	MGPQLLGYYVLCLLGAGPL (서열 식별 번호 48)
	V 사슬(TRBV27)	MGPQLLGYYVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKLT SQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPEG YKVSERKEKRNFPLILESPSPNQTSLSYFCASSL (서열 식별 번호 49)
	CDR1	MNHEY (서열 식별 번호 50)
	CDR2	SMNVEV (서열 식별 번호 51)
	CDR3	CASSLGPGLAAYNEQF (서열 식별 번호 52)
	J 사슬(TRBJ2-1)	YNEQFFGPGTRLTVL (서열 식별 번호 53)

[0140]

	불변 영역(TRBC2)	EDLKNVFPPEAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDVEL SWVVNGKEVHSGVSTDPPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSA TFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVL MAMVKRKDSRG (서열 식별 번호 54)
R7P1D5 알파 사슬	알파 사슬	MKTFAFGSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVIN CTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLLTV LLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAYSSASKIIFGSGTRL IRPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS DVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSI PEDTFFPSPESSCDVVLVEKSFETDTNLNFQNLNVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS (서열 식별 번호 55)
	L 분절(TRAV5)	MKTFAFGSFLFLWLQLDCMSR (서열 식별 번호 56)
	V 사슬(TRAV5)	MKTFAFGSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVIN CTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLLTV LLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAE (서열 식별 번호 57)
	CDR1	DSSSTY (서열 식별 번호 58)
	CDR2	IFS (서열 식별 번호 59)
	CDR3	CAEYSSASKIIF ((서열 식별 번호 60))
	J 분절(TRAJ3)	YSSASKIIFGSGTRLISR (서열 식별 번호 61)
	불변 영역(TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS YITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSI PE DTFFPSPESSCDVVLVEKSFETDTNLNFQNLNVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS (서열 식별 번호 62)
R7P1D5 베타 사슬	베타 사슬	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPPRHEVTEMGQEVTLR CKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPED RFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRANTGELFFGEG SRLTVLEDLKVNFPPEAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFY PDHVELSWVVNGKEVHSGVSTDPPQLKEQPALNDSRYCLSS RLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVT QIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAV LVSALVLMAMVKRKDSRG (서열 식별 번호 63)
	L 분절(TRBV12- 4)	MGSWTLCCVSLCILVAKHT (서열 식별 번호 64)
	V 사슬(TRBV12- 4)	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPPRHEVTEMGQEVTLR CKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPED RFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCAS (서열 식별 번호 65)
	CDR1	SGHDY (서열 식별 번호 66)

R10P2G1 2 알파 사슬	CDR2	FNNNVP (서열 식별 번호 67)
	CDR3	CASRANTGELFF (서열 식별 번호 68)
	J 사슬(TRBJ2-1)	NTGELFFGEGSRLTVL (서열 식별 번호 69)
	불변 영역(TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVEL SWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSA TFWQNPRNHFRCCQVFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVL MAMVKRKDSRG (서열 식별 번호 70)
	알파 사슬	MLTASLLRAVIASICVVSSMAQKVTAQTEISVVEKEDVTLDC VYETRDTYYLFWYKQPPSHELFLIRRNSFDEQNEISGRYS WNFQKSTSSFNFTITASQVVDASAVYFCALSEGNSGNTPLVFGK GTRLSVIANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKDFACANA FNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLNSVIGF RILLKVAGFNLLMTLRLWSS (서열 식별 번호 71)
	L 분절(TRAV19)	MLTASLLRAVIASICVVSSM (서열 식별 번호 72)
	V 사슬(TRAV19)	MLTASLLRAVIASICVVSSMAQKVTAQTEISVVEKEDVTLDC VYETRDTYYLFWYKQPPSHELFLIRRNSFDEQNEISGRYS WNFQKSTSSFNFTITASQVVDASAVYFCALSE (서열 식별 번호 73)
	CDR1	TRDTYY (서열 식별 번호 74)
	CDR2	RNSF (서열 식별 번호 75)
	CDR3	CALSEGNSGNTPLVF (서열 식별 번호 76)
R10P2G1 2 베타 사슬	J 분절(TRAJ29)	NSGNTPVFGKGTRLSVIA (서열 식별 번호 77)
	불변 영역(TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDV YITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKDFACANAFNNSIPE DTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLNSVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS (서열 식별 번호 78)
	베타 사슬	MGIRLLCRVAFCFLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKFLEC VQDMHDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIPEG YSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSLSSGSHQETQYF GPGTRLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLAT GFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC LSSRLRVSATFWQNPRNHFRCCQVFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLY AVLVSALVLMAMVKRKDSRG (서열 식별 번호 79)
	L 분절(TRBV28)	MGIRLLCRVAFCFLAVGLV (서열 식별 번호 80)

[0142]

V 사슬(TRBV28)	MGIRLLCRVAFCFLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKFLEC VQDMMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP YSVSREKKERFSLILEASTNQTSMYLCASSL (서열 식별 번호 81)
CDR1	MDHEN (서열 식별 번호 82)
CDR2	SYDVKM (서열 식별 번호 83)
CDR3	CASSLSSGSHQETQYF (서열 식별 번호 84)
J 사슬(TRBJ2-5)	QETQYFGPGTRLLVL (서열 식별 번호 85)
불변 영역(TRBC2)	EDLKNVFPPEAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVEL SWWVNGKEVHSGVSTDQPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSA TFWQNPRNHFRQCQVFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVL MAMVKRKDSRG (서열 식별 번호 86)

[0143]

알파/베타 TCR의 알파 및 베타 사슬 그리고 감마/델타 TCR의 감마 및 델타 사슬은 일반적으로 각각 2개의 "도메인" 즉, 가변 및 불변 도메인을 갖는 것으로 간주된다. 가변 도메인은 가변 영역(V) 및 결합 영역(J)의 연쇄로 구성된다. 가변 도메인은 리더 영역(L) 또한 포함할 수 있다. 베타 및 델타 사슬 또한 다양성 영역(D)을 포함할 수 있다. 알파 및 베타 불변 도메인은 또한 알파 및 베타 사슬을 세포막에 고정시키는 C-말단 막횡단 도메인(TM)을 포함할 수 있다.

[0145]

그러므로 본 설명에서 용어 "TCR 알파 가변 도메인"은 리더 영역(L)이 없는 TCR 알파 V(TRAV) 영역 및 TCR 알파 J(TRAJ) 영역의 연계를 지칭하며; 또한 용어 "TCR 알파 불변 도메인"은 세포 외 TRAC 영역이나 C-말단 절단된 TRAC 서열을 지칭하며 선택적으로 알파 막횡단 도메인(VIGFRILLKVAGFNLLMTL(서열 식별 번호 87))을 지칭한다.

[0146]

마찬가지로 용어 "TCR 베타 가변 도메인"은 리더 영역(L)이 없는 TCR 베타 V(TRBV) 영역 및 TCR 베타 D/J(TRBD/TRBJ) 영역의 연계를 지칭하며; 또한 용어 TCR 베타 불변 도메인은 세포외 TRBC 영역이나 C-말단 절단된 TRBC 서열을 지칭하며 선택적으로 베타 막횡단 도메인(TILYEILLGKATLYAVLVSALVL(서열 식별 번호 88))을 지칭한다.

[0147]

감마/델타 TCR에 대하여, 여기서 사용된 용어 "TCR 감마 가변 도메인"은 리더 영역(L)이 없는 TCR 감마 V(TRGV)가 없는 TCR 감마 J(TRGJ) 영역의 연계를 지칭하며, 또한 용어 TCR 감마 불변 도메인은 세포외 TRGC 영역이나 C-말단 절단된 TRGC 서열을 지칭한다. 마찬가지로 용어 "TCR 델타 가변 도메인"은 리더 영역(L)이 없는 TCR 델타 V(TRDV) 영역과 TCR 델타 D/J(TRDD/TRDJ) 영역의 연계를 지칭하며, 용어 TCR 델타 불변 도메인은 세포외 TRDC 영역이나 C-말단 절단된 TRDC 서열을 지칭한다.

[0148]

한 구현에서, 본 설명의 TCR은 표 2에 나와 있는 TCR 알파 사슬에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 알파 사슬을 포함하거나 이로써 구성된다. 표 2에 나와 있는 TCR 알파 사슬에는 표 2에서 정의된 리더(L) 분절, V 사슬, 3개의 상보 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3), 결합 영역(J) 및 불변 영역이 포함된다.

[0149]

한 구현에서, 본 설명의 TCR은 표 2에 나와 있는 TCR 알파 가변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 알파 가변 도메인을 포함하거나 이로써 구성된다.

[0150]

한 구현에서, 본 설명의 TCR은 표 2에 나와 있는 TCR 알파 불변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 75% 동일한 TCR 알파 불변 도메인을 포함하거나 이로써 구성된다.

[0151]

한 구현에서, 본 설명의 TCR은 표 2에 나와 있는 알파 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 알파 사슬 상보 결정 영역(CDR)을 포함하는 TCR 알파 가변 도메인을 포함하거나 이로써 구성된다. 바람직한 한 구현에서, TCR 알파 가변 도메인은 표 2에 나와 있는 알파 사슬 CDR3을 포함한다. 바람직한 또 다른 구현에서, TCR 알파 가변 도메인은 표 2에 나와 있는 알파 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0152]

특히 바람직한 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 표 2의 TCR 알파 가변 도메인에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 TCR 알파 가변 도메인을 포함하거나 이로써 구성되며, 표 2의 동일한 알파 가변 도메인의 CDR1, CDR2 및

CDR3을 포함한다.

- [0153] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 표 2에 나와 있는 TCR 베타 사슬에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 베타 사슬을 포함하거나 이로써 구성된다. 표 2에 나와 있는 TCR 베타 사슬에는 표 2에서 정의된 리더(L) 분절, V 사슬, 3개의 상보 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3), 결합 영역(J) 및 불변 영역이 포함된다.
- [0154] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 표 2에 나와 있는 TCR 베타 가변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 베타 가변 도메인을 포함하거나 이로써 구성된다.
- [0155] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 표 2에 나와 있는 TCR 베타 불변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 75% 동일한 TCR 베타 불변 도메인을 포함하거나 이로써 구성된다.
- [0156] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 표 2에 나와 있는 베타 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 베타 사슬 상보 결정 영역(CDR)을 포함하는 TCR 베타 가변 도메인을 포함하거나 이로써 구성된다. 바람직한 한 구현에서, TCR 베타 가변 도메인은 표 2에 나와 있는 베타 사슬 CDR3을 포함한다. 바람직한 또 다른 구현에서, TCR 베타 가변 도메인은 표 2에 나와 있는 베타 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.
- [0157] 특히 바람직한 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 표 2의 TCR 베타 가변 도메인에 대해 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 TCR 베타 가변 도메인을 포함하거나 이로써 구성되며, 표 2의 동일한 베타 가변 도메인의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.
- [0158] 알파 사슬 가변 도메인은 표 2에 나와 있는 상응하는 CDR 서열에 비해 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 갖는 하나 이상의 알파 CDR 도메인을 포함할 수 있다. 마찬가지로, 베타 사슬 가변 도메인은 표 2에 나와 있는 상응하는 CDR 서열에 비해 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 갖는 하나 이상의 베타 CDR 도메인을 포함할 수 있다.
- [0159] TCR 알파 사슬 및 TCR 베타 사슬은 융합하여 단일 사슬 TCR을 형성할 수 있다. 다르게는, TCR 알파 및 베타 사슬은 이종이합체로 조립될 수 있는 별개의 단백질로서 발현될 수 있다.
- [0160] 한 구현에서 표 2의 어떠한 TCR 알파 사슬도 표 2의 어떠한 TCR 베타 사슬과 짹지어져서 MAG-003 웨티드-HLA 분자 복합체에 특이적으로 결합하는 TCR을 생산한다.
- [0161] TCR R20P1H7
- [0162] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 각각 서열 식별 번호 39 및 47에 상응하는 TCR R20P1H7의 알파 사슬 및/또는 베타 사슬을 포함하거나 이로써 구성된다.
- [0163] TCR R20P1H7의 TCR 알파 가변 도메인은 서열 식별 번호 39의 아미노산 22-133을 포함하거나 대안적으로 이로써 구성되며, TCR R20P1H7의 TCR 알파 불변 도메인은 서열 식별 번호 39의 아미노산 134-275를 포함하거나 대안적으로 이로써 구성되며, TCR R20P1H7의 TCR 베타 가변 도메인은 서열 식별 번호 47의 아미노산 20-135를 포함하거나 대안적으로 이로써 구성되며, TCR 베타 불변 도메인은 서열 식별 번호 47의 아미노산 136-315를 포함하거나 대안적으로 이로써 구성된다.
- [0164] 한 특별한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 39의 TCR 알파 사슬에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 알파 사슬을 포함한다.
- [0165] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 39의 TCR 알파 가변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 알파 가변 도메인을 포함한다.
- [0166] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 39의 TCR 알파 불변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 75% 동일한 TCR 알파 불변 도메인을 포함한다.
- [0167] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 39의 알파 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 군으로부터 선택

된 적어도 하나의 알파 사슬 상보 결정 영역(CDR)을 포함하는 TCR 알파 가변 도메인을 포함하거나 이로써 구성된다. 바람직한 한 구현에서, TCR 알파 가변 도메인은 서열 식별 번호 39의 알파 사슬 CDR3을 포함한다. 바람직한 또 다른 구현에서, TCR 알파 가변 도메인은 서열 식별 번호 39의 알파 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0168] 특히 바람직한 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 39의 TCR 알파 가변 도메인에 대해 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 TCR 알파 가변 도메인을 포함하며, 또한 서열 식별 번호 39의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0169] 특별한 또 다른 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 47의 TCR 베타 사슬에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 베타 사슬을 포함한다.

[0170] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 47의 TCR 베타 가변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 베타 가변 도메인을 포함한다.

[0171] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 47의 TCR 베타 불변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 75% 동일한 TCR 베타 불변 도메인을 포함한다.

[0172] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 47의 베타 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 베타 사슬 상보 결정 영역(CDR)을 포함하는 TCR 베타 가변 도메인을 포함하거나 이로써 구성된다. 바람직한 한 구현에서, TCR 베타 가변 도메인은 서열 식별 번호 47의 베타 사슬 CDR3을 포함한다. 바람직한 또 다른 구현에서, TCR 베타 가변 도메인은 서열 식별 번호 47의 베타 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0173] 특히 바람직한 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 47의 TCR 베타 가변 도메인에 대해 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 TCR 베타 가변 도메인을 포함하며, 또한 서열 식별 번호 47의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0174] 알파 사슬 가변 도메인은 서열 식별 번호 39에 상응하는 CDR 서열에 대해 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 갖는 하나 이상의 알파 CDR 도메인을 포함할 수 있다. 마찬가지로, 베타 사슬 가변 도메인은 서열 식별 번호 47에 상응하는 CDR 서열에 대해 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 갖는 하나 이상의 베타 CDR 도메인을 포함할 수 있다.

#### TCR R7P1D5

[0175] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 각각 서열 식별 번호 55 및 63에 상응하는 TCR R7P1D5의 알파 사슬 및/또는 베타 사슬을 포함하거나 이로써 구성된다.

[0176] TCR R7P1D5의 TCR 알파 가변 도메인은 서열 식별 번호 55의 아미노산 22-131을 포함하거나 대안적으로 이로써 구성되며, TCR R7P1D5의 TCR 알파 불변 도메인은 서열 식별 번호 55의 아미노산 132-272를 포함하거나 대안적으로 이로써 구성되며, TCR R7P1D5의 TCR 베타 가변 도메인은 서열 식별 번호 63의 아미노산 20-131을 포함하거나 대안적으로 이로써 구성되며, TCR 베타 불변 도메인은 서열 식별 번호 63의 아미노산 132-310을 포함하거나 대안적으로 이로써 구성된다.

[0177] 한 특별한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 55의 TCR 알파 사슬에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 알파 사슬을 포함한다.

[0178] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 55의 TCR 알파 가변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 알파 가변 도메인을 포함한다.

[0179] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 55의 TCR 알파 가변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 알파 불변 도메인을 포함한다.

[0180] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 55의 TCR 알파 불변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 75% 동일한 TCR 알파 불변 도메인을 포함한다.

[0181] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 55의 알파 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 알파 사슬 상보 결정 영역(CDR)을 포함하는 TCR 알파 가변 도메인을 포함하거나 이로써 구성

된다. 바람직한 한 구현에서, TCR 알파 가변 도메인은 서열 식별 번호 55의 알파 사슬 CDR3을 포함한다. 바람직한 또 다른 구현에서, TCR 알파 가변 도메인은 서열 식별 번호 55의 알파 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0182] 특히 바람직한 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 55의 TCR 알파 가변 도메인에 대해 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 TCR 알파 가변 도메인을 포함하며, 또한 서열 식별 번호 55의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0183] 다른 특별한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 63의 TCR 베타 사슬에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90% 또는 95% 동일한 TCR 베타 사슬을 포함한다.

[0184] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 63의 TCR 베타 가변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 베타 가변 도메인을 포함한다.

[0185] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 63의 TCR 베타 불변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 75% 동일한 TCR 베타 불변 도메인을 포함한다.

[0186] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 63의 베타 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 베타 사슬 상보 결정 영역(CDR)을 포함하는 TCR 베타 가변 도메인을 포함하거나 이로써 구성된다. 바람직한 한 구현에서, TCR 베타 가변 도메인은 서열 식별 번호 63의 베타 사슬 CDR3을 포함한다. 바람직한 또 다른 구현에서, TCR 베타 가변 도메인은 서열 식별 번호 63의 베타 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0187] 특히 바람직한 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 63의 TCR 베타 가변 도메인에 대해 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 TCR 베타 가변 도메인을 포함하며, 또한 서열 식별 번호 63의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0188] 알파 사슬 가변 도메인은 서열 식별 번호 55에 상응하는 CDR 서열에 대해 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 갖는 하나 이상의 알파 CDR 도메인을 포함할 수 있다. 마찬가지로, 베타 사슬 가변 도메인은 서열 식별 번호 63에 상응하는 CDR 서열에 대해 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 갖는 하나 이상의 베타 CDR 도메인을 포함할 수 있다.

#### TCR R10P2G12

[0189] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 각각 서열 식별 번호 71 및 79에 상응하는 R10P2G12의 알파 사슬 및/또는 베타 사슬을 포함하거나 이로써 구성된다.

[0190] TCR R10P2G12의 TCR 알파 가변 도메인은 서열 식별 번호 71의 아미노산 21-136을 포함하거나 대안적으로 이로써 구성되며, TCR R10P2G12의 TCR 알파 불변 도메인은 서열 식별 번호 71의 아미노산 137-277을 포함하거나 대안적으로 이로써 구성되며, TCR R10P2G12의 TCR 베타 가변 도메인은 서열 식별 번호 79의 아미노산 20-134를 포함하거나 대안적으로 이로써 구성되며, TCR 베타 불변 도메인은 서열 식별 번호 79의 아미노산 135-313을 포함하거나 대안적으로 이로써 구성된다.

[0191] 특별한 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 71의 TCR 알파 사슬에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 알파 사슬을 포함한다.

[0192] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 71의 TCR 알파 가변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 알파 가변 도메인을 포함한다.

[0193] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 71의 TCR 알파 불변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 75% 동일한 TCR 알파 불변 도메인을 포함한다.

[0194] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 71의 알파 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 알파 사슬 상보 결정 영역(CDR)을 포함하는 TCR 알파 가변 도메인을 포함하거나 이로써 구성된다. 바람직한 한 구현에서, TCR 알파 가변 도메인은 서열 식별 번호 71의 알파 사슬 CDR3을 포함한다. 바람직

한 또 다른 구현에서, TCR 알파 가변 도메인은 서열 식별 번호 71의 알파 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0196] 특히 바람직한 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 71의 TCR 알파 가변 도메인에 대해 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 TCR 알파 가변 도메인을 포함하며, 또한 서열 식별 번호 71의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0197] 특별한 또 다른 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 79의 TCR 베타 사슬에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 베타 사슬을 포함한다.

[0198] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 79의 TCR 베타 가변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 TCR 베타 가변 도메인을 포함한다.

[0199] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 79의 TCR 베타 불변 도메인에 대해 적어도 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게는 75% 동일한 TCR 베타 불변 도메인을 포함한다.

[0200] 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 79의 베타 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 베타 사슬 상보 결정 영역(CDR)을 포함하는 TCR 베타 가변 도메인을 포함하거나 이로써 구성된다. 바람직한 한 구현에서, TCR 베타 가변 도메인은 서열 식별 번호 79의 베타 사슬 CDR3을 포함한다. 바람직한 또 다른 구현에서, TCR 알파 가변 도메인은 서열 식별 번호 79의 베타 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0201] 특히 바람직한 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 서열 식별 번호 79의 TCR 베타 가변 도메인에 대해 적어도 90% 또는 95% 서열 동일성을 갖는 TCR 베타 가변 도메인을 포함하며, 또한 서열 식별 번호 79의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0202] 알파 사슬 가변 도메인은 서열 식별 번호 71에 상응하는 CDR 서열에 대해 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 갖는 하나 이상의 알파 CDR 도메인을 포함할 수 있다. 마찬가지로, 베타 사슬 가변 도메인은 서열 식별 번호 79에 상응하는 CDR 서열에 대해 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 갖는 하나 이상의 베타 CDR 도메인을 포함할 수 있다.

[0203] 추가로 바람직한 한 구현에서, 본 설명의 TCR은 MAG-003 펩티드-HLA 분자 복합체에 특이적으로 결합하며, MAG-003 펩티드는 서열 식별 번호 2 내지 서열 식별 번호 24에 나와 있는 것과 같은 KVLEHVVVRV(서열 식별 번호 1) 및 그 변이체들로부터 선택된다. 한 구현에서 HLA 분자는 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 분자로 구성된 군으로부터 선택된 클래스 I MHC 분자이다. 한 구현에서 HLA 분자는 HLA-A\*02이다. 또 다른 구현에서 HLA 분자는 HLA-DP, HLA-DQ 및 HLA-DR 분자로 구성된 군으로부터 선택된 클래스 II MHC 분자이다.

[0204] 본 설명의 TCR은 바람직하게는 결합 친화도( $K_d$ )가 약 100  $\mu\text{M}$  이하, 약 50  $\mu\text{M}$  이하, 약 25  $\mu\text{M}$  이하 또는 약 10  $\mu\text{M}$  이하인 MAG-003 펩티드-HLA 분자 복합체에 결합한다. 더욱 바람직하게는, 결합 친화도가 약 1  $\mu\text{M}$  이하, 약 100 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 25 nM 이하를 갖는 고친화도 TCR이다. 본 설명의 TCR은 바람직한 결합 친화도 범위에 대한 제한되지 않는 예에는 약 1 nM 내지 약 10 nM, 약 10 nM 내지 약 20 nM, 약 20 nM 내지 약 30 nM, 약 30 nM 내지 약 40 nM, 약 40 nM 내지 약 50 nM, 약 50 nM 내지 약 60 nM, 약 60 nM 내지 약 70 nM, 약 70 nM 내지 약 80 nM, 약 80 nM 내지 약 90 nM 및 약 90 nM 내지 약 100 nM가 포함된다.

[0205] 본 설명의 TCR와 관련하여 여기서 사용되는, "특이적 결합" 및 그 문법적 변형에는 100  $\mu\text{M}$  이하의 MAG-003 펩티드-HLA 분자 복합체에 대한 결합 친화도( $K_d$ )를 갖는 TCR을 의미하는 것으로 사용된다.

[0206] 본 설명의 알파/베타 이질이합체 TCR은 그 불변 도메인 사이에 도입된 이황화 결합을 가질 수 있다. 이러한 유형의 바람직한 TCR에는 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1이나 TRBC2 불변 도메인 서열을 갖는 것들이 포함되는데, 단 TRAC의 Thr 48 및 TRBC1이나 TRBC2의 Ser 57이 시스테인 잔기로 교체는 경우는 예외로, 상기 시스테인은 TCR의 TRAC 불변 도메인 서열과 TRBC1이나 TRBC2 불변 도메인 사이에 이황화 결합을 형성한다.

[0207] 위에서 언급한 도입된 사슬간 결합의 유무에 관계 없이, 본 설명의 알파/베타 이질이합체 TCR은 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1이나 TRBC2 불변 도메인 서열을 가질 수 있으며, TCR의 TRAC 불변 도메인 서열 및 TRBC1이나 TRBC2 불변 도메인 서열은 TRAC의 엑손 2의 Cys4와 TRBC1이나 TRBC2의 엑손 2의 Cys2 사이에 있는 자연 이황화 결합에 의해 연계될 수 있다.

- [0208] 본 설명의 TCR은 방사성핵종, 형광단 및 비오틴으로 구성된 군으로부터 선택된 검출가능한 라벨을 포함할 수 있다. 본 설명의 TCR은 방사성핵종, 화학요법제, 독소와 같은 활성 치료제에 접합될 수 있다.
- [0209] 한 구현에서, 알파 사슬에 적어도 1개의 돌연변이를 가지며/갖거나 베타 사슬에 적어도 1개의 돌연변이를 갖는 본 설명의 TCR은 돌연변이되지 않은 TCR에 비해 변형된 당화를 갖는다.
- [0210] 한 구현에서, 알파 사슬에 적어도 1개의 돌연변이를 가지며/갖거나 베타 사슬에 적어도 1개의 돌연변이를 갖는 TCR은 MAG-003 웨티드-HLA 분자 복합체에 대해 결합 친화도 및/또는 결합 반감기를 가지며, 이는 비돌연변이 TCR 알파 사슬 및/또는 비돌연변이 TCR 베타 사슬을 포함하는 TCR의 그것에 대해 적어도 2배이다. 종양 특이적 TCR의 친화도 강화 및 그 이용은 죄적의 TCR 친화도에 대한 범위의 존재에 의존한다. 그러한 창의 존재는, HLA-A2 제한 병원체에 특이적인 TCR의 *AD* 값이 HLA-A2 제한 종양 관련 자가 항원에 특이적인 TCR에 대해 일반적으로 약 10배 낮다는 관찰에 근거한다(Aleksic *et al.* 2012; Kunert *et al.* 2013). 현재 종양은 개인 자체의 세포로부터 발생하기 때문에 종양 항원이 면역원성일 수 있음에도 불구하고, 돌연변이된 단백질이나 변형된 면역 처리를 가진 단백질만이 면역계에 의해 외부적으로 보이게 된다. 상향조절되거나 과발현되는 항원(소위 자가 항원)은 종양에 대한 기능적 면역 반응을 반드시 유도할 필요는 없을 것이다: 이러한 항원에 고도로 반응성인 TCR을 발현하는 T 세포는 중추 관용으로 알려진 과정에서 흥선 내부로부터 음적으로 선택되었을 것이다(Xing *et al.* 2012; Ruella *et al.* 2014; Sharpe *et al.* 2015), 이것은 자가 항원에 대해 낮은 친화도 TCR을 갖는 T 세포만 남는다는 것을 의미한다. 그러므로 본 설명의 TCR이나 TCF의 MAG-003에 대한 친화도는 다음에 설명된 바와 같이 당업계에서 잘 알려진 방법들로 강화되어왔다.
- [0211] MAG-003 웨티드
- [0212] 본 설명은 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 웨티드 또는 서열 식별 번호 1 내지 서열 식별 번호 24에 대해 88% 상동성인 그 변이체 또는 여기서 기술된 웨티드와 교차 반응하는 T 세포를 유도하는 그 변이체를 제공한다. 한 양태에서, 웨티드는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I의 분자에 결합하는 능력 또는 여기서 기술된 더 긴 버전의 웨티드가 클래스 II에 결합하는 능력을 갖는다. 한 양태에서, 여기서 기술된 TCR은 여기서 기술된 웨티드에 결합하거나 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0213] 인간에는 MHC 클래스 I 분자를 인코딩하는 세 개의 유전자 자리가 있다(인간의 MCH-분자는 또한 지정된 인간 백혈구 항원이다(HLA)): HLA-A, HLA-B 및 HLA-C. HLA-A\*01, HLA-A\*02 및 HLA-A\*07은 이러한 유전자 좌에서 발현 할 수 있는 다른 MHC 클래스 I 대립형질의 예이다.
- [0214] 표 3은 HLA-A\*02 및 HLA-A\*24 그리고 가장 빈번한 HLA-DR 혈청형의 발현 빈도 F를 나타낸다. 빈도는 Mori *et al.*로부터 적응된 미국 인구 내에서의 일배체형 빈도 Gf로부터 추정되며 (Mori *et al.*, 1997)으로부터 조정된 미국 인구 내에서의 일배체형 빈도 Gf로부터 도출되며, 하디-와인버그 공식  $F = 1 - (1-Gf)^2$  을 사용한다. A\*02 또는 A\*24와 일부 HLA-DR 대립형질의 조합은 강화되거나 연관 불평형으로 인해 단일 빈도보다 덜 빈번할 수 있다. 자세한 내용은 Chanock 등을 참조한다 (Chanock *et al.*, 2004).

[0215]

[표 3]

대립형질	모집단	대립형질로부터 계산된 표현형
A*02	백인(북미)	49.1%
A*02	미국 흑인(북미)	34.1%
A*02	아시아계 미국인(북미)	43.2%
A*02	중남미계 미국인(북미)	48.3%
DR1	백인(북미)	19.4%
DR2	백인(북미)	28.2%
DR3	백인(북미)	20.6%
DR4	백인(북미)	30.7%
DR5	백인(북미)	23.3%
DR6	백인(북미)	26.7%
DR7	백인(북미)	24.8%
DR8	백인(북미)	5.7%
DR9	백인(북미)	2.1%
DR1	미국 흑인(북미)	13.20%
DR2	미국 흑인(북미)	29.80%
DR3	미국 흑인(북미)	24.80%
DR4	미국 흑인(북미)	11.10%
DR5	미국 흑인(북미)	31.10%
DR6	미국 흑인(북미)	33.70%
DR7	미국 흑인(북미)	19.20%
DR8	미국 흑인(북미)	12.10%
DR9	미국 흑인(북미)	5.80%
DR1	아시아계 미국인(북미)	6.80%
DR2	아시아계 미국인(북미)	33.80%
DR3	아시아계 미국인(북미)	9.20%
DR4	아시아계 미국인(북미)	28.60%
DR5	아시아계 미국인(북미)	30.00%
DR6	아시아계 미국인(북미)	25.10%
DR7	아시아계 미국인(북미)	13.40%
DR8	아시아계 미국인(북미)	12.70%
DR9	아시아계 미국인(북미)	18.60%
DR1	중남미계 미국인(북미)	15.30%
DR2	중남미계 미국인(북미)	21.20%
DR3	중남미계 미국인(북미)	15.20%
DR4	중남미계 미국인(북미)	36.80%
DR5	중남미계 미국인(북미)	20.00%
DR6	중남미계 미국인(북미)	31.10%
DR7	중남미계 미국인(북미)	20.20%
DR8	중남미계 미국인(북미)	18.60%

[0216]

대립형질	보집단	대립형질로부터 계산된 표현형
DR9	중남미계 미국인(북미)	2.10%
A*24	필리핀	65%
A*24	러시아 네네츠	61%
A*24:02	일본	59%
A*24	말레이시아	58%
A*24:02	필리핀	54%
A*24	인도	47%
A*24	대한민국	40%
A*24	스리랑카	37%
A*24	중국	32%
A*24:02	인도	29%
A*24	호주 서부	22%
A*24	미국	22%
A*24	러시아 사마라	20%
A*24	남미	20%
A*24	유럽	18%

[0217]

MAGEA4 유전자

[0219]

이 유전자는 MAGEA 유전자 계열의 구성원이다. 이 계열의 구성원들은 서로 50 내지 80%의 서열 동일성을 가진 단백질을 인코딩한다. MAGEA 유전자의 프로모터 및 제1 엑손은 상당한 변동성을 보이는데, 이는 이 유전자 계열의 존재가 동일한 기능을 여러 다른 전사 조절 하에서 발현 가능케함을 시사한다. MAGEA 유전자들은 염색체 위치 Xq28에 군집한다. 이 유전자들은 선천성 각화 부전증과 같은 일부 유전 질환에 연루되었다. 동일한 단백질을 인코딩하는 적어도 4개 변이체가 이 유전자에서 발견되었다. (출처: RefSeq, 2008년 7월).

[0220]

MAGEA4 국소화는 세포질로서 설명되었다(Kim *et al.*, 2015). 하지만 MAGEA4 염색은 핵에서도 검출되었으며, 잘 분화된 암 대 텔 분화된 암에서 핵과 세포질 사이의 차등 분배가 있었다(Sarcevic *et al.*, 2003).

[0221]

MAGEA4는 남성 생식 세포 마커로서 사용된다. 이것은 생식모세포에서는 발현되지 않지만 정원세포와 성숙한 생식 세포에서는 발현된다(Mitchell *et al.*, 2014).

[0222]

[표 4]

[0223]

일반적 암 표적

항원 성질	평가
문헌에서 보고된 [관심 대상 암]에서 과발현	
문헌에서 보고된 다른 암에서 과발현	+
묘사된 기원 단백질 유래 표적에 대한 T세포 반응	+
종양태아 발현 패턴	+
암 줄기 세포에 의한 발현	(-)
세포 주기 진행 및 종양 세포 증식에서의 역할	(-)
종양 침윤, 이동 및 전이에 대한 관여	
암 연관 신호전달 경로에 대한 연결 <sup>1</sup>	
항세포자멸사 효과	(-)
전혈관 신생 효과 / 신혈관 형성	
암에서 불량한 예후와 연결된 과발현	+
진행성 암 명기와 연관된 과발현	+
일반적 암 표적	
하위세포 국소화 <sup>2</sup>	CY
문헌에서 기원 단백질의 특성화(-, +, ++, ++++)	+
세포 유형 연관 <sup>3</sup>	TU

[0224]

[0225] <sup>1</sup> TGF = 형질전환 성장 인자; PI3K = 포스파티딜이노시티드 3-키나제; p53 = 세포 종양 항원 p53; EGFR = 상피 성장 인자 수용체; FGF2 = 섬유모세포 성장 인자 2; Wnt = Wnt / 베타-카테닌 경로(배아 생성); Ras = Rat 육종 원암-유전자; NF- $\kappa$ B = 핵 인자 카파 B(진핵 전사 인자)<sup>2</sup> CY = 세포질; <sup>3</sup> TU = 종양 세포.

#### 표적으로서 pMHC

[0227] 식도암 환자의 제I상 임상 시험에서는 HLA-A\*24:02에 결합된 MAGEA4(143-151)를 향하여 반응성인 TCR 조작된 자가조직 CTL의 입양 전이를 조사했다. 환자들에게 전처치 치료 없이 TCR 형질도입된 림프구를 1회, 투여, 그리고 2주 및 4주 이후에 MAGEA4 웨პ티드로써 피하 면역접종을 했다. 어떠한 객관적 종양 회귀도 관찰되지 않았으며 이는 림프구고갈 양생법의 결여 및 IL2의 투여에 기인한 것일 수 있다(Kageyama *et al.*, 2015). 마우스의 전임상 연구에서, 이전된 T 세포가 마우스에 접종된 MAGEA4-발현 종양 세포주의 성장을 억제하며 또한 추가의 웨პ티드 면역접종은 이 항종양 활성도를 강화시키는 것을 잘 보여주었다(Shirakura *et al.*, 2012).

[0228] 입양 CTL 이전에 의한 MAGEA4의 표적화가 EBV-음성 호지킨 및 비호지킨 림프종의 치료 옵션으로 제안된다. EBV-유래된 웨პ티드를 표적으로 하는 주입된 CTL은 EBV(+) 림프종 환자에서 완전 판해를 유도하는 것으로 설명되었다. 그러므로 MAGEA4 등 림프종에 의해 발현되는 다른 항원의 표적화가 가능한 치료 옵션으로 탐색되고 있다(Cruz *et al.*, 2011; Gerdemann *et al.*, 2011).

[0229] 여러 연구에서 중복된 웨პ티드 풀에 의해 펠스화된 자가조직 항원 제시 세포와 함께 배양한 공여자 및 암환자의 MAGEA4 특이적 CD4(+) T 세포의 생성을 잘 보여주었다(Cesson *et al.*, 2011; Gerdemann *et al.*, 2011; Ohkuri *et al.*, 2009).

[0230] MAG-003 웨პ티드, 즉, KVLEHVVVRV(서열 식별 번호 1)는 MAGEA4(아미노산 286-294)의 HLA-A\*0201 제한 세포독성 T 림프구(CTL)의 에피톱이다. (Jia *et al.* 2010; Wu *et al.* 2011)의 전문이 참조문헌으로 여기에 포함된다. 한 양태에서, MAG-003은 HLA-A\*0201-양성 PBMC 그리고 HLA-A\*0201/Kb 유전자 삽입 마우스로부터 시험관 내에서 웨პ티드 특이적 CTL을 촉발한다. 다른 양태에서, 유도된 CTL은 HLA-A\*0201 제한 방식으로 표적 세포를 용해시키며, 이는 MAG-003가 HLA-A\*0201 제한된 CTL 에피톱이며 치료 항종양 면역접종의 역할을 한다는 것을 잘 보여준다 (Jia *et al.* 2010). 이 내용의 전문이 참조 문헌으로 여기에 포함된다.

[0231] 도 1은 건강한 조직과 암에서 MAG-003 웨პ티드 제시를 보여준다. 그 결과는 표 5에 요약되어 있다. 구체적으로, 난소암(OC)과 비소세포 폐암(NSCLC)의 종양 조직에서 세포당 약 4,000 및 2,000개의 MAG-003 사본이 각각 추정된다.

#### [표 5]

[0233] 건강한 조직과 암에서 MAG-003 제시

A*02	샘플	평균 강도	jScore
건강한	0 / 245	---	---
암	14 / 397	1.1e+07	0.000
HCC	1 / 16	2.9e+06	0.000
MEL	0 / 3	0.0e+00	
OC	2 / 20	4.0e+07	0.000
pNSCLC	11 / 91	1.0e+07	0.000

[0234]

#### 본 설명의 웨პ티드를 인코딩하는 유전자의 발현 프로파일링

[0236] 건강한 세포와 비교한 종양 세포 상의 웨პ티드의 과다 제시 또는 특이적 제시는 면역요법에서의 그 유용성에 대해 충분하며 일부 웨პ티드는 건강한 조직에서도 발생하는 그 근원 단백질에도 불구하고 종양 특이적이다. mRNA 발현 프로파일링은 여전히 면역 요법의 웨პ티드 표적 선택에 있어서 더 높은 안전성 수준을 추가시킨다. 특히 친화도 성숙 TCR과 같은 안정성 위험이 높은 치료적 옵션의 경우에는, 이상적 표적 웨პ티드는 종양에 고유하며 건강한 조직에는 없는 단백질로부터 유래될 것이다.

#### RNA 원천 및 준비

[0238] 수술로 제거된 조직 검체는 각각의 환자로부터 동의서를 얻은 다음 제공되었다. 종양 조직 검체는 수술 직후 스

냅-냉동되었고 절구와 유봉을 이용하여 액체 질소 환경 아래에서 균질화되었다. 총 RNA는 TRI 시약(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)을 이용하여 샘플로부터 만들었으며, 이는 RNeasy(QIAGEN, Hilden, Germany)에 의해 청소되었다; 이 두 가지 방법은 모두 제조업체의 설명서에 따라 실행되었다.

[0239] RNAseq 실험

[0240] 종양 및 건강한 조직의 RNA 샘플의 유전자 발현 분석은 CeGaT(독일 튜빙겐)사의 차세대 시퀀싱(RNAseq)으로 수행하였다. 시퀀싱 라이브러리는 제공사의 프로토콜(Illumina Inc., San Diego, CA, USA)에 따라 Illumina HiSeq v4 시약 키트를 사용하여 만들며, 여기에는 RNA 분절, cDNA 전환 및 시퀀싱 어댑터 추가가 포함된다. 복수의 샘플에서 유래한 라이브러리들은 동일한 물로 혼합한 다음, Illumina HiSeq 2500 시퀀서에서 그 제조사의 지침에 따라 서열을 결정하여 50 bp의 싱글 엔드 리드(single end read)를 생성한다. 처리된 리드는 STAR 소프트웨어를 사용하여 인간 게놈(GRCh38)에 대해 매핑한다. 발현 데이터는 RPKM(백만개 매핑된 리드당 킬로베이스 당 리드, Cufflinks 소프트웨어에 의해 생성)으로 전사물 수준 상 그리고 엑손 수준 상(총 리드, Bedtools 소프트웨어에 의해 생성)에서 제공되며, 양상별 서열 데이터베이스(Ensembl77)의 주석에 기반한다. 엑손 리드는 엑손 길이 및 정렬 크기에 대해 정규화하여 RPKM 수치를 얻는다.

[0241] 도 2 내지 4에서 보는 바와 같이, MAG-003은 암 조직 그리고 고위험 및 중간 위험의 건강한 조직과 비교하여 고환과 같은 저위험 건강한 조직에서 고도로 발현된다.

[0242] 표 6 내지 표 8은 다양한 암에서 MAG-003의 RNASeq 데이터(발현 점수)를 보여준다.

[0243] [표 6]

[0244] RNASeq 점수 1

종양 유형	tgScore	exonScore (27242)	exonScore (317034)	exonScore (593984)
BRCA	<b>1.57</b>	<b>1.23</b>	<b>1.23</b>	<b>1.51</b>
CRC	<b>1.65</b>	<b>1.00</b>	<b>1.00</b>	<b>1.76</b>
HCC	<b>12.10</b>	<b>11.98</b>	<b>11.97</b>	<b>6.15</b>
OC	<b>56.60</b>	<b>18.45</b>	<b>18.44</b>	<b>57.74</b>
OSCAR	<b>58.42</b>	<b>3.49</b>	<b>3.49</b>	<b>60.40</b>
PC	<b>12.10</b>	<b>10.78</b>	<b>10.77</b>	<b>4.74</b>
pGB	<b>0.88</b>	<b>0.95</b>	<b>0.95</b>	<b>0.74</b>
pNSCLC	<b>100.83</b>	<b>1.52</b>	<b>1.52</b>	<b>98.57</b>
RCC	<b>0.93</b>	<b>0.95</b>	<b>0.95</b>	<b>0.77</b>
SCLC	<b>56.41</b>	<b>28.32</b>	<b>28.30</b>	<b>152.27</b>

[0245]

[0246] [표 7]

[0247] RNASeq 점수 3

종양 유형	tgScore	exonScore (27242)	exonScore (317034)	exonScore (593984)
BRCA	<b>7.48</b>	<b>5.11</b>	<b>5.11</b>	<b>6.01</b>
CRC	<b>8.35</b>	<b>1.05</b>	<b>1.05</b>	<b>7.90</b>
HCC	<b>123.03</b>	<b>210.33</b>	<b>210.30</b>	<b>42.22</b>
OC	<b>612.59</b>	<b>333.74</b>	<b>333.69</b>	<b>447.29</b>
OSCAR	<b>632.95</b>	<b>47.41</b>	<b>47.40</b>	<b>468.45</b>
PC	<b>122.95</b>	<b>187.07</b>	<b>187.05</b>	<b>31.15</b>
pGB	<b>0.31</b>	<b>0.18</b>	<b>0.18</b>	<b>0.25</b>
pNSCLC	<b>1100.05</b>	<b>10.26</b>	<b>10.25</b>	<b>768.23</b>
RCC	<b>0.78</b>	<b>0.18</b>	<b>0.18</b>	<b>0.43</b>
SCLC	<b>611.00</b>	<b>524.23</b>	<b>524.17</b>	<b>1190.36</b>

[0248]

[0249]

[표 8]

[0250]

종양 발현

종양 유형	tgtumor40	Exontumor40 (27242)	Exontumor40 (317034)	Exontumor40 (593984)
BRCA	<b>0.12</b>	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>	<b>0.17</b>
CRC	<b>0.14</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.22</b>
HCC	<b>2.05</b>	<b>1.82</b>	<b>1.82</b>	<b>1.18</b>
OC	<b>11.19</b>	<b>3.16</b>	<b>3.16</b>	<b>13.72</b>
OSCAR	<b>10.89</b>	<b>0.42</b>	<b>0.42</b>	<b>13.11</b>
PC	<b>2.09</b>	<b>1.65</b>	<b>1.65</b>	<b>0.89</b>
pGB	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>
pNSCLC	<b>19.25</b>	<b>0.09</b>	<b>0.09</b>	<b>22.58</b>
RCC	<b>0.01</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>
SCLC	<b>10.18</b>	<b>4.53</b>	<b>4.53</b>	<b>33.35</b>

[0251]

[0252]

한 양태에서, 여기에 명시한 바와 같이 아미노산 서열로 필수적으로 구성된 웨პ티드는, 비변형 웨პ티드에 비해 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II의 분자에 결합하는 능력이 상당히 변경되거나 또는 부정적으로 영향받지 않고, 하나 또는 두 개의 비앵커 아미노산(앵커 모티프에 대해서는 아래 참조)이 교환될 수 있다. 또 다른 구현에서, 여기서 명시한 바와 같이 아미노산 서열로 필수적으로 구성되는 웨პ티드에 있어서, 비변형 웨პ티드에 비해 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 클래스 II의 분자에 결합하는 능력이 상당히 변경되거나 부정적으로 영향을 받지 않고, 하나 또는 두 개의 아미노산이 해당되는 보수적 교환 파트너들(아래 참조)과 교환될 수 있다.

[0253]

TCR과의 상호작용에 상당히 기여를 하지 않는 아미노산 잔기들은, 이와 결합됨으로써 T 세포의 반응성에 큰 영향을 주지 않고 관련된 MHC와의 결합을 제거하지 않는 다른 아미노산과의 교체에 의해 변형될 수 있다. 따라서, 주어진 조건 외에도, 본 설명의 웨პ티드는 아미노산 서열 또는 그 한 부분 또는 주어진 변이체를 포함하는(발명자들이 올리고웨პ티드 또는 폴리웨პ티드를 포함한다고 일컫는) 일체의 웨პ티드가 될 수도 있다.

[0254]

[표 9]

[0255]

펩티드의 변이체 및 모티프

위치	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
서열 번호 1-24	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>H</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>V</b>
									L
									A
									I
		L							
		L							L
		L							A
		L							I
		A							
		A							L
		A							A
		A							I
변이체	Y	L							
	Y	L							L
	Y	L							A
	Y	L							I
	Y	A							
	Y	A							L
	Y	A							A
	Y	A							I
	Y								
	Y								L
	Y								A
	Y								I

[0256]

[0257]

한 양태에서 더 긴 펩티드 또한 적합할 수 있다. MHC 클래스 I 에피톱은 대개 실제 에피톱임에도 불구하고 처리 동안 실제 에피톱을 노출하는데 필요한 단백질 분해에 의한 분할에 상당한 영향을 주지 못하는 잔기일 가능성이 있다.

[0258]

한 양태에서, 본 설명의 펩티드는 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산까지 연장될 수 있으며, 즉 8개 내지 11개 아미노산 길이의 모든 조합의 펩티드에서 어느 한 쪽 끝에 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산이 추가될 수 있다. 잔기들이 4:0에서 0:4 사이로 인접하는 것이 바람직하다. 본 설명에 따른 연장의 조합은 표 10에서 찾을 수 있다:

[0259]

[표 10]

[0260]

본 설명의 펩티드 연장의 조합

C-말단	N-말단
<b>4</b>	0
<b>3</b>	0 또는 1
<b>2</b>	0 또는 1 또는 2
<b>1</b>	0 또는 1 또는 2 또는 3
<b>0</b>	0 또는 1 또는 2 또는 3 또는 4
N-말단	C-말단
<b>4</b>	0
<b>3</b>	0 또는 1
<b>2</b>	0 또는 1 또는 2
<b>1</b>	0 또는 1 또는 2 또는 3
<b>0</b>	0 또는 1 또는 2 또는 3 또는 4

[0261]

연장/확장을 위한 아미노산은 해당 단백질의 원래 서열의 펩티드나 기타 모든 아미노산일 수 있다. 연장은 펩티드의 안정성이나 가용성 강화를 위해 사용될 수 있다.

- [0263] 따라서, 본 설명의 에피톱은 자연적으로 발생하는 종양 관련 또는 종양 특정 에피톱과 동일하거나 또는 실질상 동등한 항원적 활동도를 가지고 있는 한, 참조 웹티드와 비교 시 4개 이하의 다른 잔기를 가지고 있는 에피톱을 포함할 수 있다.
- [0264] 다른 구현에 있어서 웹티드는 한쪽 또는 양쪽에서 4개가 넘는 아미노산으로 연장되며, 바람직하게는 최대 30개의 아미노산 길이로 연장된다. 한 양태에서, 이 연장은 MHC 클래스 II 결합 웹티드를 유도한다. MHC 클래스 II에 대한 결합은 당업계에서 알려진 방법들로 시험할 수 있다.
- [0265] 따라서, 본 설명은 MHC 클래스 I 에피톱의 웹티드와 변이체를 제공하며 여기서 웹티드 또는 변이체는 전체 길이가 8 내지 100개이며, 바람직하게는 8 내지 30개이며, 가장 바람직하게는 8 내지 14개이며, 즉 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14개의 아미노산이다. 보다 긴 클래스 II 결합 웹티드의 경우 그 길이는 또한 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개 아미노산일 수도 있다.
- [0266] 한 양태에서, 본 설명에 따른 웹티드 또는 변이체는 인간 주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 또는 II의 분자에 결합하는 능력을 가진 것이다. 웹티드나 변이체의 MHC에 대한 결합은 당업계에서 알려진 방법에 의해 시험할 수 있다.
- [0267] 바람직하게는, 본 설명에 따른 웹티드 특이적 T 세포가 치환 웹티드에 대해 시험될 때, 치환 웹티드가 배경에 대해 상대적으로 용해의 최대 증가의 절반을 달성할 때의 웹티드 농도는 약 1 mM 이하, 바람직하게 약 1 μM 이하, 더 바람직하게는 약 1 nM 이하, 여전히 더 바람직하게는 약 100 pM 이하, 그리고 가장 바람직하게는 약 10 pM 이하이다. 치환 웹티드가 1명 이상, 최소 2명 및 더 바람직하게는 3명의 개인으로부터의 T 세포에 의해 인식되는 것 또한 바람직하다.
- [0268] 여기서 사용된 "복합체"란 용어는 (예: 항원) 결정인자에 특이적으로 결합하는 분자를 말한다. 한 구현에서, 복합체는 그것이 부착되는 객체를 (예: (제2) 항원 결합 모이어티) 표적 부위, 예를 들어 특정 유형의 종양 세포 또는 항원성 결정인자를 갖는 종양 기질(예: 현재 용도에 따른 MHC와 웹티드의 복합체)로 향하도록 지시할 수 있다. 또 다른 구현에서, 복합체는 그 표적 항원, 예를 들어 T 세포 수용체 복합체 항원을 통해 신호전달을 활성화할 수 있다. 복합체는 항체 및 그 단편, 항체 중사슬 가변 영역 및 항체 경사슬 가변 영역을 포함하는 항체의 항원 결합 도메인, 적어도 하나의 안키린 반복 모티프 및 단일 도메인 항원 결합(SDAB) 분자를 포함하는 결합 단백질, 암타미, (가용성) TCR 그리고 동종 또는 자가 T 세포와 같은 (변형된) 세포를 포함하지만 이에만 제한되지는 않는다. 분자가 표적에 결합하는 복합체인지 평가하기 위해, 결합 분석을 수행할 수 있다.
- [0269] "특이적" 결합이란 그 복합체(예: TCR)가 다른 자연적으로 발생하는 웹티드-MHC 복합체보다 관심 대상의 웹티드-MHC 복합체에 더 잘 결합하며, 그 정도는 특정 표적이 포함된을 보유하는 세포를 죽일 수 있는 활성 분자로 무장한 복합체가 특정 표적이 없고 다른 웹티드-MHC 복합체(들)를 제시하는 다른 세포는 죽일 수 없음을 의미한다. 교차반응성 웹티드-MHC의 웹티드가 자연적으로 발생하지 않는다면, 즉, 인간 HLA-펩티듬으로부터 유래되지 않는다면, 다른 웹티드-MHC 복합체에 대한 결합은 관련이 없다. 표적 세포 살해를 평가하는 검사는 당업계에 잘 알려져 있다. 이 검사는 변경되지 않는 웹티드-MHC 제시를 가진 표적 세포(일차 세포 또는 세포주) 또는 자연적으로 발생되는 웹티드-MHC 수준이 도달되는 정도로 웹티드가 포함된 세포를 사용하여 수행해야 한다.
- [0270] 각 복합체는 라벨에 의해 제공되는 신호의 존재 여부를 판단함으로써 결합된 복합체가 검출 가능하도록 제공하는 라벨링을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이 복합체는 형광 염료나 일체의 다른 해당되는 세포 마커 분자를 사용하여 가능하다. 그러한 마커 분자는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 형광 라벨링은(예를 들어 형광 염료에 의해 제공되는) 형광이나 레이저 스캐닝 현미경 또는 유세포 분석에 의해 결합된 암타미의 가시화를 제공할 수 있다.
- [0271] 각 복합체는 예를 들어, IL-21, 항-CD3, 항-CD28과 같은 제2 활성 분자와 접합될 수 있다.
- [0272] 폴리펩티드 복합체에 관한 추가 정보는, 예를 들어, WO 2014/071978A1의 배경 섹션에서 찾아볼 수 있으며, 그 전문이 참조 문헌으로 여기에 포함된다.
- [0273] "약학적 조성물"이란 의학적 환경에서 인간에게 투여하기에 적합한 조성물이다. 바람직하게, 약학적 조성물은 멸균성이며 GMP 지침에 따라 생산된다.
- [0274] 본 설명의 약학적 조성물에는 약학적으로 허용가능한 운반체 내 적어도 하나의 TCR, 가용성 TCR, 혼산 및/또는 본 설명의 TCR을 발현하는 숙주 세포 또한 포함된다.

- [0275] 본 설명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 안정화제도 포함할 수 있다.
- [0276] 이 조성물은 피하, 피부내, 근육내와 같은 비경구 투약 또는 경구 투약에 사용된다. 이를 위해 웨티드 그리고 선택적으로 다른 분자를 약학적으로 허용가능한, 바람직하게는 수용성 운반제에 용해하거나 혼탁한다. 추가로, 이 조성물은 완충제, 결합제, 발파제, 희석제, 향미료, 윤활제 등의 부형제를 포함할 수 있다. 이런 조성물에서 사용될 수 있는 부형제의 광범위한 목록은 예를 들면 다음과 같다: A. Kibbe, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*(Kibbe, 2000). 이러한 조성물은 선종성 또는 암질병의 예방, 방지 및/또는 치료에 사용될 수 있다. 예시적 제형은 예를 들어, 여기에 그 전문이 참조 문헌으로 포함된 EP2112253에서 찾아볼 수 있다.
- [0277] 본 설명의 추가적인 양태는 본 설명의 웨티드, 웨티드 변이체, TCR 및 TCR 변이체를 인코딩하는 핵산(예: 폴리뉴클레오티드)을 제공한다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이의 조합일 수 있으며, 한 가닥 및/또는 이중 사슬로 되어 있을 수 있고, 또는 본래의 형질 수도 또는 예를 들면 포스포로티오에이트 백본을 가지고 있는 폴리뉴클레오티드의 안정화된 형태로 되어 있을 수도 있으며, 웨티드를 코딩하는 한 인트론을 포함할 수도 또는 그렇지 않을 수도 있다. 물론, 자연적으로 발생하는 웨티드 결합에 의해 결합이 된 웨티드만이 폴리뉴클레오티드에 의해서 인코딩될 수 있다. 본 설명의 또 다른 양태는 본 설명에 따른 폴리웨티드를 발현할 수 있는 발현 벡터를 제공한다.
- [0278] 특히 DNA와 같은 폴리뉴클레오티드를 예를 들면 보완 응집성 말단을 이용하여 연결하는 여러 가지 방법이 개발되었다. 예를 들면, 보완 동종중합체 트랙트가 벡터 DNA에 삽입될 DNA 분절에 추가될 수 있다. 벡터와 DNA 분절은 이후 보완 동종중합체 꼬리와 함께 수소 결합을 이용하여 재조합 DNA 분자를 형성할 수 있다.
- [0279] 하나 또는 그 이상의 제한 부위를 포함하는 합성된 링커는 DNA 분절과 벡터를 결합하는 다른 방법을 제시한다. 여러 가지의 제한 엔도뉴클레아제 부위를 포함하는 합성 링커는 상업적으로 International Biotechnologies Inc.(New Haven, CN, USA)를 비롯한 곳에서 구입이 가능하다.
- [0280] 본 설명의 폴리웨티드를 인코딩하는 DNA를 변형시키는 바람직한 방법은 Saiki 등에 의해 공개된 바 있는 폴리마라아제 연쇄 반응을 이용한다(Saiki *et al.*, 1988). 이 방법은 예를 들면 적당한 제한 부위를 만들어 적당한 벡터로의 DNA 도입 또는 이 분야에서 알려져 있는 DNA를 다른 용도를 위해 변환하는 데에 사용될 수도 있다. 만약 바이러스 벡터가 사용된다면, 수두 또는 아데노바이러스 벡터가 바람직하다.
- [0281] 한 양태에서, 본 설명의 TCR을 발현하는 T 세포를 얻기 위해, 본 설명의 TCR-알파 및/또는 TCR-베타 사슬을 인코딩하는 핵산을 감마 레트로바이러스 또는 렌티바이러스와 같은 발현 벡터로 클로닝한다. 재조합 바이러스를 생성한 다음 항원 특이성 및 기능적 결합성과 같은 기능성에 대해 시험했다. 다음에는 최종 생성물의 분취물을 사용하여 표적 T 세포 모집단(일반적으로 환자 PBMC로부터 정제된)을 형질도입하며, 모집단은 환자에 주입하기 전에 팽창시킨다.
- [0282] 또 다른 양태에서, 본 설명의 TCR을 발현하는 T 세포를 얻기 위해, 당업계에서 알려진 기법(예: 시험관 내 전사 시스템)으로 TCR RNA를 합성한다. 다음에는 시험관 내에서 합성된 TCR RNA를 종양 특이적 TCR-알파 및/또는 TCR-베타 사슬의 재발현을 위하여, 전기천공에 의해 건강한 공여자로부터 얻은 일차 CD8+ T 세포 내로 도입시킨다.
- [0283] 말단 T 세포로 도입되는 TCR 사슬은 CD3 복합체와의 연관을 위해 내인성 TCR 사슬과 경쟁할 수 있으며, 이는 TCR 표면 발현에 필요하다. 표적 종양 항원을 발현하는 세포에 의한 유발에 필요한 적절한 감수성의 부여에는 높은 수준의 TCR 표면 발현이 필수적이기 때문에(Cooper *et al.*, 2000; Labrecque *et al.*, 2001), TCR-알파 및 TCR-베타 유전자 발현의 수준을 강화시키는 전략은 TCR 유전자 치료에서 중요한 고려사항이다.
- [0284] 이러한 발현을 증가시키려면, 본 설명의 TCR을 인코딩하는 핵산을 레트로바이러스 긴 말단 반복(LTR), 거대세포 바이러스(CMV), 쥐 출기세포 바이러스(MSCV) U3, 포스포글리세레이트 키나제(PGK),  $\beta$ -액틴, 유비퀴틴 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)/CD43 복합 프로모터(Cooper *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2009), 연장 인자 (EF)-1a(Tsuji *et al.*, 2005), 비장 포커스-형성 바이러스(SFFV) 프로모터(Joseph *et al.*, 2008)와 같은 강력한 프로모터에 작동하도록 연계시킬 수 있다. 바람직한 한 구현에서, 이 프로모터는 발현되고 있는 핵산에 대해 이종이다.
- [0285] 강력한 프로모터 외에도, 본 설명의 TCR 발현 카세트가 도입 유전자 발현을 강화시킬 수 있는 추가의 요소를 포함할 수 있으며, 여기에는 렌티바이러스 구축물(Follenzi *et al.*, 2000)의 핵 전위를 촉진시키는 중추 폴리펩린관(cPPT), 그리고 RNA 안정성의 증가로 도입 유전자 발현을 증가시키는 우드척 간염 바이러스 전사후 조절요소

(wPRE) (*Zufferey et al.*, 1999)가 포함된다.

- [0286] 본 발명의 TCR의 알파 및 베타 사슬은 별개의 벡터에 위치한 핵산에 의해 인코딩될 수 있거나 동일한 벡터에 위치한 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩될 수 있다.
- [0287] 높은 수준의 TCR 표면 발현을 성취하려면 도입된 TCR의 TCR-알파 및 TCR-베타 사슬이 높은 수준으로 전사되는 것이 요구된다. 이를 위해서, 본 설명의 TCR-알파 및 TCR-베타 사슬을 단일 벡터에서 바이시스트로닉 구축물로 클로닝할 수 있으며, 이는 이러한 장애를 극복할 수 있는 것으로 나타났다. TCR-알파 TCR-베타 사슬 사이의 바이러스성 내재 리보솜 진입 부위(IRES)의 사용은 두 사슬의 조율된 발현을 초래하며, 이는 TCR-알파 및 TCR-베타 사슬이 번역 도중 단일 전사체로부터 생성되어 TCR-알파 및 TCR-베타 사슬의 동등한 몰비의 생산을 보장하기 때문이다. (*Schmitt et al.* 2009).
- [0288] 본 설명의 TCR을 인코딩하는 핵산은 코돈 최적화에 의해 숙주 세균의 발현을 증가시킬 수 있다. 유전자 코드의 반복성은 하나를 초과하는 코돈에 의해 일부의 아미노산 인코딩을 허용하지만, 일부 코돈은 다른 것들보다 덜 "최적이며" 이것은 일치하는 tRNA 그리고 다른 요인들의 상대적 가용성 때문이다(*Gustafsson et al.*, 2004). 각 아미노산이 포유류 유전자 발현을 위한 최적의 코돈에 의해 인코딩되도록 TCR-알파 및 TCR-베타 유전자 서열의 변경 그리고 mRNA 불안정성이나 잠적 스플라이스 부위의 제거는 TCR-알파 및 TCR-베타 유전자 발현을 유의하게 강화시키는 것으로 나타났다(*Scholten et al.*, 2006).
- [0289] 더욱이 도입된 TCR 및 내인성 TCR 사이의 틀린 짹짓기는 자가면역성에 대해 유의한 위험을 제기하는 특이성의 획득을 초래한다. 예를 들어, 혼합된 TCR 이합체의 형성은 적절하게 짹지어진 TCR 복합체의 형성에 가용한 CD3 문자의 숫자를 감소시킬 수 있으므로, 도입된 TCR을 발현하는 세포의 기능적 결합성을 유의하게 감소시킬 수 있다(*Kuball et al.*, 2007).
- [0290] 틀린 짹짓기를 감소하려면, 사슬간 친화성의 촉진을 위한 반면 도입된 사슬의 내인성 TCR과의 짹짓기 능력의 감소를 위해 본 설명의 도입된 TCR 사슬의 C-말단 도메인을 변형시킬 수 있다. 이러한 전략에는 다음이 포함될 수 있다: 인간 TCR-알파 및 TCR-베타 C-말단 도메인을 이의 쥐과 상대물(쥐과 C-말단 도메인)과의 교체; 제2 시스틴 잔기를 도입된 TCR의 TCR-알파 및 TCR-베타 사슬로 도입하여 C-말단 도메인의 제2 사슬간 이황화 결합의 생성; TCR-사슬 및 TCR-베타 사슬의 C-말단 도메인(''knob-in-hole'')에서 상호작용하는 잔기의 교환; 그리고 TCR-알파 및 TCR-베타 사슬의 가변 도메인을 CD3 ζ에 직접 융합(CD3 ζ 융합). (*Schmitt et al.* 2009).
- [0291] DNA(또는 레트로 바이러스 벡터의 경우, RNA)는 그 후 적당한 숙주에서 발현되어 본 설명의 펩티드 또는 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 따라서, 본 설명의 펩티드 또는 변이체를 인코딩하는 DNA는 여기에 포함된 배울 수 있는 내용에 따라 적절히 수정된 알려진 기법에 의거하여 사용할 수 있으며, 이는 본 설명의 폴리펩티드의 발현과 생성을 위해 적절한 숙주 세포의 형질전환을 시키는 데에 사용된다. 이러한 기법은 예를 들어, 여기에 그 전문이 참조문헌으로 포함되어 있는 US 4,440,859, 4,530,901, 4,582,800, 4,677,063, 4,678,751, 4,704,362, 4,710,463, 4,757,006, 4,766,075 및 4,810,648에 공개되어 있다.
- [0292] 본 설명의 화합물을 구성하는 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA(또는 레트로바이러스 벡터의 경우, RNA)는 많은 종류의 다른 DNA 서열과 결합되어, 적당한 숙주로의 도입을 유도할 수 있다. 동반 DNA는 숙주의 특성, DNA를 숙주로 도입하는 방법, 및 에피소밀 유지 또는 통합이 필요한 지에 따라 결정될 것이다.
- [0293] 일반적으로, DNA는 플라스미드와 같은 발현 벡터로 발현을 위한 적합한 방향 및 올바른 리딩 프레임에 맞추어 삽입된다. 필요할 경우, DNA는 바람직한 숙주에 의해 인식되는 적당한 전사 및 번역 조절 제어 뉴클레오티드 서열(하지만, 이 제어는 대부분의 경우 발현 벡터 내에 이미 존재한다)과 함께 연결될 수도 있다. 벡터는 그 후 숙주로 기본적인 기술을 통해 도입된다. 보통, 모든 숙주가 벡터에 의해 형질전환되지 않는다. 따라서, 형질전환된 세포를 선택하는 것이 필요할 것이다. 하나의 선택 기술은 발현 벡터에 필요한 형질전환된 세포에서 선택이 가능한 예를 들면, 항생제 저항력과 같은, 제어 요소를 통합시키는 것이다.
- [0294] 다른 방법으로는, 이러한 선택이 가능한 특성이 다른 벡터에 있을 수도 있으며, 이는 바람직한 숙주 세포를 동시에 형질전환하는 데에 사용된다.
- [0295] 본 설명의 재조합 DNA에 의해 형질전환된 숙주 세포는 여기에 공개된 가르침에 따라 당업자에게 알려진 충분한 시간 동안 적당한 상태에서 배양되고 이는 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하며, 이는 후에 회복될 수 있다.
- [0296] 박테리아(예: 대장균(*E. coli*)과 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 효모(예를 들면 사카로마이세스 세례비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)), 사상균류(예를 들면 아스페르길스 스파시즈(*Aspergillus spec.*)), 식물

세포, 동물 세포 및 곤충 세포 등의 많은 발현 체계가 알려져 있다. 바람직하게는, 그 체계는 ATCC Cell Biology Collection에서 구할 수 있는 CHO 세포와 같은 포유류 세포일 수 있다.

[0297] 한 구현에서, 숙주 세포는 본 설명의 TCR을 발현하도록 조작된다. 바람직한 한 구현에서, 숙주 세포는 인간 T 세포나 T 세포 전구세포이다. 일부 구현에서, 이 T 세포나 T 세포 전구세포는 암 환자로부터 얻는다. 다른 구현에서, 이 T 세포나 T 세포 전구세포는 건강한 공여자로부터 얻는다. 본 설명의 숙주 세포는 치료할 환자에 대해 동종 또는 자가 세포이다. 한 구현에서, 숙주는 알파/베타 TCR을 발현하도록 형질전환된 감마/델타 T 세포이다.

[0298] 구조성 발현을 위한 전형적인 포유류 세포 백터 플라스미드는 CMV 또는 SV40 촉진제와 적당한 폴리 A 꼬리 및 네오마이신과 같은 저항 마커를 포함한다. 하나의 예는, Pharmacia(미국 뉴저지주 피스카타웨이)에서 구할 수 있는 pSVL이다. 유도가능 포유류 발현 백터의 예는 pMSG이며 이 또한 Pharmacia에서 구할 수 있다. 유용한 효소 플라스미드 백터는 pRS403-406과 pRS413-416이며 이는 대부분 Stratagene Cloning Systems(미국 캘리포니아주 라 졸라 92037)에서 구할 수 있다. 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406은 효소 통합 플라스미드 (YIps)이며 이는 효소 선택 마커 HIS3, TRP1, LEU2와 URA3을 통합한다. 플라스미드 pRS413-416는 효모 동원체 플라스미드(Ycps)이다. 예를 들면 Sigma-Aldrich가 제공하는 CMV 프로모터 기반 백터는 일시적인 또한 안정된 발현, 세포질 발현 또는 분비, 및 FLAG, 3xFLAG, c-myc 또는 MAT 등의 다양한 합성의 N-말단 또는 C-말단 태깅 등을 제공한다. 이러한 융합 단백질은 재조합 단백질의 검출, 정제와 분석을 가능하게 한다. 듀얼-태깅된 융합은 검출의 유연성을 제공한다.

[0299] 강한 인간 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터 조절 영역은 구성적인 단백질 발현 수준을 높기는 COS 세포에서 1mg/L까지 구동시킨다. 좀 더 효능이 약한 세포주에서는, 단백질 수준이 전형적으로 약 0.1mg/L 정도이다. SV40 복제 원점이 있음으로써 SV40 복제를 가능하게 하는 COS 세포에서 DNA 복제의 수준이 높은 결과를 낸다. CMV 백터는 예를 들면 세균 세포에서의 복제를 위한 pMB1(pBR322의 유도체) 기원, 즉, 세균, hGH polyA 및 f1 원천에서 암피실린 내성 선택에 필요한 b-락타마아제를 포함할 수 있다. 프리프로트립신(PPT) 리더 서열을 포함하는 백터는 FLAG 융합 단백질의 분비를 ANTI-FLAG 항원, 레진, 및 플레이트를 사용하여 정제하는 배지로 방향을 정할 수가 있다. 다른 백터와 발현 체계는 여러 가지의 숙주 세포 사용에 대해 널리 알려져 있다.

[0300] 다른 구현에서는 본 설명의 2개 이상 펩티드나 펩티드 변이체가 인코딩 됨으로써 연속적인 순서로 발현된다("줄로 엮은 유리알" 구조와 유사). 그렇게 함으로써 펩티드나 펩티드 변이체는 예를 들어 LLLLLL과 같은 링커 아미노산의 퍼짐에 의해 함께 연결 또는 융합될 수 있으며 또한 그 사이에 추가의 펩티드(들) 없이 연결될 수 있다. 이러한 구조물은 암 요법에도 사용에 가용하며, MHC I 및 MHC II를 모두 관여시키는 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0301] 본 설명은 또한 본 설명의 폴리뉴클레오티드 백터 구축물에 의해 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 원핵 세포이거나 진핵 세포일 수 있다. 세균 세포가 일부의 상황에서 바람직한 원핵 숙주 세포일 수 있으며, 보통 예를 들면 Bethesda Research Laboratories Inc.(미국 메릴랜드주 베테스다)에서 구할 수 있는 *E. coli* 균주 DH5, 그리고 American Type Culture Collection(ATCC)(미국 메릴랜드주 록빌, No ATCC 31343)의 RR1과 같은 *E. coli* 균주이다. 바람직한 진핵 숙주 세포는 효모, 곤충, 포유류 세포를 포함하고, 생쥐, 쥐, 원숭이 또는 인간 섬유아세포와 대장 세포주 등의 척추 동물 세포가 바람직하다. 효모 숙주 세포는 YPH499, YPH500 및 YPH501를 포함하며, 이는 대부분 Stratagene Cloning Systems(미국 캘리포니아주 라 졸라, 92037)에서 구입이 가능하다. 바람직한 포유류 숙주 세포는 ATCC에서 구입이 가능한 CCL61로 알려져 있는 중국 햄스터 난소 세포, ATCC에서 CRL 1658로 알려져 있는 스위스 생쥐 배아 세포 NIH/3T3, ATCC에서 CRL 1650 세포로 알려져 있는 원숭이 신장-유도 COS-1 세포와 293 세포로 알려져 있는 인간 배아 신장 세포를 들 수 있다. 바람직한 곤충 세포는 Sf9 세포이며 이는 배콜로바이러스 발현 백터에 의해 세포로 형질주입될 수 있다. 발현을 위한 적당한 숙주 세포의 선택에 대한 개관은 예를 들면 Paulina Balbas and Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9 및 당해 분야의 숙련자에게 공지된 문헌에서 찾을 수 있다.

[0302] 적당한 세포 숙주를 본 설명의 DNA 구축물로 형질전환하는 것은 보통 사용되는 백터의 유형에 따라 결정되는 잘 알려진 방법으로 성취된다. 원핵 숙주 세포의 형질전환에 대해서는 예를 들면 Cohen 등(Cohen *et al.*, 1972) 그리고 (Green and Sambrook, 2012)를 찾고 있다. 효모 세포의 형질 전환은 Sherman 등에 나와있다(Sherman *et al.*, 1986). Beggs의 방법 또한 유용하다(Beggs, 1978). 척추 동물 세포에 대해서는, 이러한 세포의 형질주입에 유용한 시약, 예를 들면 칼슘 인산염과 DEAE-덱스트란 또는 리포좀 공식에 대한 내용은 Stratagene Cloning Systems, 또는 Life Technologies Inc.(미국 메릴랜드주 게이더스버그 20877)에 나와 있다. 전기 천공법 역시

형질전환 또는/및 세포를 형질주입하는 데에 유용하며 이는 효모 세포, 박테리아 세포, 곤충 세포 및 척추동물 세포의 형질전환에 잘 알려져 있다.

- [0303] 성공적으로 형질전환이 된 세포는, 즉 본 설명의 DNA 구축물을 가지고 있는 세포는, 잘 알려진 PCR과 같은 기술로 식별이 가능하다. 다른 방법으로는, 상청액에 존재하는 단백질은 항생제를 사용함으로써 검출될 수 있다.
- [0304] 본 설명의 특정한 숙주 세포, 예를 들면 세균, 효모 및 곤충 세포와 같은 세포는 본 설명의 웨티드의 제조에 유용하다는 것을 알 수 있을 것이다. 하지만, 다른 숙주 세포 또한 특정한 치료 방법에 유용할 수도 있다. 예를 들면, 수지상 세포와 같은 항원 제시 세포는 적당한 MHC 분자에 로딩이 되도록 하는 본 설명의 웨티드를 발현하는 데 유용하게 사용될 수 있다. 따라서, 본 설명은 설명에 따른 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0305] 바람직한 구현에서, 숙주 세포는 항원 제시 세포이며, 특히 수지상 세포 또는 항원 제시 세포이다. 전립선암 인산효소(PAP)를 포함하는 재조합 융합 단백질로써 적재된 APC가 무증상이나 최소 증상의 전이성 HRPC(Sipuleucel-T)의 치료를 위해 2010년 4월 29일 미국 식품의약품청(FDA)에 의해 승인되었다(Rini *et al.*, 2006; Small *et al.*, 2006).
- [0306] 본 설명의 다른 양태는 숙주 세포를 배양하고 웨티드를 숙주 세포 또는 배지에서 분리하는 것을 포함하는 웨티드 또는 그의 변이체의 생산 방법을 제공한다.
- [0307] TCR 단백질의 또 다른 구현에 있어서, 본 설명의 핵산이나 발현 벡터는 의학에서 사용된다. 예를 들어, 웨티드나 그 변이체는 정맥내(i.v.) 주사, 피하(s.c.) 주사, 피내(i.d.) 주사, 복강내(i.p.) 주사, 근육내(i.m.) 주사를 위해 준비할 수 있다. 웨티드 투여의 바람직한 방법은 s.c., i.d., i.p., i.m. 및 i.v. 주사를 포함한다. DNA 투여의 바람직한 방법은 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v. 주사를 포함한다. 웨티드 또는 DNA의 예를 들면 50 µg 내지 1.5 mg, 바람직하게는 125 µg 내지 500 µg의 용량이 각각의 웨티드 또는 DNA에 따라서 투여될 수 있다. 이러한 범위의 용량이 이전의 임상실험에서 성공적으로 사용된 바 있다(Walter *et al.*, 2012).
- [0308] 활성 백신 접종에 사용되는 폴리뉴클레오티드는 상당히 순도가 높을 수 있고, 또는 적당한 벡터 또는 전달 체계에 포함되어 있을 수 있다. 핵산은 DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA 또는 이들의 조합일 수 있다. 이러한 핵산을 설계하고 도입하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 그 개요는 예를 들어, Teufel 등에 의해 제공된다(Teufel *et al.*, 2005). 폴리뉴클레오티드 백신은 만들기가 쉽지만, 이들 벡터의 면역 반응을 유도하는 동작 모드는 완전히 이해가 되지 않았다. 적당한 벡터와 전달 체계는 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스, 아데노-결합 바이러스 또는 한 개 또는 그 이상의 바이러스를 포함하는 혼성체 등의 바이러스 DNA 및/또는 RNA를 포함한다. 비-바이러스 전달 체계는 양이온 지질과 양이온 중합체를 포함하고 이는 DNA 전달 분야에서 잘 알려져 있다. "유전자 총"과 같은 물리적 전달 또한 사용될 수 있다. 웨티드 또는 핵산에 의해 인코딩 된 웨티드는 융합 단백질이 될 수도 있고, 예로서는 위에서 언급한 각각의 반대 CDR을 위한 T 세포를 자극하는 애피톱을 들 수 있다.
- [0309] 본 설명은 또한 암타머에 관한 것이다. 암타머(예를 들어 참조문헌에 그 전문이 포함된 WO 2014/191359 및 여기에 인용된 문헌을 참조)란 정의된 삼차원적 구조로 접힐 수 있으며 특정 표적 구조를 인식할 수 있는 짧은 단일 가닥 핵산 분자이다. 이것은 표적 요법의 개발에 필요한 적합한 대안인 것으로 보여진 바 있다. 암타머는 높은 친화도 및 특이성으로 다양한 복합체 표적에 선택적으로 결합하는 것으로 나타난 바 있다.
- [0310] 세포 표면에 위치한 분자를 인식하는 암타머들이 지난 십 년 동안 식별되었으며 진단 및 치료 접근 방식을 개발하기 위한 수단을 제공한다. 암타머가 독성 및 면역원성을 거의 보유하지 않는 것으로 나타났으므로, 생의학적 용도를 위한 유력한 후보이다. 실제로 암타머, 예를 들어 전립선 특이적 막-항원을 인식하는 암타머는 표적 대상의 요법을 위해 성공적으로 사용되어 왔으며 또한 생체 내 모델에서의 이종이식에 기능적인 것으로 나타난 바 있다. 더욱이, 특이적 종양 세포주를 인식하는 암타머가 식별된 바 있다.
- [0311] DNA 암타머는 다양한 암 세포 그리고 특히 고형 종양으로부터 유래하는 것들을 위한 광범위 인식 성질을 밝히기 위해 선택 가능한 반면에, 비종양형성의 그리고 원발성의 건강한 세포는 인식되지 않는다. 식별된 암타머가 특이적 종양 아형을 인식할 뿐만 아니라 일련의 종양과 상호작용한다면, 이로 인해 암타머는 소위 광범위 진단 및 치료에 적용될 수 있다.
- [0312] 더욱이, 유세포 분석을 사용한 세포 결합 거동의 조사에 의하면 암타머는 나노볼 범위에서 매우 양호하고 뚜렷한 친화성을 드러내는 것으로 나타났다.

- [0313] 암타머는 진단 및 치료 목적으로 유용하다. 한 양태에서, 적어도 하나 이상의 암타머를 종양 세포가 취하며 그리하여 종양 세포 안으로의 siRNA와 같은 항암제의 표적 인도를 위한 분자 부형제로서 기능이 가능할 수 있다.
- [0314] 암타머는 세포와 조직 그리고 바람직하게는 현재 본 설명에 따른 서열 식별 번호 25 내지 서열 식별 번호 26의 어떤 것에 따른 서열로 구성되며 이를 포함하는 웹티드나 TCR과 MHC 분자와의 복합체에 대하여, 세포 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 기법을 사용하여 선택이 가능하다.
- [0315] 한 구현에서, 본 설명은 여기서 기술된 대로 TCR의 생산 방법을 제공하며, 이 방법은 TCR의 발현 촉진에 적합한 조건 하에서 TCR을 발현시킬 수 있는 숙주 세포의 배양을 포함한다.
- [0316] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 TCR의 식별 및 분리 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 HLA-A\*02 음성의 건강한 공여자로부터의 PBMC를 A2/MAG-003 단량체와 함께 배양, PBMC를 사합체-피코에리트린(PE)으로 배양 그리고 형광 활성화 세포 분류(FACS)-캘리버 분석에 의한 고결합성 T 세포의 분리를 포함한다.
- [0317] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 TCR의 식별 및 분리 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 HLA-A\*02 음성의 건강한 공여자로부터의 PBMC를 A2/p286-1Y2L 단량체와 함께 배양, PBMC를 사합체-피코에리트린(PE)으로 배양 그리고 형광 활성화 세포 분류(FACS)-캘리버 분석에 의한 고결합성 T 세포의 분리를 포함한다.
- [0318] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 TCR의 식별 및 분리 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 HLA-A\*02 음성의 건강한 공여자로부터의 PBMC를 A2/p286-1Y2L9L 단량체와 함께 배양, PBMC를 사합체-피코에리트린(PE)으로 배양 그리고 형광 활성화 세포 분류(FACS)-캘리버 분석에 의한 고결합성 T 세포의 분리를 포함한다.
- [0319] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 TCR의 식별 및 분리 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 T 세포가 마우스 TCR 결핍을 보상하는 방대한 TCR 레퍼토리를 발현하는 전체 인간 TCR  $\alpha\beta$  유전자 자리(1.1 및 0.7 Mb)를 이용한 유전자이전 마우스의 획득, MAG-003에 의한 마우스의 면역접종, 유전자전이 마우스로부터 얻어진 PBMC의 사합체-피코에리트린(PE)으로 배양, 그리고 형광 활성화 세포 분류(FACS)-캘리버 분석에 의한 고결합성 T 세포의 분리를 포함한다.
- [0320] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 TCR의 식별 및 분리 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 T 세포가 마우스 TCR 결핍을 보상하는 방대한 TCR 레퍼토리를 발현하는 전체 인간 TCR  $\alpha\beta$  유전자 자리(1.1 및 0.7 Mb)를 이용한 유전자이전 마우스의 획득, p286-1Y2L에 의한 마우스의 면역접종, 유전자전이 마우스로부터 얻어진 PBMC의 사합체-피코에리트린(PE)으로 배양, 그리고 형광 활성화 세포 분류(FACS)-캘리버 분석에 의한 고결합성 T 세포의 분리를 포함한다.
- [0321] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 TCR의 식별 및 분리 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 T 세포가 마우스 TCR 결핍을 보상하는 방대한 TCR 레퍼토리를 발현하는 전체 인간 TCR  $\alpha\beta$  유전자 자리(1.1 및 0.7 Mb)를 이용한 유전자이전 마우스의 획득, p286-1Y2L9L에 의한 마우스의 면역접종, 유전자전이 마우스로부터 얻어진 PBMC의 사합체-피코에리트린(PE)으로 배양, 그리고 형광 활성화 세포 분류(FACS)-캘리버 분석에 의한 고결합성 T 세포의 분리를 포함한다.
- [0322] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 방법에 관한 것으로, T 세포가 본 설명에 따른 A TCR을 발현할 수 있는 발현 벡터를 포함한다.
- [0323] 본 설명은 또한 표적 세포가 MAG-003을 이상 발현하는 환자에서 표적 세포를 살해하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 설명에 따른 효과적인 수자의 TCR, 가용성 TCR 및/또는 T 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0324] 본 설명은 또한 약제로서 또는 약제의 제조에서, 설명된 일체의 TCR, 본 설명에 따른 핵산, 본 설명에 따른 발현 벡터, 본 설명에 따른 세포, 또는 본 설명에 따른 활성화 세포독성 T 림프구의 사용에 관한 것이다. 본 설명은 또한 본 설명에 따른 사용에 관한 것으로 상기 약제가 암에 대해 활성을 갖는다.
- [0325] 본 설명은 또한 본 설명에 따른 사용에 관한 것으로, 상기 암 세포는 비소세포 폐암 세포 또는 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포암, 뇌암, 위암, 결장직장암, 간세포암, 혀장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암 및 식도암 등의 기타 고형 또는 혈액학적 종양 세포이다.
- [0326] 본 설명은 또한 암 세포와 본 설명의 숙주 세포와의 접촉을 포함하는 암 세포의 살해 방법에 관한 것이다. 한 구현에서, 숙주 세포가 본 설명의 TCR을 발현한다. 한 구현에서, 숙주 세포가 T 세포나 T 세포 전구세포이다.

한 구현에서, 바람직한 한 구현에서, 상기 암 세포는 비소세포 폐암 세포 또는 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포암, 뇌암, 위암, 결장직장암, 간세포암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암, 그리고 식도암 등의 기타 고형 또는 혈액학적 종양 세포에서 선택된다. 일부 구현에서, TCR은 활성 치료제에 접합한다. 특정 구현에서 활성 치료제는 방사선핵종, 화학요법제 및 독소로 구성된 군에서 선택된다.

[0327] 본 발명은 또한 본 발명의 숙주 세포를 필요로 하는 시험대상자에게 이를 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법에 관한 것이다. 한 구현에서, 숙주 세포가 본 설명의 TCR을 발현한다. 한 구현에서, 숙주 세포가 T 세포나 T 세포 전구세포이다. 한 구현에서, 숙주 세포가 치료할 시험대상자에 대해 자가 세포이다. 또 다른 구현에서 숙주 세포가 치료할 시험대상자에 대해 동종 세포이다. 바람직한 한 구현에서, 상기 암 세포는 비소세포 폐암 세포 또는 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포암, 뇌암, 위암, 결장직장암, 간세포암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암 그리고 식도암 등의 기타 고형 또는 혈액학적 종양 세포에서 선택된다.

[0328] 일부 구현에서, TCR은 활성 치료제에 접합한다. 여기서 사용된 용어 "활성 치료제"는 질병이나 바람직하지 않은 의학적 상태의 치료나 예방에 사용되는 화합물을 의미한다. 한 구현에서, 활성 치료제는 암의 치료나 예방에 사용된다. 특정 구현에서 활성 치료제는 방사선핵종, 화학요법제 및 독소로 구성된 군에서 선택된다.

[0329] 본 설명의 TCR, 핵산 및 숙주 세포 그리고 그 약학적 조성물은 당업계에서 알려진 경로로 이를 필요로 하는 시험대상자에게 투여할 수 있으며, 또한 치료할 암의 유형에 따라 다를 수 있다. 투여 경로에는 예를 들어 국소 투여(종양내와 같은) 그리고 피하, 복강내, 근육내, 정맥내, 환경내 및 간내와 같은 비경구 투여가 포함된다. 바람직한 한 구현에서, 본 설명의 TCR, 핵산 또는 숙주 세포 또는 그 약학적 조성물은 국소 주입에 의해 시험대상자에게 투여되며, 예를 들어 고형 종양과 같은 치료할 부위에 대한 주입 펌프 및/또는 카테터 시스템의 사용이다. 한 구현에서, 본 설명의 조성물이 고형 종양, 고형 종양에 영양을 공급하는 혈관 및/또는 고형 종양을 둘러싼 영역으로 주입된다.

[0330] 바람직한 구현에서, 본 설명의 조성물이 적어도 24시간 간격으로 적어도 2회 투여하는 투여 요법을 사용하여 시험대상자에게 투여된다. 본 설명의 조성물 투여에 적합한 투여 요법에는 예를 들어 1일 1회, 2일 1회 및 3일 1회가 포함된다. 더 바람직한 투여 요법에는 1주 1회, 1주 2회, 2주 1회, 월 1회 및 월 2회가 포함된다. 특별한 구현에서, 용량 상승 요법이 사용되며 여기서 일련의 증가하는 용량이 수일, 수주 또는 수개월의 기간에 걸쳐 시험대상자에게 투여된다.

[0331] 본 발명의 TCR을 발현하는 효과적인 용량의 숙주 세포에는, 예를 들어 용량당 숙주 세포가 적어도 약  $10^4$  개, 적어도 약  $10^5$  개, 적어도 약  $10^6$  개, 적어도 약  $10^7$  개, 적어도 약  $10^8$  개, 적어도 약  $10^9$  개, 적어도 약  $10^{10}$  개가 포함된다. 한 구현에서, 본 설명의 숙주 세포는 용량 당 약  $10^4$  개 내지 약  $10^{10}$  개 세포의 용량으로, 바람직하게는 용량당 약  $10^5$  개 내지  $10^9$  개 세포의 용량으로 투여된다. 바람직한 구현에서는, 용량이 적어도 2회 이상의 투여 주기의 기간에 걸친 투여 요법으로 투여된다.

[0332] 본 발명은 또한 본 설명의 TCR, 핵산 또는 숙주 세포와 적어도 하나의 화학 요법제 및/또는 방사선 요법과 병용하는 투여를 포함하는 암 치료의 방법에 관한 것이다.

[0333] 또한 다음의 방법을 포함하는 암 치료를 필요로 하는 시험대상자에서 암 치료의 방법이 제공된다.

[0334] a) 상기 시험대상자로부터 세포의 분리,

[0335] b) 형질 전환된 세포의 생산을 위해 본 설명의 TCR을 인코딩하는 적어도 하나의 벡터를 갖는 세포의 형질전환,

[0336] c) 복수의 형질전환된 세포의 생산을 위해 형질전환된 세포의 팽창, 및

[0337] d) 복수의 형질전환된 세포를 상기 시험대상자에게 투여.

[0338] 또한 다음의 방법을 포함하는 암 치료를 필요로 하는 시험대상자에서 암 치료의 방법이 제공된다.

[0339] a) 건강한 공여자로부터 세포의 분리,

[0340] b) 형질전환된 세포의 생산을 위해 본 설명의 TCR을 인코딩하는 벡터로 세포의 형질전환,

[0341] c) 복수의 형질전환된 세포의 생산을 위해 형질전환된 세포의 팽창, 및

- [0342] d) 복수의 형질전환된 세포를 상기 시험대상자에게 투여.
- [0343] 또한 다음을 포함하는 생물학적 샘플에서의 암 검출의 방법이 제공된다.
- [0344] a) 생물학적 샘플을 본 설명의 TCR과 접촉,
- [0345] b) TCR과 생물학적 샘플과의 결합의 검출을 포함하는 방법.
- [0346] 일부 구현에서 암의 검출 방법은 시험관 내, 생체 내 또는 제자리에서 실행된다.
- [0347] 본 설명은 또한 비소세포 폐암의 진단 및/또는 예후에 사용될 수 있는 여기서 "표적"이라 부르는, 본 설명에 따른 웹티드에 근거하는 특정 마커 단백질 및 바이오마커에 관한 것이다. 본 설명은 또한 암 치료를 위한 이러한 신규 표적의 사용에 관한 것이다.
- [0348] 본 설명의 추가적인 양태는 특이적 웹티드-MHC 복합체를 인식하는 가용성 T 세포 수용체(sTCR)의 생산 방법을 제공하는 것이다. 이러한 가용성 T 세포 수용체는 특이적 T 세포 클론으로부터 생성 가능하며, 그 친화력은 보완결정 부위를 표적으로 하는 돌연변이유발성에 의해 증가시킬 수 있다. T 세포 수용체 선택의 목적 상, 파지 디스플레이를 사용할 수 있다(US 2010/0113300, (Liddy *et al.*, 2012)). 파지 디스플레이 동안 T 세포 수용체의 안정화 목적 상 그리고 약물로서의 실용적인 용도의 경우, 알파 및 베타 사슬은 연계될 수 있으며, 예를 들어, 비정상적 이황화 결합, 기타 공유 결합(단일 사슬 T 세포 수용체) 또는 이합체화 도메인에 의해 연결된다 (Boulter *et al.*, 2003; Card *et al.*, 2004; Willcox *et al.*, 1999). T 세포 수용체는 표적 세포에 대한 특정 기능의 실행을 목적으로 독소, 약물, 사이토킨(예를 들어, US 2013/0115191 참고), 항-CD3 도메인과 같은 작용기 세포를 모집하는 도메인 등과 연결될 수 있다. 또 다른 양태에서, 이것은 입양 이전에 사용되는 T 세포에서 발현된다. 예를 들어, WO 2004/033685A1, WO 2004/074322A1 및 WO 2013/057586A1을 참고하며, 그 내용은 전문이 참조문헌에 포함되어 있다.
- [0349] 그 밖에, 본 설명의 웹티드 및/또는 TCR 또는 항체 또는 다른 결합하는 분자는 생검 샘플에 근거한 병리학자의 암 진단을 확인하는 데 사용이 가능하다.
- [0350] 항체 또는 TCR은 생체 내의 진단 분석에 사용될 수도 있다. 일반적으로, 항체나 TCR은 방사성핵종으로 라벨링을 하여(예: <sup>111</sup>In, <sup>99</sup>Tc, <sup>14</sup>C, <sup>131</sup>I, <sup>3</sup>H, <sup>32</sup>P 또는 <sup>35</sup>S) 면역섬광계수법(immunoscintigraphy)을 사용하여 종양의 위치가 결정될 수 있다. 한 구현에서는, 항체 또는 그 단편은 위에 언급된 언급된 단백질로 구성된 군으로부터 선택한 두 개 또는 그 이상의 단백질 표적의 세포외 도메인에 결합을 하고 친화도 값(Kd)은  $1 \times 10 \mu\text{M}$  미만이다.
- [0351] 진단의 용도로 사용되는 항체나 TCR은 여러 가지의 영상 방법을 사용하여 검출에 적당한 프로브로 라벨링을 할 수 있다. 프로브의 검출 방법은 형광, 광학, 공초점 및 전자 현미경, 자기 공명 단층 촬영 영상 및 분광기 형광 투시법, 전산화 단층 촬영과 양전자 방사 단층 촬영법을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 적당한 프로브는 플루오레세인, 로다민, 에오신과 다른 형광체, 방사성 동위 원소, 금, 가돌리늄과 다른 란탄계열 원소, 상자성체의 이온, 플루오르-18 및 다른 양전자 방출 방사성 핵종 등을 포함하지만, 이에 국한되지 않는다. 또한, 프로브는 두개의 또는 그 이상의 기능을 가지고 있을 수 있으며, 여기에 나열된 하나 이상의 방법으로 검출할 수 있다. 이러한 항체 및/또는 TCR은 직접적으로 또는 간접적으로 여기에 나열된 프로브로 라벨링할 수 있다. 항체 및/또는 TCR에 프로브를 부착하는 방법에는 이 분야에서 잘 알려진 것들 중에 프로브의 공유결합 연결, 항체나 TCR로 편입 및 프로브의 결합을 위한 킬레이트 화합물의 공유결합 연결 등을 들 수 있다. 면역조직 화학을 위해서, 질병 조직 샘플은 신선하거나 냉동되었거나 또는 파라핀에 포매되어 포르말린과 같은 방부제로 고정되어 있을 수 있다. 고정되었거나 포매되어 있는 샘플을 포함하고 있는 조직 절편은 라벨링된 1차 항체 및 2차 항체와 접촉되며 여기서 항체는 제자리 단백질 발현의 검출에 사용된다.
- [0352] 본 발명은 또한 다음 항목에 관한 것이다.
- [0353] 항목 1. 알파 사슬 및 베타 사슬을 포함하는 TCR에서 알파 사슬은 서열 식별 번호 39, 서열 식별 번호 55 및 서열 식별 번호 71 중 어느 것의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일한 TCR 알파 가변 도메인을 포함하며, 또한 베타 사슬은 서열 식별 번호 47, 서열 식별 번호 63 및 서열 식별 번호 79의 어느 것에 대해 적어도 90% 동일한 TCR 베타 가변 도메인을 포함하며, TCR은 MAG-003 웹티드-MHC 문자 복합체에 특이적으로 결합하는 TCR.
- [0354] 항목 2. 항목 1의 TCR은 TCR 알파 불변 도메인 및 TCR 베타 불변 도메인을 추가로 포함하며, TCR 알파 불변 도메인은 서열 식별 번호 39, 서열 식별 번호 55 및 서열 식별 번호 71의 어느 것의 TCR 알파 불변 도메인에 대해 적어도 70% 동일하며, 베타 불변 도메인은 서열 식별 번호 47, 서열 식별 번호 63 및 서열 식별 번호 79의 어느

것의 TCR 베타 불변 도메인에 대해 적어도 70% 동일한 TCR.

- [0355] 항목 3. 항목 1 또는 2의 TCR에서, 알파 불변 도메인은 알파 막횡단 도메인 VIGFRILLLKVAGFNLLMTL(서열 식별 번호 97)을 포함하며, 베타 불변 도메인은 베타 막횡단 도메인 TILYEILLGKATLYAVLVSALVL(서열 식별 번호 88)을 포함하는 TCR.
- [0356] 항목 4. 항목 1 내지 3의 어느 TCR에 있어서, TCR 알파 가변 도메인이 서열 식별 번호 39의 아미노산 서열로 구성되며, TCR 베타 가변 도메인이 서열 식별 번호 47의 아미노산 서열로 구성되는 TCR.
- [0357] 항목 5. 항목 1 내지 3의 어느 TCR에 있어서, TCR 알파 가변 도메인이 서열 식별 번호 55의 아미노산 서열로 구성되며, TCR 베타 가변 도메인이 서열 식별 번호 63의 아미노산 서열로 구성되는 TCR.
- [0358] 항목 6. 항목 1 내지 3의 어느 TCR에 있어서, TCR 알파 가변 도메인이 서열 식별 번호 71의 아미노산 서열로 구성되며, TCR 베타 가변 도메인이 서열 식별 번호 79의 아미노산 서열로 구성되는 TCR.
- [0359] 항목 7. 항목 1 내지 6의 어느 TCR에 있어서, TCR 알파 불변 도메인은 서열 식별 번호 39의 TCR 알파 불변 도메인으로 구성되며, TCR 베타 불변 도메인은 서열 식별 번호 47의 TCR 베타 불변 도메인으로 구성되는 TCR.
- [0360] 항목 8. 항목 1 내지 6의 어느 TCR에 있어서, TCR 알파 불변 도메인은 서열 식별 번호 55의 TCR 알파 불변 도메인으로 구성되며, TCR 베타 불변 도메인은 서열 식별 번호 63의 TCR 베타 불변 도메인으로 구성되는 TCR.
- [0361] 항목 9. 항목 1 내지 6의 어느 TCR에 있어서, TCR 알파 불변 도메인은 서열 식별 번호 71의 TCR 알파 불변 도메인으로 구성되며, TCR 베타 불변 도메인은 서열 식별 번호 79의 TCR 베타 불변 도메인으로 구성되는 TCR.
- [0362] 항목 10. 항목 1 내지 9의 어느 TCR에 있어서, 서열 식별 번호 39로 구성되는 알파 사슬 및 서열 식별 번호 47로 구성되는 베타 사슬을 포함하는 TCR.
- [0363] 항목 11. 항목 1 내지 9의 어느 TCR에 있어서, 서열 식별 번호 55로 구성되는 알파 사슬 및 서열 식별 번호 63로 구성되는 베타 사슬을 포함하는 TCR.
- [0364] 항목 12. 항목 1 내지 9의 어느 TCR에 있어서, 서열 식별 번호 71로 구성되는 알파 사슬 및 서열 식별 번호 79로 구성되는 베타 사슬을 포함하는 TCR.
- [0365] 항목 13. 항목 1 내지 12의 어느 TCR에 있어서, TCR 알파 사슬이 서열 식별 번호 39, 서열 식별 번호 55 및 서열 식별 번호 71의 알파 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 알파 사슬 상보 결정 영역(CDR)을 포함하며, 및/또는 TCR 베타 사슬이 서열 식별 번호 47, 서열 식별 번호 63 및 서열 식별 번호 79의 베타 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 베타 사슬 상보 결정 영역(CDR)을 포함하는 TCR.
- [0366] 항목 14. 항목 1 내지 13의 어느 TCR에 있어서, TCR 알파 사슬이 서열 식별 번호 39, 서열 식별 번호 55 또는 서열 식별 번호 71의 세 CDR을 모두 포함하는 TCR.
- [0367] 항목 15. 항목 1 내지 13의 어느 TCR에 있어서, TCR 베타 사슬이 서열 식별 번호 47, 서열 식별 번호 63 또는 서열 식별 번호 79의 세 CDR을 모두 포함하는 TCR.
- [0368] 항목 16. 항목 1 내지 15의 어느 TCR에 있어서, 알파 사슬과 베타 사슬이 융합하여 단일 사슬 TCR을 형성하는 TCR.
- [0369] 항목 17. 항목 1 내지 16의 어느 TCR에 있어서, 알파 및/또는 베타 사슬이 겸출가능한 라벨을 포함하는 TCR.
- [0370] 항목 18. 항목 17의 TCR에 있어서, 겸출가능한 라벨이 방사능핵종, 형광단 및 비오틴으로 구성되는 군으로부터 선택되는 TCR.
- [0371] 항목 19. 항목 1 내지 18의 어느 TCR에 있어서, 알파 및/또는 베타 사슬이 활성 치료제로 접합되는 TCR.
- [0372] 항목 20. 항목 19의 TCR에 있어서, 활성 치료제가 방사선핵종, 화학요법제 및 독소로 구성되는 군으로부터 선택되는 TCR.
- [0373] 항목 21. 감마 사슬 및 델타 사슬을 포함하는 TCR에 있어서, 감마 사슬이 서열 식별 번호 39, 서열 식별 번호 55 및 서열 식별 번호 71의 알파 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 상보 결정 영역(CDR)을 포함하며, 및/또는 TCR 델타 사슬이 서열 식별 번호 47, 서열 식별 번호 63 및 서열 식별 번호 79의 베타 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 상보 결정 영역(CDR)을 포함하는 TCR.

(CDR)을 포함하며, 그 TCR이 MAG-003 웨티드-MHC 분자 복합체에 특이적으로 결합하는 TCR.

[0374] 항목 22. 항목 1 내지 21의 어느 TCR에 있어서 그 TCR이 MAG-003 웨티드-MHC 분자 복합체에 특이적으로 결합하며, MAG-003 웨티드가 서열 식별 번호 1-24로 구성된 군으로부터 선택되며, MHC 분자가 HLA 클래스 I 또는 HLA 클래스 II 분자인 TCR.

[0375] 항목 23. 항목 1 내지 20의 어느 TCR의 알파 사슬 및/또는 베타 사슬 또는 항목 21의 TCR의 감마 사슬 및/또는 델타 사슬을 인코딩하는 핵산.

[0376] 항목 24. 적어도 하나의 프로모터 서열에 작동 가능하게 연계되는 항목 23의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

[0377] 항목 25. 항목 24의 발현 벡터로 형질전환되는 숙주 세포.

[0378] 항목 26. T 세포나 T 세포 전구세포인 항목 25의 숙주 세포.

[0379] 항목 27. 항목 26의 숙주 세포에 있어서, T 세포나 T 세포 전구세포가 암 환자로부터 얻어지는 숙주 세포.

[0380] 항목 28. 항목 26의 숙주 세포에 있어서, T 세포나 T 세포 전구세포가 건강한 공여자로부터 얻어지는 숙주 세포.

[0381] 항목 29. 항목 1 내지 22의 어느 TCR, 항목 23의 핵산, 항목 24의 발현 벡터 및/또는 항목 25에서 28의 어느 하나의 숙주 세포, 그리고 약학적으로 허용가능한 담체 및 선택적으로 약학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 안정화제를 포함하는 약학적 조성물.

[0382] 항목 30. MHC 분자에 의해 제시될 때 서열 식별 번호 1의 웨티드에 특이적으로 결합하는 TCR의 생산 방법에 있어서, 상기 방법이 항목 25 내지 28의 어느 하나의 숙주 세포를 TCR 발현의 촉진에 적절한 조건하에서의 배양을 포함하는 방법.

[0383] 항목 31. 항목 1 내지 22의 어느 TCR, 항목 23의 핵산, 항목 24의 발현 벡터, 항목 25에서 28의 어느 하나의 숙주 세포 및/또는 항목 29의 약학적 조성물을 암 치료를 필요로 하는 시험대상자에 대한 투여를 포함하는 암 치료의 방법.

[0384] 항목 32. 항목 31의 방법에 있어서, TCR이 숙주 세포 표면 상에 발현되는 방법.

[0385] 항목 33. 항목 31의 방법에 있어서, 숙주 세포가 T 세포나 T 세포 전구세포로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

[0386] 항목 34. 항목 33의 방법에 있어서, T 세포나 T 세포 전구세포가 자가세포인 방법.

[0387] 항목 35. 항목 33의 방법에 있어서, T 세포나 T 세포 전구세포가 동종인 방법.

[0388] 항목 36. 항목 31의 방법에 있어서, TCR이 활성 치료제에 접합되는 방법.

[0389] 항목 37. 항목 36의 방법에 있어서, 활성 치료제가 방사선핵종, 화학요법제 및 독소로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

[0390] 항목 38. 항목 31 내지 37의 어느 하나의 방법에 있어서, 암이 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포암, 뇌암, 위암, 결장직장암, 간세포 암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암, 식도암 또는 이들의 조합인 방법.

[0391] 항목 39. 항목 31 내지 38의 어느 방법에 있어서 적어도 하나의 화학요법제의 시험자에 대한 투여를 추가로 포함하는 방법.

[0392] 항목 40. 항목 31 내지 39의 어느 방법에 있어서, 방사선 요법의 시험자에 대한 투여를 추가로 포함하는 방법.

[0393] 항목 41. 암 치료를 필요로 하는 시험대상자에서 암 치료의 방법에 있어서,

[0394] a) 상기 시험대상자로부터 세포의 분리,

[0395] b) 형질전환된 세포의 생산을 위해 항목 1 내지 22의 어느 TCR을 인코딩하는 벡터로 세포의 형질전환,

[0396] c) 복수의 형질전환된 세포의 생산을 위해 형질전환된 세포의 팽창, 및

[0397] d) 복수의 형질전환된 세포를 상기 시험대상자에게 투여.

- [0398] 항목 42. 항목 41의 방법에 있어서, 그 세포가 T 세포나 T 세포 전구세포로부터 선택되는 방법.
- [0399] 항목 43. 암 치료를 필요로 하는 시험대상자에서 암 치료의 방법에 있어서,
- [0400] a) 건강한 공여자로부터 세포의 분리,
- [0401] b) 형질전환된 세포의 생산을 위해 항목 1 내지 22의 어느 TCR을 인코딩하는 벡터로 세포의 형질전환,
- [0402] c) 복수의 형질전환된 세포의 생산을 위해 형질전환된 세포의 팽창, 및
- [0403] d) 복수의 형질전환된 세포의 상기 시험대상자에 대한 투여를 포함하는 방법.
- [0404] 항목 44. 항목 43의 방법에 있어서, 그 세포가 T 세포나 T 세포 전구세포로부터 선택되는 방법.
- [0405] 항목 45. 생물학적 샘플에서 암 검출의 방법에 있어서,
- [0406] a) 항목 1 내지 22의 어느 TCR과 생물학적 샘플의 접촉 및
- [0407] b) TCR과 생물학적 샘플과의 결합의 검출을 포함하는 방법.
- [0408] 항목 46. 항목 45의 방법에 있어서, TCR이 검출가능한 라벨을 포함하는 방법.
- [0409] 항목 47. 항목 46의 방법에 있어서, 검출가능한 라벨이 방사능핵종, 형광단 및 비오틴으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.
- [0410] 항목 48. 항목 45 내지 47의 어느 방법에 있어서, 상기 검출이 시험관 내, 생체 내 또는 제자리에서 실행되는 방법.
- [0411] 항목 49. 항목 45 내지 48의 어느 방법에 있어서, 상기 암이 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포암, 뇌암, 위암, 결장직장암, 간세포 암, 췌장암, 전립선암, 백혈병, 유방암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 난소암, 방광암, 자궁암, 담낭암 및 담관암, 식도암 또는 이들의 조합인 방법.
- [0412] 항목 50. 항목 25 내지 28의 어느 숙주 세포에 있어서 T 세포가 감마/델타 T 세포인 숙주 세포.
- [0413] 항목 51. 항목 1 내지 22의 어느 TCR을 발현하는 효과적인 수자의 T 세포, 항목 23의 핵산, 항목 24의 발현 벡터, 항목 25 내지 28의 어느 하나의 숙주 세포 및/또는 항목 29의 약학적 조성물의 환자에 대한 투여를 포함하는, 표적 세포가 MAG-003을 이상 발현하는 환자에서 표적 세포를 살해하는 방법.
- [0414] 항목 52. 가용성 TCR인 항목 1 내지 22의 일체의 TCR.
- [0415] 항목 53. 항목 1 내지 22의 어느 TCR에 있어서, 알파 사슬이 서열 식별 번호 39, 서열 식별 번호 55 및 서열 식별 번호 71 중 어느 것의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일한 TCR 알파 가변 도메인을 포함하며, 또한 베타 사슬은 서열 식별 번호 47, 서열 식별 번호 63 및 서열 식별 번호 79의 어느 것에 대해 적어도 95% 동일한 TCR 베타 가변 도메인을 포함하며, TCR은 MAG-003 웨პ티드-MHC 분자 복합체에 특이적으로 결합하는 TCR.
- [0416] 항목 54. 서열 식별 번호 39, 서열 식별 번호 55 또는 서열 식별 번호 71에 비해 알파 사슬에서 적어도 하나의 돌연변이를 갖고/갖거나 서열 식별 번호 47, 서열 식별 번호 63 및 서열 식별 번호 79에 비해 베타 사슬에서 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 항목 1 내지 22의 어느 TCR에 있어서, MAG-003 웨პ티드-HLA 분자 복합체에 대한 TCR의 결합 친화도 및/또는 결합 반감기가 동일한 웨პ티드의 비돌연변이 TCR의 그것보다 적어도 2배인 TCR.
- [0417] 항목 55. 서열 식별 번호 39, 서열 식별 번호 55 또는 서열 식별 번호 71에 비해 알파 사슬에서 적어도 하나의 돌연변이를 갖고/갖거나 서열 식별 번호 47, 서열 식별 번호 63 및 서열 식별 번호 79에 비해 베타 사슬에서 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 항목 1에서 22의 어느 TCR에 있어서, TCR 비돌연변이 TCR에 비해 변형된 당화를 갖는 TCR.
- [0418] 항목 56. 항목 31 내지 44 또는 51 중 어느 방법에 있어서, 항목 1 내지 22 중 어느 항목의 TCR, 항목 23의 핵산, 항목 24의 발현 벡터, 항목 25 내지 28 중 어느 항목의 숙주 세포 또는 항목 29의 약학적 조성물이 적어도 24시간 간격으로 적어도 2회의 투여를 통해 투여되는 방법.
- [0419] 항목 57. 항목 56의 방법에 있어서, 항목 1 내지 22 중 어느 항목의 TCR, 항목 23의 핵산, 항목 24의 발현 벡터, 항목 25 내지 28 중 어느 항목의 숙주 세포 또는 항목 29의 약학적 조성물이 수일, 수주 또는 수개월의 기간에 걸쳐 시험대상자에게 투여되는 방법.

- [0420] 항목 58. 항목 56 또는 57의 방법에 있어서, 항목 1 내지 22 중 어느 항목의 TCR, 항목 23의 핵산, 항목 24의 발현 벡터, 항목 25 내지 28 중 어느 항목의 숙주 세포 또는 항목 29의 약학적 조성물이 국소 주입으로 투여되는 방법.
- [0421] 항목 59. 항목 58의 어느 방법에 있어서, 국소 주입이 주입 펌프 및/또는 카테터 시스템에 의해 투여되는 방법.
- [0422] 항목 60. 항목 58 또는 59의 방법에 있어서, 상기 국소 주입이 고형 종양, 고형 종양에 영양을 공급하는 혈관 및/또는 고형 종양을 둘러싼 영역 안으로 이루어지는 방법.
- [0423] 항목 61. 항목 31 내지 44, 51 또는 56 내지 60 중 어느 항목의 방법에 있어서, 항목 1 내지 22 중 어느 항목의 TCR, 항목 23의 핵산, 항목 24의 발현 벡터, 항목 25 내지 28 중 어느 항목의 숙주 세포 또는 항목 29의 약학적 조성물을 용량당 약  $10^4$ 개 내지 약  $10^{10}$ 개 세포로 투여하는 방법.
- [0424] 항목 62. 서열 식별 번호 39, 서열 식별 번호 55 및 서열 식별 번호 71의 알파 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 알파 사슬 상보 결정 영역(CDR) 및/또는 서열 식별 번호 47, 서열 식별 번호 63 및 서열 식별 번호 79의 베타 사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 베타 사슬 상보 결정 영역(CDR)을 포함하는 TCR에 있어서, TCR이 MAG-003 캡티드-MHC 분자 복합체에 특이적으로 결합하는 TCR.
- [0425] **실시예**
- [0426] 자가 내성을 피하고 자가조직 환경 즉, 환자로부터 유래한 T 세포에 비해 결합성이 더 높은 T 세포를 산출하기 위해 동종 반응성 설정을 사용할 수 있다. 그러한 설정의 예로는 동종-HLA 반응성, 캡티드 특이적 T 세포의 시험관 내 생성(Sadovnikova *et al.* 1998; Savage *et al.* 2004; Wilde *et al.* 2012), 그리고 인간-MHC 또는 인간 TCR에 대한 유전자 삽입 마우스의 면역접종(Stanislawski *et al.* 2001; Li *et al.* 2010)이 포함된다.
- [0427] **실시예 1: 동종-HLA 반응성, 캡티드 특이적 T 세포의 시험관 내 생성(Savage *et al.* 2004)**
- [0428] HLA-A\*02 양성 및 HLA-A\*02 음성의 건강한 공여자로부터 PBMC를 동의를 얻은 후 사용했다. MAG-003을 포함하는 재조합 비오틴화 HLA-A2 클래스 I 단량체 및 A2 형광 사합체는 MBLI(매사추세츠주 위번)로부터 얻었다. PBMC는 인산염 완충 식염수(PBS)로 희석된 항-CD20SA와 함께 실온에서 1시간 동안 배양하여 세척하고 비오틴화 A2/MAG-003 단량체와 함께 실온에서 30분 동안 배양한 다음 세척하고 나서 10% 인간 AB 혈청 및 RPMI에서 24-웰 플레이트에  $3 \times 10^6$  세포/웰 비율로 배치했다. 인터루킨 7(IL-7; R&D Systems, 미네소타주 Minneapolis)을 제1일에 10 ng/mL로 첨가했으며, IL-2(Chiron, 영국 Harefield)는 제4일에 10 U/mL로 첨가했다. 5주의 기간에 걸쳐 세포를 새로운 PBMC로 매주 다시 자극하고 1:1의 비율로 반응자 세포와 혼합한 다음 24-웰 플레이트에  $3 \times 10^6$ /웰의 비율로 배치했다.
- [0429] 결합성이 높은 T 세포를 얻기 위해, 약  $10^6$ 개 PBMC를 HLA-A2/MAG-003 사합체-피코에리트린(PE)(MBLI로부터 취득)과 함께  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분 동안 배양한 다음, 항-CD8-플루오레세인 이소티오네이트(FITC)/알로피코시아닌(APC)과  $4^\circ\text{C}$ 에서 20분 동안 배양한 후 형광 활성화 세포 분류(FACS) 캘리버 분석을 수행했다. 분류에는 FACS-Vantage를 사용했다(Becton Dickinson, 영국 옥스포드 카울리). 분류된 사합체-양성 세포를 24-웰 플레이트에 팽창했으며, 이때 웰 당  $2 \times 10^5$  분리된 세포, 피더로서  $2 \times 10^6$  조사 A2-음성 PBMC,  $2 \times 10^4$  CD3/CD28 비드/mL(Dynal, 노르웨이 오슬로) 및 IL-2(1000 U/mL)의 조건이 사용되었다. 그 다음 이렇게 얻은 고결합성 T 세포를 사용하여 단일 세포 5' RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)와 같은 당업계에 알려진 기법으로 TCR을 식별하고 분리했다. 다음에는 당업계에서 잘 알려진 방법을 사용하여 비반복성 TCR DNA를 아미노산/DNA 서열 결정 및 발현 벡터로의 클로닝을 위해 분석했다.
- [0430] **실시예 2: 인간-MHC 또는 인간 TCR의 유전자삽입 마우스의 면역접종**
- [0431] MAG-003을 사용하여 전체 인간 TCR  $\alpha\beta$  유전자 자리(1.1 및 0.7 Mb)로 유전자삽입 마우스의 면역접종을 하며, 그 T 세포는 마우스 TCR 결핍을 보상하는 방대한 인간 TCR 레퍼토리를 발현한다. (Li *et al.* 2010). 고결합성의 T 세포를 얻기 위해, 유전자삽입된 마우스로부터 얻은 PBMC를 사합체-피코에리트린(PE)과 배양한 다음 위의 설명과 같이 세포 분류를 수행한다. 그 다음 이렇게 얻어진 고결합성의 T 세포를 사용하여 당업계에 잘 알려진 방법으로 아미노산/DNA 서열 결정 및 발현 벡터로의 클로닝을 위해 TCR을 식별하고 분리한다.
- [0432] 한 양태에서, MAG-003과 그 변이체 즉, p286-1Y2L(2개의 아미노산 치환을 가짐, 서열 식별 번호 13) 그리고

p286-1Y2L9L(3개의 아미노산 치환을 가짐, 서열 식별 번호 14)은 HLA-A\*0201 분자에 대해 강한 결합 친화도와 안정성을 보인다. 특히, p286-1Y2L9L은 특이적 CTL을 유도하는 능력을 보였으며, 이것은 한 양태에서 건강한 공여자와 HLA-A2.1 /Kb 유전자삽입된 마우스 모두로부터의 표적 암 세포를 용해시킨다. 예를 들어 다음을 참고하며(Wu et al. 2011), 그 내용은 전문이 여기에 참조문헌으로 포함된다.

[0433] MHC I에 필요한 고결합성 TCR 또는 II/p286-1Y2L이나 p286-1Y2L9L 복합체를 얻기 위해, 실시예 1 및 2에 설명된 방법에서 이러한 웨티드를 사용할 수 있다. 그 다음 이렇게 얻어진 고결합성의 T 세포를 사용하여 당업계에 잘 알려진 방법으로 아미노산/DNA 서열 결정 및 발현 벡터로의 클로닝을 위해 TCR을 식별하고 분리한다.

#### 실시예 3: TCR의 클로닝

[0435] TCR의 클로닝 방법은 당업계에 알려져 있으며, U.S. 8,519,100의 설명이 한 예이고 상기 방법에 관한 내용의 전문이 여기에 참조문헌으로 포함된다. 세균에서 효율적인 발현의 개시를 위해 도입된 메티오닌인 제한 부위 NdeI 을 인코딩하는 알파 사슬 가변 영역 서열 특정 올리고뉴클레오티드 A1(ggaattccatatgagtcaacaaggagaagatcc 서열 식별 번호 26) 그리고 제한 부위 SalI를 인코딩하는 알파 사슬 불변 영역 서열 특정 올리고뉴클레오티드 A2(ttgtcagtcgacttagagttcttcagctgttacacg 서열 식별 번호 27)를 사용하여 알파 사슬 가변 영역을 증폭시킨다. 베타 사슬의 경우, 세균에서 효율적인 발현의 개시를 위해 도입된 메티오닌인 NdeI인 제한 부위를 인코딩하는 베타 사슬 가변 영역 서열 특정 올리고뉴클레오티드 B1(tctctcatatggatggtaattactcaatccccaa 서열 식별 번호 28) 그리고 제한 부위, AgeI을 인코딩하는 베타 사슬 불변 영역 서열 특정 올리고뉴클레오티드 B2(tagaaaccggtgccaggcacaccgtgtgc 서열 식별 번호 29)를 사용하여 베타 사슬 가변 영역을 증폭시킨다.

[0436] NdeI 및 SalI로 절단된 TCR 알파 사슬을 인코딩하는 DNA 서열이 pGMT7+C $\alpha$  벡터로 결찰되었으며, 그 벡터는 NdeI 및 XhoI로 절단되었다. NdeI 및 AgeI로 절단된 TCR 베타 사슬을 인코딩하는 DNA 서열이 별도의 pGMT7+C $\beta$  벡터로 결찰되었으며 그 벡터도 NdeI 및 AgeI로써 절단되었다. 결찰된 플라스미드는 경쟁하는 에스케리치아 콜라이 균주 XL1-blue 세포로 형질전환되고 100  $\mu$ g/ml 암피실린을 포함하는 LB/한천 플레이트에 배치된다. 37°C에서 하룻밤 동안 배양 후, 단일 군락을 선택하여 100  $\mu$ g/ml 암피실린을 포함하는 10 ml LB, 37°C 및 진탕의 조건하에 하룻밤 동안 성장시킨다. 클로닝된 플라스미드는 Miniprep 키트(Qiagen)를 사용하여 정제하고 인서트는 자동 DNA 시퀀서(Lark Technologies)를 사용하여 서열을 판정한다.

[0437] 각각 종양 특이적 TCR-알파 및 TCR-베타 사슬을 인코딩하는 세 가지 TCR(R20P1H7, R7P1D5 및 R10P2G12, 표 2 참조)을 건강한 공여자의 T 세포로부터 분리하여 증폭시킨다. 건강한 공여자로부터 얻은 세포를 Walter et. al. 2003에 기술된 방법에 따라 시험관 내에서 자극했다. 표적 특이적 세포를 이후의 TCR 분리를 위해 표적 특이적 다합체를 사용하여 단일 세포 분류를 실시했다. TCR 서열은 예를 들어 분자 클로닝 실험실 매뉴얼 제4판, Green and Sambrook에 기술된 표준 방법에 의해 5' RACE를 통해 분리했다. 세 TCR 모두 HLA-A2 양성 공여자로부터 유래했다. TCR R20P1H7, R7P1D5 및 R10P2G12의 알파 및 베타 가변 영역의 서열을 결정했다.

[0438] R20P1H7 TCR의 알파 가변 도메인은 서열 식별 번호 39의 잔기 22-133에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 것으로 나타났다. R20P1H7 TCR의 베타 가변 도메인은 서열 식별 번호 47의 잔기 20-135에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 것으로 나타났다.

[0439] R7P1D5 TCR의 알파 가변 도메인은 서열 식별 번호 55의 잔기 22-131에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다. R7P1D5 TCR의 베타 가변 도메인은 서열 식별 번호 63의 잔기 20-131에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0440] R10P2G12 TCR의 알파 가변 도메인은 서열 식별 번호 71의 잔기 21-136에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다. R10P2G12 TCR의 베타 가변 도메인은 서열 식별 번호 79의 잔기 20-134에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0441] 과지 디스플레이는 고결합성 돌연변이 확인에 필요한 TCR 변이체의 라이브러리를 생성하는 데 사용할 수 있다. 여기에 기술된 TCR 과지 디스플레이 및 선별 방법(Li et al., (2005) Nature Biotech 23 (3): 349-354)은 표 2에 기술된 TCR로부터 선택된 기준 TCR에 적용할 수 있다.

[0442] 예를 들면, 서열 식별 번호 39, 55 및 71의 알파 사슬 서열에 있는 세 가지 CDR 영역 모두, 그리고 서열 식별 번호 47, 55 및 79의 베타 사슬 서열에 있는 세 가지 CDR 영역 모두 돌연변이 생성에 의해 표적화가 가능하다.

[0443] 이에 따라, 기준 TCR의 친화도 및/또는 결합 반감기의 적어도 2배를 갖는 TCR(그러므로 자연 TCR 반감기의 적어도 2배임을 암시)을 확인한다.

[0444] 불변 영역에 도입된 시스테인을 포함시키는 방법을 사용하여 TCR 이종이합체를 다시 접어서 인공 사슬 간 이황화 결합을 제공한다. 이러한 방식으로 (a) 기준 TCR 베타 사슬 및 돌연변이된 알파 사슬, (b) 기준 TCR 알파 사

슬 및 돌연변이된 베타 사슬, 그리고 (c) 돌연변이 가변 도메인을 포함하는 베타 및 알파 사슬의 다양한 조합들로 구성된 TCR들을 만든다.

[0445] 고결합성 및 가용성 이황화 연계된 TCR들, TCR 변이체들 그리고 자연 웨티드 KVLEHVVRV(서열 식별 번호 1) HLA-A\*02 복합체 사이의 상호작용은 BIACore 방법을 사용하여 분석할 수 있다.

[0446] 고결합성 TCR 변이체도 효모 또는 T 세포 디스플레이에 의한 CDR 돌연변이의 라이브러리로부터 선택할 수 있다 (Holler *et al.* 2003; Chervin *et al.* 2008). 그리하여 후보 TCR 변이체는 고결합성 TCR 변이체를 얻기 위한 TCR의 CDR 돌연변이 설계의 지침을 제공한다(Robbins *et al.* 2008; Zoete *et al.* 2007).

#### [0447] 실시예 4: 자가조직 T 세포 조작

[0448] T 세포는 고결합성 TCR(소위 TCR 요법) 또는 MHC I/MAG-003 복합체나 MHC II/MAG-003 복합체에 대해 강화된 항원 특이성을 갖는 단백질 융합 유래 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 조작이 가능하다. 한 양태에서, 이 접근 방법은 중추 및 말단 내성과 연관있는 일부 제한을 극복하며, 환자에서 새로운(*de novo*) T 세포 활성화의 요건 없이도 종양의 표적화에 보다 효율적인 T 세포를 생성한다.

[0449] 한 양태에서, 본 설명의 TCR을 발현하는 T 세포를 얻기 위해, 실시예 1 내지 실시예 3에서 기술된 바와 같이 식별되고 분리된 종양 특이적 TCR-알파 및/또는 TCR-베타 사슬을 인코딩하는 핵산을 감마-레트로바이러스 또는 렌티바이러스와 같은 발현 벡터로 클로닝한다. 재조합 바이러스를 생성한 다음 항원 특이성 및 기능적 결합성과 같은 기능성에 대해 시험했다. 다음에는 최종 생성물의 분취물을 사용하여 표적 T 세포 모집단(일반적으로 환자 PBMC로부터 정제된)을 형질도입하며, 모집단은 환자에 주입하기 전에 팽창시킨다.

[0450] 또 다른 양태에서, 본 설명의 TCR을 발현하는 T 세포를 얻기 위해, TCR RNA를 예를 들어, 시험관 내 전사 체계에서 당업계에 기술된 기법으로 합성했다. 다음에는 시험관 내에서 합성된 TCR RNA를 종양 특이적 TCR-알파 및/또는 TCR-베타 사슬의 재발현을 위한 전기천공에 의해 건강한 공여자로부터 얻은 일차 CD8+ T 세포 내로 도입시킨다.

[0451] TCR의 특이성 및 친화도 측정을 위해, 형질전환된 CD8+ T 세포를 MAG-003으로 로딩된 표적 세포와 함께 또는 동종이나 관련되지 않는 웨티드 RABGAP1L-001(서열 식별 번호 91), AXIN1-001(서열 식별 번호 92), ANO5-001(서열 식별 번호 93), TPX2-001(서열 식별 번호 94), SYNE3-001(서열 식별 번호 95), MIA3-001(서열 식별 번호 96), HERC4-001(서열 식별 번호 97), PSME2-001(서열 식별 번호 98), HEATR5A-001(서열 식별 번호 99) 또는 CNOT1-003(서열 식별 번호 100) 또는 대조 웨티드 NYESO1-001(서열 식별 번호 101)로 로딩된 표적 세포와 함께 공동배양한 다음 IFN- $\gamma$  방출 분석을 수행했다. 로딩되지 않은 표적 세포 및 CD8+ T 세포를 단일 대조로 사용했다. CD8+ T 세포로부터의 IFN- $\gamma$  분비는 세포독성 활성도에 의한 T 세포 활성화를 나타낸다.

[0452] [표 11]

TCR 번호	TCR 코드	공여자/HLA-A2 (+ 또는 -)	IFN $\gamma$ (pg/ml)	EC50	% MAG-003 TET 양성 일차 CD8+ T 세포	% NYESO1-001 TET 양성 일차 CD8+ T 세포
1	R7P1D5	HBC-583/(+)	400-1050	~3 nM	7.99	0.87
2	R20P1H7	HBC-689/(+)	200-900	~10 nM	5.73	0.87
3	R10P2G12	HBC-673/(+)	200-1500	~10 nM	5.38	0.87

[0453] [0454] 도 5 내지 7에서 보는 바와 같이, 본 공개의 TCR로 형질전환된 모든 일차 CD8+ T 세포는, MAG-003으로 로딩된 표적 세포와 함께 공동배양 후에 관련 없는 웨티드가 로딩된 표적 세포 및 대조에 의해 자극시킨 것보다 더 높은 수준의 IFN- $\gamma$ 를 방출했다. 표적 웨티드 적정 분석에 의하면 EC50의 범위는 약 3 nM 내지 약 10 nM이다(표 11). 이러한 결과는 본 발명의 TCR들이 MHC/MAG-003 복합체와의 특이적 상호작용을 통해, 예를 들면 IFN- $\gamma$  방출 등 세포독성 T 세포 활성도를 활성화시킬 수 있음을 시사한다.

[0455] T 세포 활성화는 또한 MHC/MAG-003 결합 활성화에 의한 세포독성 T 세포를 검출하는 사합체 스캐닝 기법을 사용하여 확인되었다. 도 8 및 표 11에서 보는 바와 같이, TCR-발현 CD8+ T 세포의 양성 형광 라벨링된 MHC/MAG-003 사합체에 의한 염색 비율이 MHC/NYESO1-001 대조 사합체나 모의 대조에 의한 염색 비율보다 더 높았다. 대조로

사용된 MHC/NYES01-001 복합체에 특이적으로 결합하는 것으로 알려진 1G4 TCR과 같은 TCR로 형질전환된 일차 CD8+ T 세포는, NYES01-001 로딩된 표적 세포에 의해 쉽게 활성화되었다. TCR 1G4의 알파 및 베타 사슬은 서열 식별 번호 89 및 90에 각각 나와 있다:

[0456] 1G4 알파 사슬(서열 식별 번호 89):

METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTQIPAALSVPEGENVLNCSTDSAIYNLQWFRQDPGKGGLTSLLL IQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPG  
DSATYLCAVRPTSGGSY IPTFGRGTSLIVHPYIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDF  
ACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKFETDTNLNFQNLNVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0458] 1G4 베타 사슬(서열 식별 번호 90):

MSIGLLCCAALSLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSSTTEDFPLRLLSAAP  
SQTsvyFCASSYVGNTGELFFGEGRSLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPPQPLKEQPALNDS  
RYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKR  
KDSRG

[0460] MAG-003/MHC 복합체에 대한 TCR의 결합 모티프 측정을 위해, MAG-003 웨티드의 9개 아미노산 각각에서 위치 알라닌 스캐닝 분석을 수행했다. 알라닌 치환된 MAG-003 웨티드가 표 12에 나와 있다.

[표 12]

위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MAG-003 (서열 식별 번호 1)	K	V	L	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A1 (서열 식별 번호 30)	A	V	L	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A2 (서열 식별 번호 31)	K	A	L	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A3 (서열 식별 번호 32)	K	V	A	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A4 (서열 식별 번호 33)	K	V	L	A	H	V	V	R	V
MAG-003 A5 (서열 식별 번호 34)	K	V	L	E	A	V	V	R	V
MAG-003 A6 (서열 식별 번호 35)	K	V	L	E	H	A	V	R	V
MAG-003 A7 (서열 식별 번호 36)	K	V	L	E	H	V	A	R	V
MAG-003 A8 (서열 식별 번호 37)	K	V	L	E	H	V	V	A	V
MAG-003 A9 (서열 식별 번호 38)	K	V	L	E	H	V	V	R	A

[0462]

[0463] 관심 대상의 TCR을 인코딩하는 RNA로 전기천공된 CD8+ T 세포를 MAG-003, MAG-003-A1에서 MAG-003-A9 또는 관련되지 않은 NYES01-001 웨티드로 로딩된 표적 세포와 공동배양한 다음 위에서 기술한 IFN $\gamma$  방출 분석을 수행했다.

[0464] 위치 알라닌 스캐닝 분석의 결과가 도 9 내지 도 11에 나와있으며 표 13에 요약되어 있다.

[표 13]

TCR	TCR 결합을 가능케하는 MAG-003 위치들
R7P1D5	1, 3, 5, 7, 8
R20P1H7	1, 3, 4, 5, 7, 8
R10P2G12	1, 2, 3, 4, 5, 8

[0466]

[0467] 동일한 모티프의 A\*02-결합 웨티드에 대한 전장 유전체 스크리닝은 TCR R20P1H7, R7P1D5 및 R10P2G12 각각에 대해 잠재적으로 교차반응성인 웨티드를 드러내지 않았다. 이러한 결과는 여기서 기술된 TCR들이 오프타겟 효과(off-target effects)의 위험이 감소된 매우 특이적 인식 패턴을 나타냄을 시사했다.

[0468]

여기서 기술된 TCR들을 발현하는 T 세포의 효능을 측정하기 위해, TCR인 R7P1D5, R20P1H7 및 R10P2G12의 RNA로 전기천공된 일차 CD8+ T 세포를 여러 인간 암 세포주들(예: A-375(HLA-A2 및 MAG-003 발현에 대해 양성인 인간

흑색종 세포주), T98G(HLA-A2-양성 및 MAG-003-음성인 인간 아교모세포종 세포주) 및 SK-BR-3(HLA-A2-음성이며 MAG-003-음성인 인간 유방암 세포주)과 공동배양한 다음 IFN $\gamma$  방출 분석을 수행했다.

[0469] 도 12의 A 내지 C에서 보는 바와 같이, HLA-A2-양성 및 MAG-003-양성인 A-375 세포에서는 IFN $\gamma$  방출이 관찰되었지만, T98G 및 SK-BR-3 세포에서는 관찰되지 않았으며 이들의 IFN $\gamma$  방출은 기저 수준이며 작용기 세포만이 대조의 그것과 유사하다. 그 밖에 대조가 아닌 TCR R7P1D5로 형질전환된 CD8+ T 세포는 인간 비소세포 폐암 세포주인 H1755와 공동배양 시 IFN $\gamma$  방출의 증가를 나타냈다(데이터는 나와있지 않음). 이러한 결과는 TCR인 R7P1D5, R20P1H7 및 R10P2G12를 발현하는 T 세포가 암 세포를 표적화하는 세포독성 활성도를 HLA-A2/MAG-003 특이적 방식으로 특이적으로 유도할 수 있음을 나타낸다.

[0470] 본 설명은 MAG-003을 과다 또는 배타적으로 제시하는 암/종양, 바람직하게는 비소세포 폐암의 치료에 유용한 TCR 단백질을 제공한다.

#### 실시예 5: 동종 T 세포 조작

[0472] 병원체에 대한 일차 방어에 연루된 비전통적 T 림프구 작용기인 감마 엘타( $\gamma\delta$ ) T 세포는 TCR-감마 및 TCR-베타 사슬 등 수용체의 활성화를 통해 MHC-독립적 방식으로 종양 세포와 상호작용하여 조절시킬 수 있다. 이러한  $\gamma\delta$  T 세포는 신속한 사이토킨 생산을 허용하는 사전활성화된 표현형(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) 그리고 활성화에 따른 강력한 세포독성 반응을 표시한다. 이러한 T 세포는 다수의 암에 대한 항종양 활성도를 가지며  $\gamma\delta$  T 세포 매개에 의한 면역요법이 가능하며 객관적 암 반응을 유도할 수 있음을 시사한다. (Braza *et al.* 2013).

[0473] 고정 항원, 작용제 단클론 항체(mAbs), 종양 유래 인공 항원 제시 세포(aAPC) 또는 mAbs 및 aAPC의 활성의 조합을 사용한 최근의 발전 내용은 올리고클론 또는 다클론 TCR 래퍼토리로 감마-엘타 T 세포를 팽창시키는데 성공적이었다. 예를 들면, 고정 주조직적합 복합체 클래스 I 사슬 관련 A는 TCR $\delta 1$  이소형을 발현하는  $\gamma\delta$  T 세포에 대한 자극이었으며, 플레이트 결합된 활성화 항체는 V $\delta 1$  및 V $\delta 2$  세포를 생체 외에서 팽창시켰다. aAPC 상에서 공동 배양 이후 임상적으로 충분한 양의 TCR $\delta 1$ , TCR $\delta 2$  및 TCR $\delta 1^{neg}$ TCR $\delta 2^{neg}$ 가 생산되었으며, 이러한 하위조합은 기억 표현형의 차이와 종양에 대한 반응성을 시험관 내 및 생체 내에서 나타냈다. (Deniger *et al.* 2014).

[0474] 또한  $\gamma\delta$  T 세포는 유전적 변경에 복종하며, 이는 TCR-알파 및 TCR-베타 사슬의 도입에 의해 입증된다. (Hiasa *et al.* 2009). 본 설명의 다른 양태는 MAG-003에 결합하는 TCR-알파 및 TCR-베타를 발현하는  $\gamma\delta$  T 세포의 생산에 관한 것이다. 이렇게 하려면,  $\gamma\delta$  T 세포가 Deniger 등(2014)에 의해 설명된 방법에 의해 팽창된 다음, MAG-003에 결합하는 TCR을 발현시키는 재조합 바이러스를 팽창된  $\gamma\delta$  T 세포 안으로 형질도입한다(실시예 3에서 설명). 다음 바이러스 형질도입된  $\gamma\delta$  T 세포는 환자로 주입된다.

#### 실시예 6: MAG-003 특이적 TCR의 안전성

[0476] 각 종양 특이적 TCR-알파 및 TCR-베타 사슬을 인코딩하는 세 가지 MAG-003 특이적 TCR(R7P1D5, R10P2G12, R20P1H7, 표 2 참조)을 건강한 공여자의 T 세포로부터 분리하여 증폭시켰다. 건강한 공여자의 세포를 이전에 기술된 방법(Walter *et al.*, 2003 J Immunol., Nov 15;171(10):4974-8)에 따라 시험관 내에서 자극하고, 표적 특이적 세포를 HLA-A\*02 다합체를 사용하여 단일 세포 분류한 다음 계속하여 TCR 분리에 사용했다. TCR 서열은 예를 들어 분자 클로닝 실험실 매뉴얼 제4판, Green and Sambrook에 기술된 표준 방법에 의해 5' RACE를 통해 분리했다. TCR인 R7P1D5, R10P2G12 및 R20P1H7의 알파 및 베타 가변 영역의 서열을 결정하고 클로닝하여 추가의 기능적 특성화를 수행했다. TCR인 R7P1D5, R10P2G12 및 R20P1H7은 HLA-A\*02 양성 공여자로부터 유래했다.

[0477] [표 14]

[0478]

표적 세포 유형

세포 유형	약어	기원
정상 인간 피부 섬유모세포	NHDF	일차 세포
인간 관상동맥 평활근 세포	HCASMC	일차 세포
인간 기관지 평활근 세포	HBSMC	일차 세포
인간 신장 상피 세포	HREpC	일차 세포
인간 심근 세포	HCM	일차 세포
인간 심장 미세혈관 내피 세포	HCMEC	일차 세포
인간 간세포	HH	일차 세포
인간 성상세포	HA	일차 세포
인간 신경주위 세포	HPC	일차 세포
인간 수막 세포	HMC	일차 세포
인간 신경세포	HN	iPSC 유래 세포

[0479]

[0480]

관심 대상의 TCR들이 RNA 전기천공을 통해 인간 T 세포에서 발현되었으며, T 세포는 상이한 펩티드는 물론 종양 세포주 및 건강한 조직의 일차 세포로 로딩된 T2 세포와 같은 상이한 표적 세포와 공동 배양 후 IFN-g 방출에 대해 평가했다. T 세포 활성화 데이터가 다음에 표시된 바와 같이 절대 IFN-g 수준 또는 정규화 방식으로 나와 있다.

[0481]

TCR인 R7P1D5, R10P2G12 및 R20P1H7을 발현하는 CD8+ T 세포의 효능은 상이한 종양 세포주를 표적 세포로 사용하는 T 세포 활성화 연구(IFN-g 방출)로 결정했다. 관심 대상의 TCR의 안전성 프로필에 대한 특성화는 건강한 조직으로 분리된 일차 세포 유형들 그리고 HLA-A\*02 양성 공여자로부터 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC) 유래 세포 유형들과 공동 배양 후 TCR 발현 T 세포의 잠재적 활성화를 시험하여 접근했다(표 13). 세포 유형은 예를 들어 뇌, 심장 및 간 등 대부분의 중요 장기, 그리고 상피, 내피 또는 평활근의 상이한 세포 유형을 망라하는 방식으로 선택했다. 종양 세포주는 양성 및 음성 대조로 나란히 분석했다.

[0482]

IFN  $\gamma$  방출의 정규화 방법:

$$\text{Mean}_{\text{norm}}(\text{TCRoi}; \text{co}) = [\text{mean}_{(\text{TCRoi}; \text{co})} - \text{mean}_{(\text{TCRoi}; \text{effector only})}] - [\text{mean}_{(\text{mock}; \text{co})} - \text{mean}_{(\text{mock}; \text{effector only})}]$$

[0483]

각각의  $\text{CV}_{\text{norm}}$ 을 계산했다.

$$\text{CV}_{\text{norm}}(\text{TCRoi}; \text{co}) = [\text{CV}_{(\text{TCRoi}; \text{co})}^2 + \text{CV}_{(\text{TCRoi}; \text{effector only})}^2 + \text{CV}_{(\text{mock}; \text{co})}^2 + \text{CV}_{(\text{mock}; \text{effector only})}^2]^{[1/2]}$$

[0485]

상기 식에서,

[0486]

TCRoi = 관심 대상의 TCR을 발현하는 작용기 세포,

[0487]

Mock = 외인성 TCR 발현이 없는 작용기 세포,

[0488]

Co = 표적 세포와 공동배양된 작용기 세포,

[0489]

Effector only = 공동배양하지 않은 작용기 세포,

[0490]

Mean<sub>(norm)</sub> = 평균 IFN  $\gamma$  방출(정규화),

[0491]

$\text{CV}_{(\text{norm})}$  = 변동 계수(정규화).

[0492]

결과:

[0494] TCR인 R7P1D5, R10P2G12 또는 R20P1H7을 발현하는 CD8+ T 세포에서, 건강한 조직의 HLA-A\*02 양성 세포 유형과 공동배양시 활성화가 관찰되지 않은 반면(도 13 참조), MAG-003 웨티드에 대한 기원 유전자로서 HLA-A\*02 및 MAGEA4를 발현하는 종양 세포주 A-375 및 NCI-H1755를 향한 활성도가 있었다. NYES01 특이적 TCR 1G4를 발현하는 CD8+ T 세포에 대해 유사한 패턴의 반응성이 관찰되었으며, 이것은 HLA-A\*02 양성 종양 세포주를 발현하는 NYES01을 향해 반응성인 것으로 나타났으나 건강한 조직 세포의 표시된 패널을 향해서는 나타나지 않았다.

[0495] HLA-A\*02 및 MAGEA4를 발현하는 세포주와 공동 배양 시 나타나는 T 세포 활성화는 TCR인 R7P1D5, R10P2G12 및 R20P1H7에 의해 내인성으로 발현되고 처리되는 표적 pHLA의 인식을 반영한다.

[0496] 안전성 분석은 건강한 조직의 일차 세포를 향한 TCR인 R7P1D5, R10P2G12 및 R20P1H7의 예기치 않는 교차 반응성이나 잠재적 동종 반응성의 부재를 나타낸다. 검사한 일차 세포 유형이 HLA-A\*02의 환경 상 수천 개의 정상 HLA 리간드를 대표하고 또한 정상 세포 유형에 따라 다른 추가적인 동종 HLA 대립형질도 대표할 수 있으므로, 이 결과는 주목할만하다.

#### 실시예 7: 본 발명의 TCR의 렌티바이러스 발현

[0498] T 세포 생성물은 소규모 ACTengine 제조 공정을 따라 건강한 공여자로부터 분리된 벌크 총 말초혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터 시작하여 생성되었다. ACTengine T 세포의 제조를 위한 본 발명의 R7P1D5 TCR을 발현하는 렌티바이러스 백터 백본은 이전의 연구들과 여러 임상 시험을 근거로 설계되었다(Porter et al., 2011; Kalos et al., 2011; 및 기타). 간단히 설명하면, 해동시키고 안정시킨 PBMC를 CD3/CD28 항체로 활성화시킨 다음, 농축 바이러스 상청액으로 형질도입하였다. 상청액은 여러 방향의  $\alpha$  및  $\beta$  사슬 그리고 프로모터 및 강화제 서열의 다양한 조합을 갖는 R7P1D5 TCR 도입유전자를 보유하는 다양한 렌티바이러스 백터들을 사용하여 제조했다(구축물은 R71-R78로서 표시). 8개의 구축물 가운데 2개(R74, R75)는 낮은 역가 및/또는 불량한 생산성으로 인해 제외되었다. 나머지 6개의 바이러스 상청액으로 형질도입된 세포를 팽창시킨 다음 유세포 측정에 의해 도입 유전자 발현을 평가했다.

[0499] 방향은 다음과 같다: 알파-베타: R71, R72, 75, 76; 베타-알파: R73, R74, R77, 78, IG4.

[0500] 모든 T 세포 생성물이 생존력, 림프구 및 CD3+ T 세포의 비율에 있어서 유사했다. CD4+ 및 CD8+ T 세포의 백분율은 공여자에 따라 달랐다. 모든 6개의 바이러스 상청액에서 독성에 따른 차이는 관찰되지 않았다. R7P1D5 TCR 렌티바이러스 구축물인 R73은 표면에서의 사합체 결합의 검출로 나타나는 TCR 발현을 일관적으로 더 높게 유도했다. 도입유전자 발현에 의한 렌티바이러스 구축물은 다음 순서를 따른다: R73>R78>R77>R71>R76>R72(도 14).

[0501] R7P1D5 TCR R73 바이러스의 형질도입성을 확인하기 위하여 2개의 새로운 공여자를 이용하여 추가 실험을 했다. 모든 실험에서 형질도입된 세포를 사이토kin 방출 및 살해 분석을 통해 기능적 평가를 시험했다. 시험한 모든 공여자 가운데, 비형질도입 T 세포에 비해 MAGE-A4 항원을 발현하는 A375 세포와의 공동배양 시 네 공여자의 전체 PBMC로부터 유래한 R73 형질도입 T 세포가 유의하게 더 높은 IFN $\gamma$  생산을 나타냈다(도 15의 A). MAGE-A4 발현이 결여된 MCF-7 세포의 존재 하에서의 유도가 배경 수준 미만이므로 IFN $\gamma$  반응은 엄격히 항원 특이적이었다. 그 밖에 감소하는 MAG-003 웨티드의 농도에 반응하여 검출되는 IFN $\gamma$  수량을 대표하는 T2 적정 곡선에서 유래된 EC<sub>50</sub> 값은 두 공여자 모두에서 10.0 nM였다(도 15의 B).

[0502] 사이토kin 방출 외에도, R7P1D5 TCR(R73 바이러스) 형질도입된 T 세포의 생성물을 4시간 Cr51 방출 살해 분석으로 시험했다. 내인성으로 처리된 MAG-003 웨티드를 제시하는 MAGE-A4+ A375 종양 세포의 인식 및 용해를 평가했다. R73 형질도입 T 세포는 모든 E:T 비율에서 비형질도입 세포보다 살해의 증가를 나타냈다(도 16의 A 및 B). R73 형질도입 세포에서 관찰된 세포독성 효과는 항원 특이적 방식으로 매개되었으며, 이는 MAGE-A4+ 표적에서 관찰된 용해 비율이 MAGEA-A4-음성 표적 세포에서 관찰된 비율보다 유의하게 더 높은 것으로 알 수 있다(도 16의 C).

[0503]

참조문헌 목록

- Adair SJ, Hogan KT (2009). Treatment of ovarian cancer cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine upregulates the expression of cancer-testis antigens and class I major histo-compatibility complex-encoded molecules. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 589-601.
- Alves PM, Levy N, Bouzourene H, Viatte S, Bricard G, Ayyoub M, Vuilleumier H, Givel JC, Halkic N, Speiser DE, Romero P, Levy F (2007). Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 839-847.
- Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, An-driolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* 8, 2.
- Aubry F, Satie AP, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De ME, Spagnoli GC, Chomez P, De BO, Jegou B, Samson M (2001). MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer* 92, 2778-2785.
- Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J (2006). Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res* 12, 764-771.
- Bellati F, Napoletano C, Tarquini E, Palaia I, Landi R, Manci N, Spagnoli G, Rughetti A, Pani-ci PB, Nuti M (2007). Cancer testis antigen expression in primary and recurrent vulvar can-cer: association with prognostic factors. *Eur. J Cancer* 43, 2621-2627.
- Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, Fradet Y (2009). High frequency of MAGE-A4 and MAGE-A9 expression in high-risk bladder cancer. *Int. J Cancer* 125, 1365-1371.
- Bhan S, Chuang A, Negi SS, Glazer CA, Califano JA (2012). MAGEA4 induces growth in nor-mal oral keratinocytes by inhibiting growth arrest and apoptosis. *Oncol Rep.* 28, 1498-1502.
- Bode PK, Thielken A, Brandt S, Barghorn A, Lohe B, Knuth A, Moch H (2014). Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Mod. Pathol.* 27, 899-905.
- Cabezon T, Gromova I, Gromov P, Serizawa R, Timmermans W, V, Kroman N, Celis JE, Moreira JM (2013). Proteomic profiling of triple-negative breast carcinomas in combination with a three-tier orthogonal technology approach identifies Mage-A4 as potential therapeutic target in estrogen receptor negative breast cancer. *Mol. Cell Proteomics.* 12, 381-394.
- Cesson V, Rivals JP, Escher A, Piotet E, Thielemans K, Posevitz V, Dojcinovic D, Monnier P, Speiser D, Bron L, Romero P (2011). MAGE-A3 and MAGE-A4 specific CD4(+) T-cells in head and neck cancer patients: detection of naturally acquired responses and identification of new epitopes. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 23-35.
- Chambost H, Van BN, Brasseur F, Godelaine D, Xerri L, Landi SJ, Theate I, Plumas J, Spagnoli GC, Michel G, Coulie PG, Olive D (2000). Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells. *Blood* 95, 3530-3533.
- Chitale DA, Jungbluth AA, Marshall DS, Leitao MM, Hedvat CV, Kolb D, Spagnoli GC, Iversen K, Soslow RA (2005). Expression of cancer-testis antigens in endometrial carcinomas using a tissue microarray. *Mod. Pathol.* 18, 119-126.
- Coral S, Parisi G, Nicolay HJ, Colizzi F, Danielli R, Fratta E, Covre A, Taverna P, Sigalotti L, Maio M (2013). Immunomodulatory activity of SGI-110, a 5-aza-2'-deoxycytidine-containing demethylating dinucleotide. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 605-614.
- Cruz CR, Gerdemann U, Leen AM, Shafer JA, Ku S, Tzou B, Horton TM, Sheehan A, Copeland A, Younes A, Rooney CM, Heslop HE, Bollard CM (2011). Improving T-cell therapy for re-lapsed EBV-negative Hodgkin lymphoma by targeting upregulated MAGE-A4. *Clin Cancer Res* 17, 7058-7066.

[0504]

- Cuffel C, Rivals JP, Zaugg Y, Salvi S, Seelentag W, Speiser DE, Lienard D, Monnier P, Romero P, Bron L, Rimoldi D (2011). Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 128, 2625-2634.
- Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, Morrison C, Miliotto A, Beck A, Matsuzaki J, Tsuji T, Groman A, Grnjatic S, Spagnoli G, Lele S, Odunsi K (2014). Expression and immune responses to MAGE antigens predict survival in epithelial ovarian cancer. *PLoS. ONE.* 9, e104099.
- Duffour MT, Chaux P, Lurquin C, Cornelis G, Boon T, van der Bruggen P (1999). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur. J Immunol.* 29, 3329-3337.
- Forghanifard MM, Gholamin M, Farshchian M, Moaven O, Memar B, Forghani MN, Dadkhah E, Naseh H, Moghbali M, Raeisossadati R, Abbaszadegan MR (2011). Cancer-testis gene expression profiling in esophageal squamous cell carcinoma: identification of specific tumor marker and potential targets for immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* 12, 191-197.
- Gerdemann U, Katari U, Christin AS, Cruz CR, Tripic T, Rousseau A, Gottschalk SM, Savoldo B, Vera JF, Heslop HE, Brenner MK, Bolland CM, Rooney CM, Leen AM (2011). Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. *Mol. Ther.* 19, 2258-2268.
- Gunda V, Cogdill AP, Bernasconi MJ, Wargo JA, Parangi S (2013). Potential role of 5-aza-2'-deoxycytidine induced MAGE-A4 expression in immunotherapy for anaplastic thyroid cancer. *Surgery* 154, 1456-1462.
- Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonan M, Ferrera CA, Grnjatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ, Altorki NK (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11, 8055-8062.
- Hartmann S, Meyer TJ, Brands RC, Haubitz IR, Linz C, Seher A, Kubler AC, Muller-Richter UD (2015). MAGE-A expression clusters and antineoplastic treatment in head and neck cancer. *Int. J Mol. Med.* 35, 1675-1682.
- Hussein YM, Morad FE, Gameel MA, Emam WA, El Sawy WH, El Tarhouny SA, Bayomy ES, Raafat N (2012). MAGE-4 gene mRNA and TGF in blood as potential biochemical markers for HCC in HCV-infected patients. *Med. Oncol* 29, 3055-3062.
- Jacobs JF, Grauer OM, Brasseur F, Hoogerbrugge PM, Wesseling P, Gidding CE, van de Rakt MW, Figdor CG, Coulie PG, de Vries IJ, Adema GJ (2008). Selective cancer-germline gene expression in pediatric brain tumors. *J Neurooncol.* 88, 273-280.
- Jia ZC, Ni B, Huang ZM, Tian Y, Tang J, Wang JX, Fu XL, Wu YZ (2010). Identification of two novel HLA-A\*0201-restricted CTL epitopes derived from MAGE-A4. *Clin Dev. Immunol.* 2010, 567594.
- Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Imai N, Ishihara M, Saito K, Sugino S, Ueda S, Ishikawa T, Kokura S, Naota H, Ohishi K, Shiraishi T, Inoue N, Tanabe M, Kidokoro T, Yoshioka H, Tomura D, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H (2015). Adoptive Transfer of MAGE-A4 T-cell Receptor Gene-Transduced Lymphocytes in Patients with Recurrent Esophageal Cancer. *Clin. Cancer Res.*
- Kang J, Lee HJ, Kim J, Lee JJ, Maeng LS (2015). Dysregulation of X chromosome inactivation in high grade ovarian serous adenocarcinoma. *PLoS. ONE.* 10, e0118927.
- Kawagoe H, Yamada A, Matsumoto H, Ito M, Ushijima K, Nishida T, Yakushiji M, Itoh K (2000). Serum MAGE-4 protein in ovarian cancer patients. *Gynecol. Oncol* 76, 336-339.
- Kim K, Cho YM, Park BH, Lee JL, Ro JY, Go H, Shim JW (2015). Histological and immuno-histochemical markers for progression prediction in transurethrally resected high-grade non-muscle invasive bladder cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 743-750.

- Kobayashi T, Lonchay C, Colau D, Demotte N, Boon T, van der Bruggen P (2003). New MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A1 tumor cells. *Tissue Antigens* 62, 426-432.
- Kocher T, Zheng M, Bolli M, Simon R, Forster T, Schultz-Thater E, Remmel E, Noppen C, Schmid U, Ackermann D, Mihatsch MJ, Gasser T, Heberer M, Sauter G, Spagnoli GC (2002). Prognostic relevance of MAGE-A4 tumor antigen expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a tissue microarray study. *Int. J Cancer* 100, 702-705.
- Kubuschok B, Xie X, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BF, Neumann F, Regitz E, Pistorius G, Schilling M, Scheunemann P, Izicki JR, Lohr JM, Pfreundschuh M (2004). Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int. J Cancer* 109, 568-575.
- Li J, Yang Y, Fujie T, Tanaka F, Mimori K, Haraguchi M, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T (1997). Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* 17, 3559-3563.
- Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J (2005). Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* 11, 1809-1814.
- Lifantseva N, Koltsova A, Krylova T, Yakovleva T, Poljanskaya G, Gordeeva O (2011). Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks. *Stem Cells Int.* 2011, 795239.
- Luftl M, Schuler G, Jungbluth AA (2004). Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. *Br. J Dermatol.* 151, 1213-1218.
- Melo DH, Mamede RC, Neder L, Saggioro FP, Figueiredo DL, da Silva WAJ, Jungbluth AA, Zago MA (2011). Expression of MAGE-A4 and MAGE-C1 tumor-associated antigen in benign and malignant thyroid diseases. *Head Neck* 33, 1426-1432.
- Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, Schormann C, de BD, Wadle A, Neumann F, Schmidt W, Renner C, Pfreundschuh M (2006). Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int. J Cancer* 118, 696-703.
- Mitchell RT, Camacho-Moll E, MacDonald J, Anderson RA, Kelnar CJ, O'Donnell M, Sharpe RM, Smith LB, Grigor KM, Wallace WH, Stoop H, Wolffenbuttel KP, Donat R, Saunders PT, Looijenga LH (2014). Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Mod. Pathol.* 27, 1255-1266.
- Miyahara Y, Naota H, Wang L, Hiasa A, Goto M, Watanabe M, Kitano S, Okumura S, Take-mitsu T, Yuta A, Majima Y, Lemonnier FA, Boon T, Shiku H (2005). Determination of cellu-larly processed HLA-A2402-restricted novel CTL epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. *Clin Cancer Res* 11, 5581-5589.
- Montoro JR, Mamede RC, Neder SL, Saggioro FP, Figueiredo DL, Silva WA, Jr., Jungbluth AA, Spagnoli GC, Zago MA (2012). Expression of cancer-testis antigens MAGE-A4 and MAGE-C1 in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 34, 1123-1128.
- Nagao T, Higashitsuji H, Nonoguchi K, Sakurai T, Dawson S, Mayer RJ, Itoh K, Fujita J (2003). MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumor-igenic activity. *J Biol Chem* 278, 10668-10674.
- Naota H, Miyahara Y, Okumura S, Kuzushima K, Akatsuka Y, Hiasa A, Kitano S, Takahashi T, Yuta A, Majima Y, Shiku H (2006). Generation of peptide-specific CD8+ T-cells by phytoto-hemagglutinin-stimulated antigen-mRNA-transduced CD4+ T-cells. *J Immunol. Methods* 314, 54-66.

- Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S (2012). Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 119, 3097-3104.
- Oba-Shinjo SM, Caballero OL, Jungbluth AA, Rosenberg S, Old LJ, Simpson AJ, Marie SK (2008). Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immun.* 8, 7.
- Ohkuri T, Wakita D, Chamoto K, Togashi Y, Kitamura H, Nishimura T (2009). Identification of novel helper epitopes of MAGE-A4 tumour antigen: useful tool for the propagation of Th1 cells. *Br. J Cancer* 100, 1135-1143.
- Ottaviani S, Colau D, van der Bruggen P, van der Bruggen P (2006). A new MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A24 carcinoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 867-872.
- Otte M, Zafrakas M, Riethdorf L, Pichlmeier U, Loning T, Janicke F, Pantel K (2001). MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res* 61, 6682-6687.
- Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA (2006). Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res* 66, 4693-4700.
- Peng JR, Chen HS, Mou DC, Cao J, Cong X, Qin LL, Wei L, Leng XS, Wang Y, Chen WF (2005). Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett.* 219, 223-232.
- Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, Clavien PA, Marino S, Seifert B, Jaeger D (2008). Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: new markers for early recurrence. *Int. J Cancer* 123, 1551-1555.
- Prasad ML, Jungbluth AA, Patel SG, Iversen K, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ (2004). Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck* 26, 1053-1057.
- Quillien V, Raoul JL, Heresbach D, Collet B, Toujas L, Brasseur F (1997). Expression of MAGE genes in esophageal squamous-cell carcinoma. *Anticancer Res.* 17, 387-391.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S (1997). MHC Ligands and Peptide Motifs. (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).
- Resnick MB, Sabo E, Kondratev S, Kerner H, Spagnoli GC, Yakirevich E (2002). Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int. J Cancer* 101, 190-195.
- Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebel E, Wiltfang J (2005). Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to -A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy. *Int. J Oncol.* 26, 817-824.
- Saito T, Wada H, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa H, Sato E, Kageyama S, Shiku H, Mori M, Doki Y (2014). High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. *Vaccine* 32, 5901-5907.
- Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, Nagao T, Nonoguchi K, Chiba T, Fujita J (2004). A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells. *J Biol Chem* 279, 15505-15514.
- Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A (2003). Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* 64, 443-449.

- Schirmer U, Fiegl H, Pfeifer M, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Bode PK, Tischler V, Altevogt P (2013). Epigenetic regulation of L1CAM in endometrial carcinoma: comparison to cancer-testis (CT-X) antigens. *BMC. Cancer* 13, 156.
- Shafer JA, Cruz CR, Leen AM, Ku S, Lu A, Rousseau A, Heslop HE, Rooney CM, Bolland CM, Foster AE (2010). Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can target chemoresistant side-population tumor cells in Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 51, 870-880.
- Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA (2006). Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 12, 5442-5447.
- Shichijo S, Hoshino T, Koufaji K, Hayashi A, Kawamoto M, Kikuchi M, Higuchi T, Ichiki M, Oizumi K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in sera of lung cancer patients. *Jpn. J Cancer Res* 88, 414-419.
- Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, So T, Ichiki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K (2010). Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 68, 105-110.
- Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H (2012). T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gammacnull mice. *Cancer Sci.* 103, 17-25.
- Soga N, Hori Y, Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y (2013). Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients. *Mol. Clin Oncol* 1, 326-330.
- Su C, Xu Y, Li X, Ren S, Zhao C, Hou L, Ye Z, Zhou C (2015). Predictive and prognostic effect of CD133 and cancer-testis antigens in stage Ib-IIIA non-small cell lung cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 5509-5518.
- Takahashi N, Ohkuri T, Homma S, Ohtake J, Wakita D, Togashi Y, Kitamura H, Todo S, Nishimura T (2012). First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/ killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. *Cancer Sci.* 103, 150-153.
- Tanaka F, Mori M, Li J, Fujie T, Mimori K, Haraguchi M, Tanaka Y, Mafune K, Akiyoshi T (1997). High frequency of the expression of the MAGE gene family in human esophageal carcinoma. *Int. J Oncol* 10, 1113-1117.
- Tsuzurahara S, Sata M, Iwamoto O, Shichijo S, Kojiro M, Tanikawa K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in the sera of patients with hepatitis-C virus-associated hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Jpn. J Cancer Res* 88, 915-918.
- Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Bühring HJ, Rammensee HG, Stevanović S (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J Immunol.* 171(10), 4974-8
- Wang M, Li J, Wang L, Chen X, Zhang Z, Yue D, Ping Y, Shi X, Huang L, Zhang T, Yang L, Zhao Y, Ma X, Li D, Fan Z, Zhao L, Tang Z, Zhai W, Zhang B, Zhang Y (2015). Combined cancer testis antigens enhanced prediction accuracy for prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 3513-3528.
- Wu ZY, Gao YF, Wu YH, Liu W, Sun M, Zhai MX, Qi YM, Ye Y (2011). Identification of a novel CD8+ T-cell epitope derived from cancer-testis antigen MAGE-4 in oesophageal carcinoma. *Scand. J Immunol.* 74, 561-567.
- Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, Mazareb S, Spagnoli GC, Resnick MB (2003). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res* 9, 6453-6460.

[0508] Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N (2013). Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens* 81, 428-434.

Yoshida N, Abe H, Ohkuri T, Wakita D, Sato M, Noguchi D, Miyamoto M, Morikawa T, Kon-do S, Ikeda H, Nishimura T (2006). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens and T-cell infiltration in non-small cell lung carcinoma and their prognostic significance. *Int. J Oncol* 28, 1089-1098.

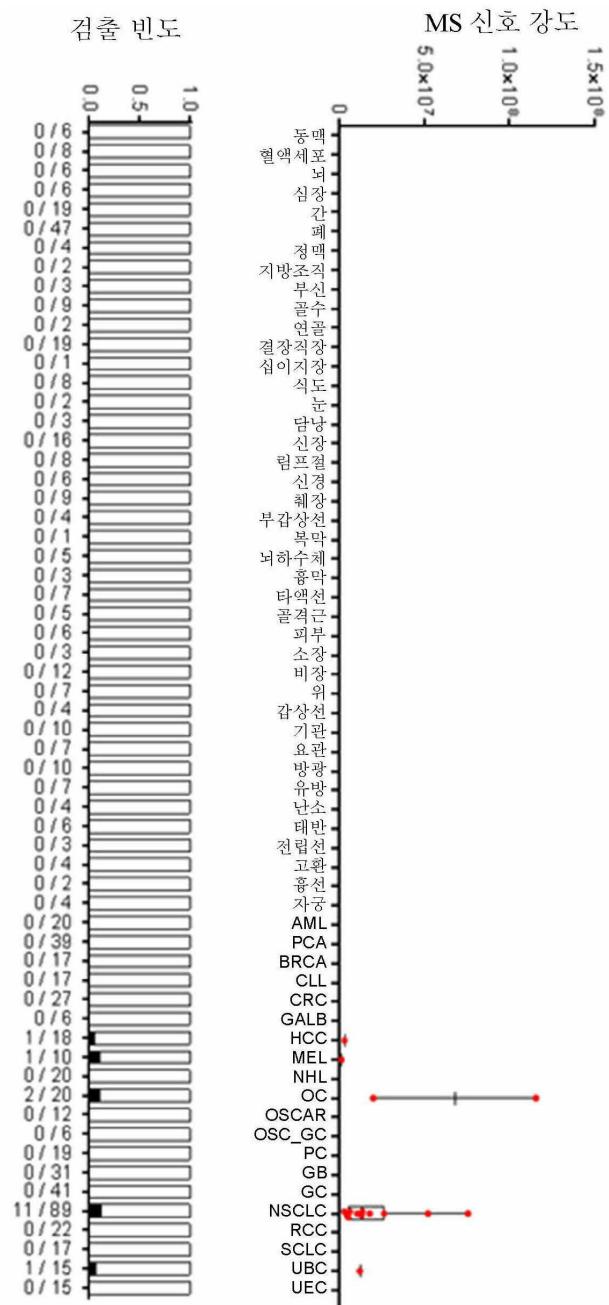
Zhang Y, Stroobant V, Russo V, Boon T, van der Bruggen P (2002). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-B37 is recognized on human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens* 60, 365-371.

Zimmermann AK, Imig J, Klar A, Renner C, Korol D, Fink D, Stadlmann S, Singer G, Knuth A, Moch H, Caduff R (2013). Expression of MAGE-C1/CT7 and selected cancer/testis antigens in ovarian borderline tumours and primary and recurrent ovarian carcinomas. *Virchows Arch.* 462, 565-574.

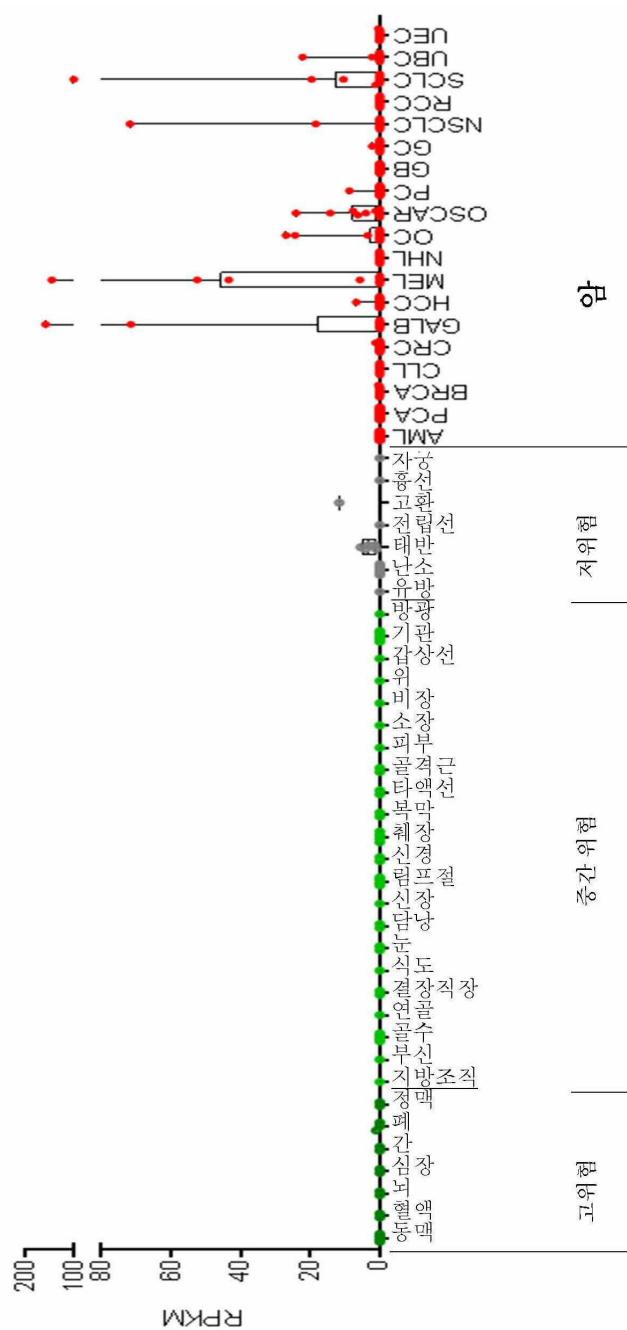
[0509]

## 도면

## 도면1



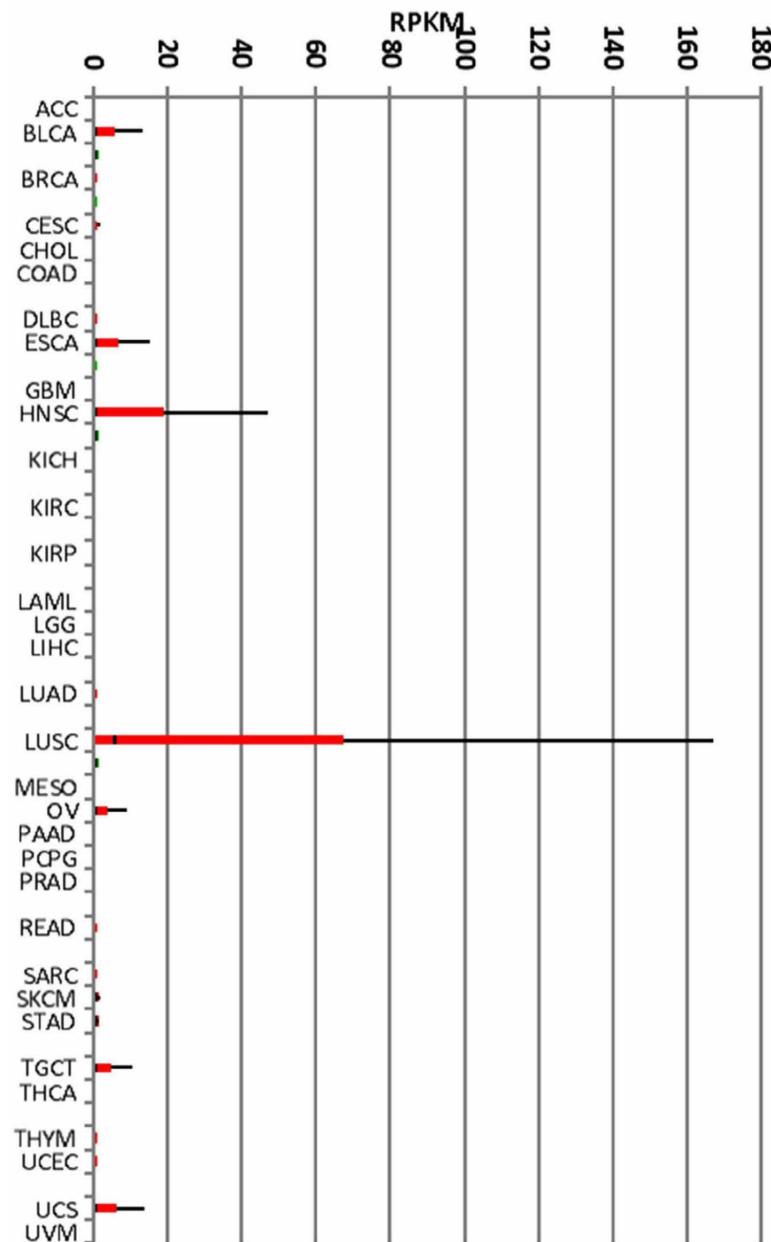
도면2



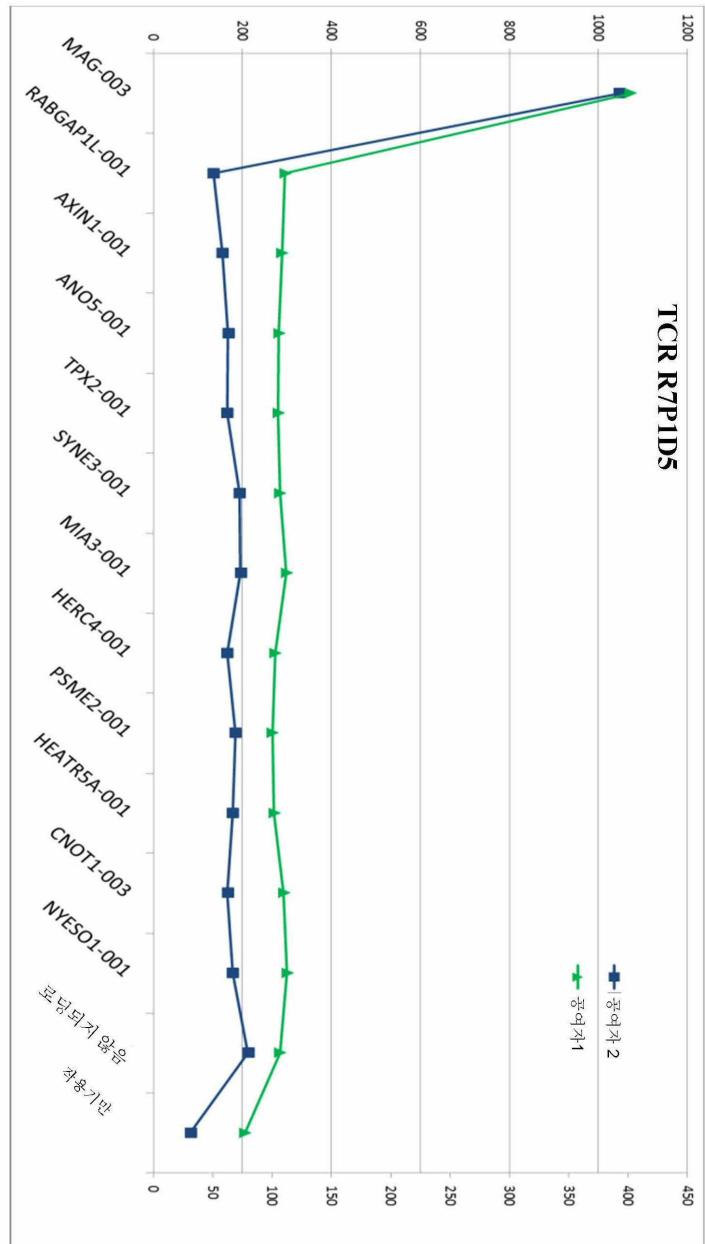
도면3



## 도면4

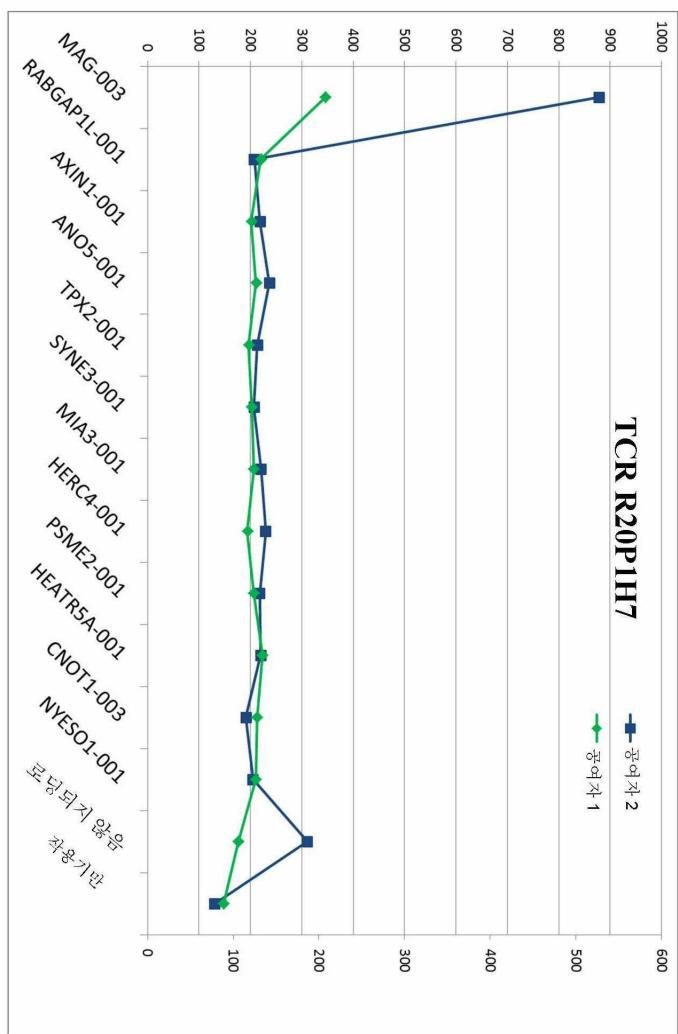


## 도면5

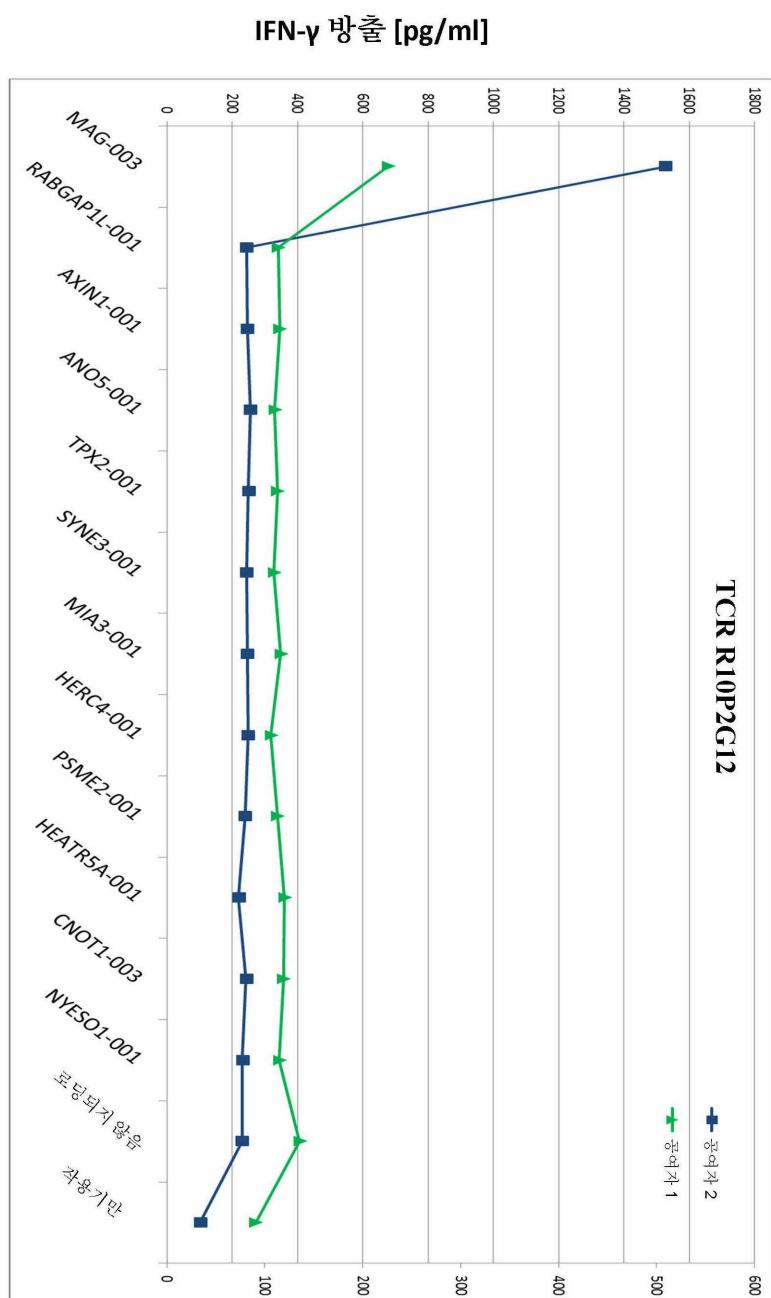
IFN- $\gamma$  방출 [pg/ml]

도면6

### IFN- $\gamma$ 방출 [pg/ml]



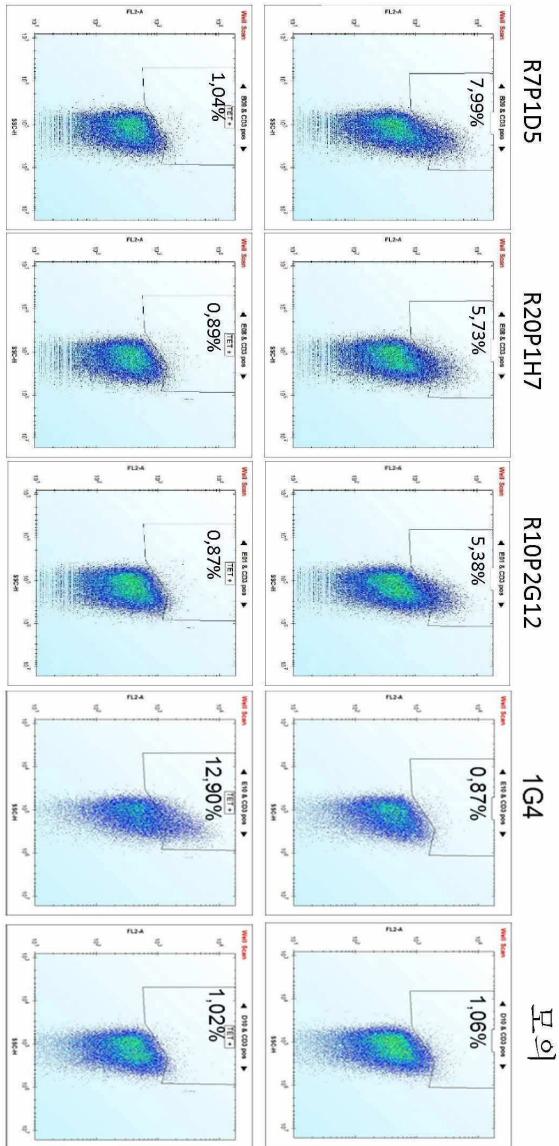
## 도면7



## 도면 8

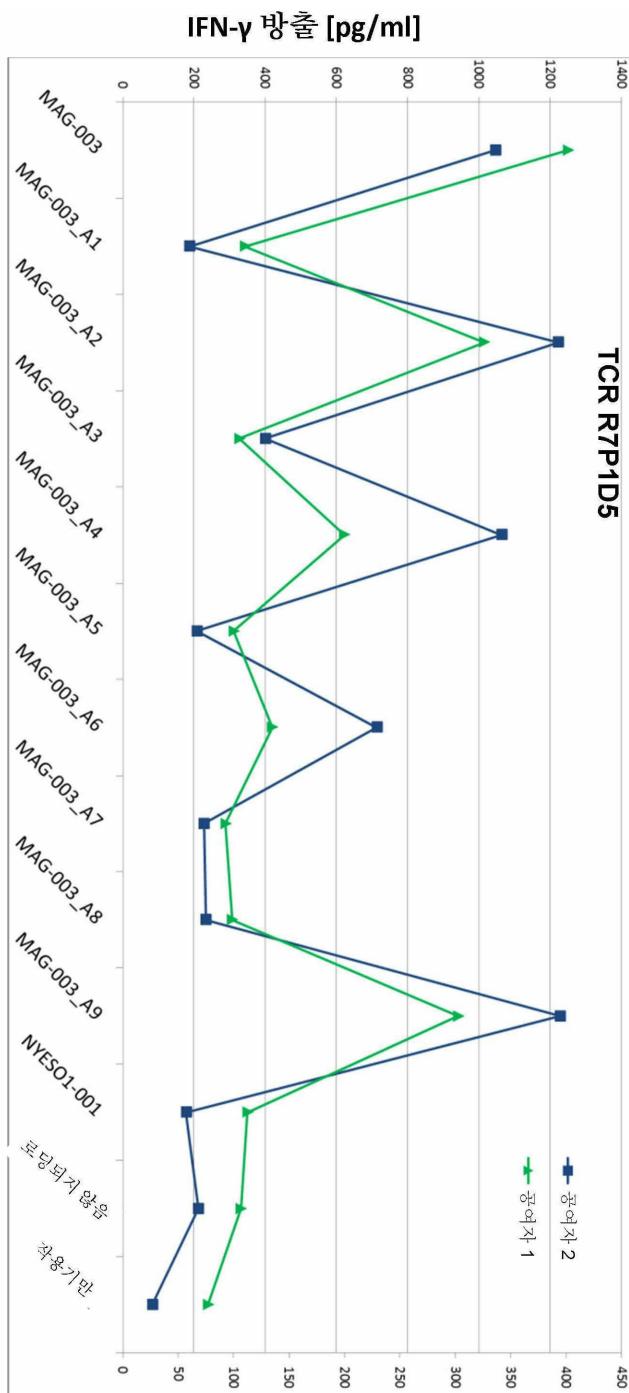
NYESO1-001 tet

MAG-003 tet

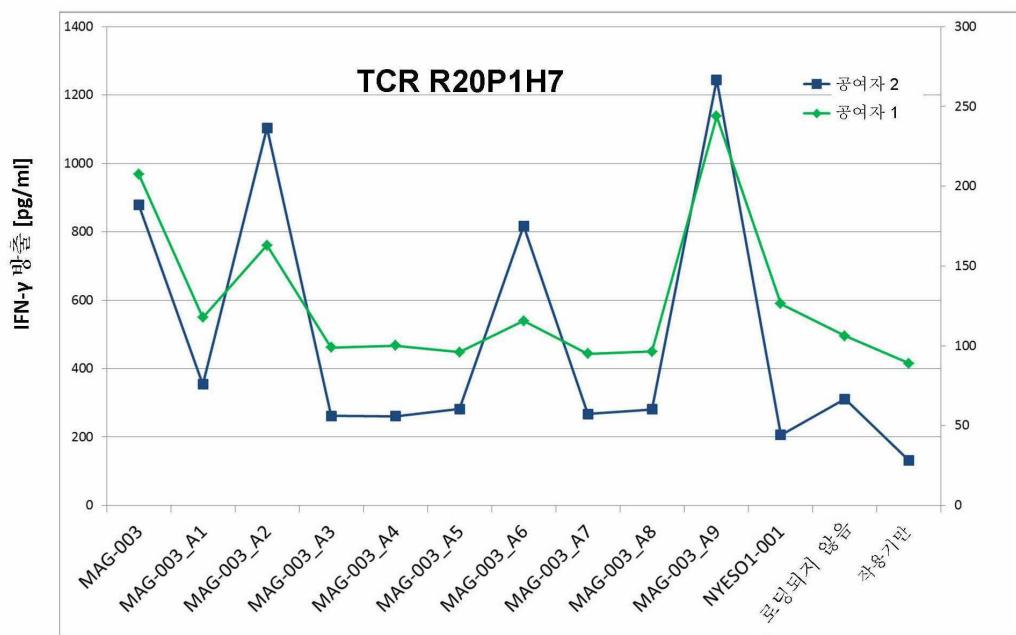


豆 素

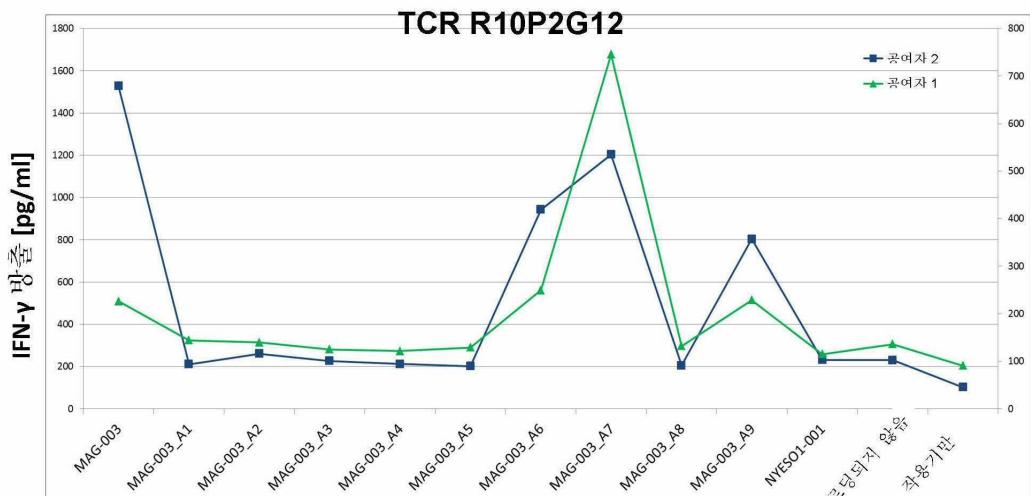
도면9



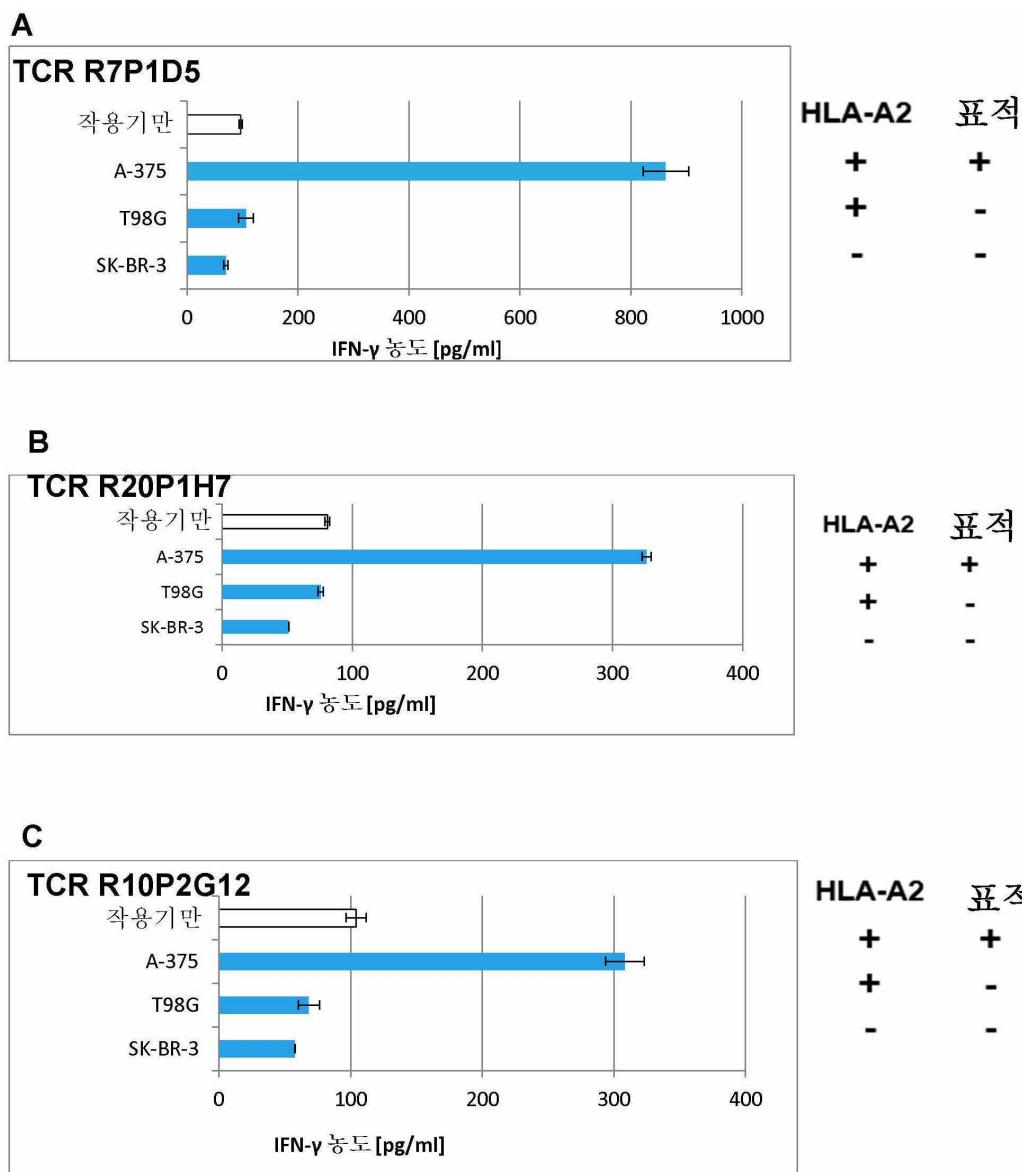
## 도면10



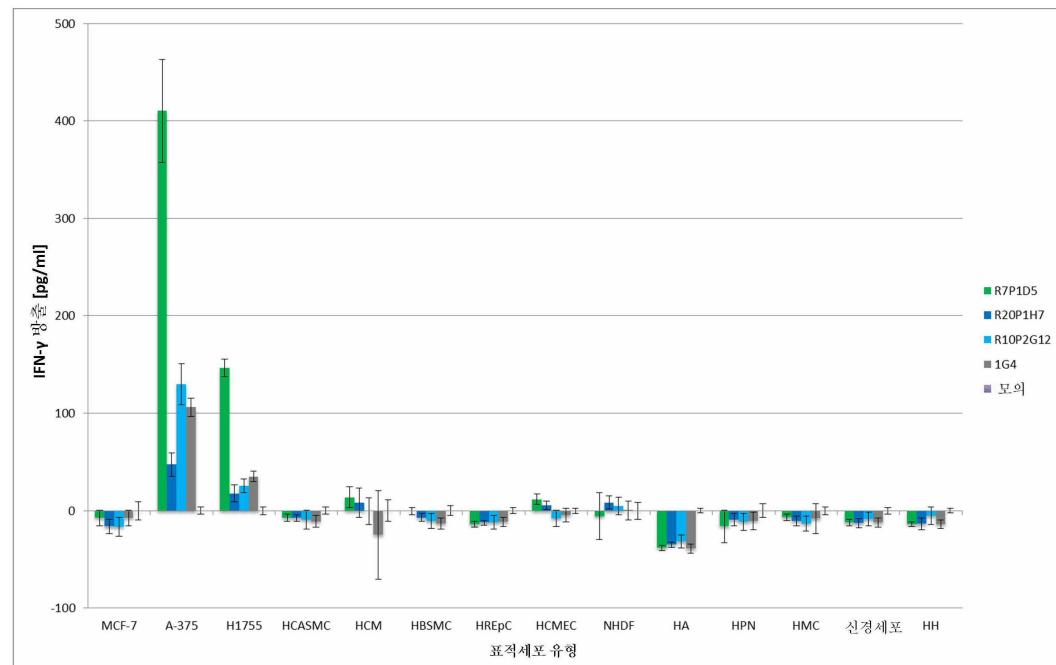
## 도면11



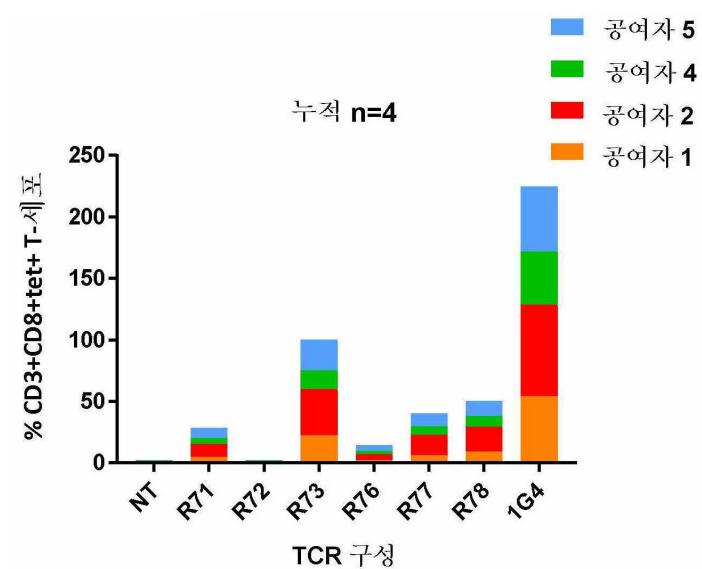
## 도면12



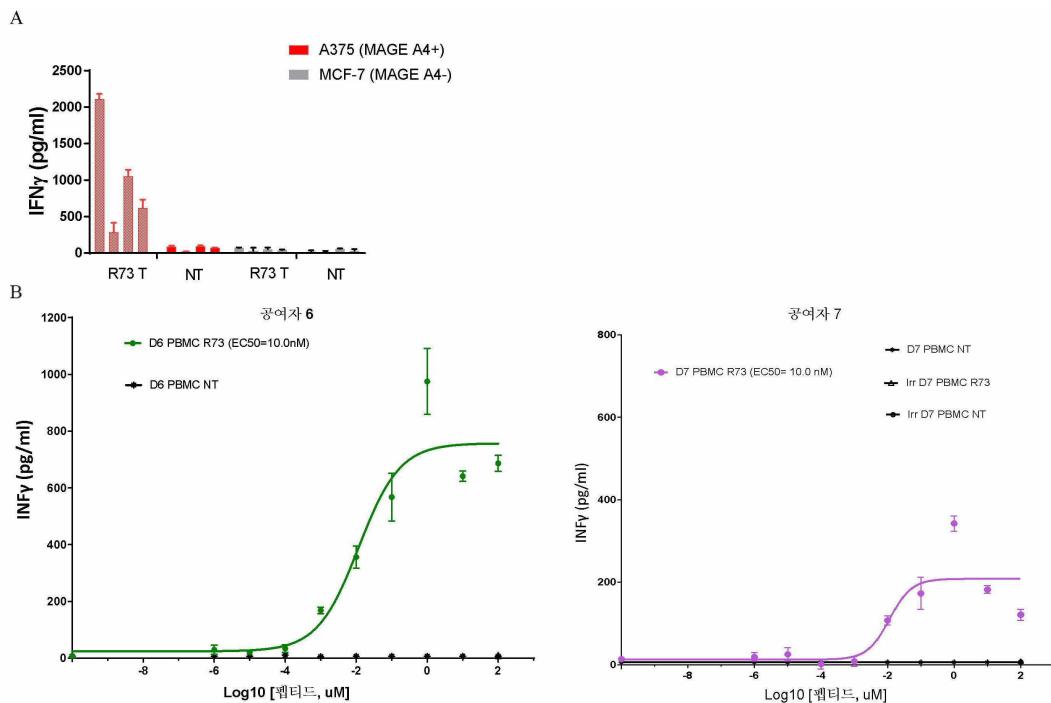
도면13



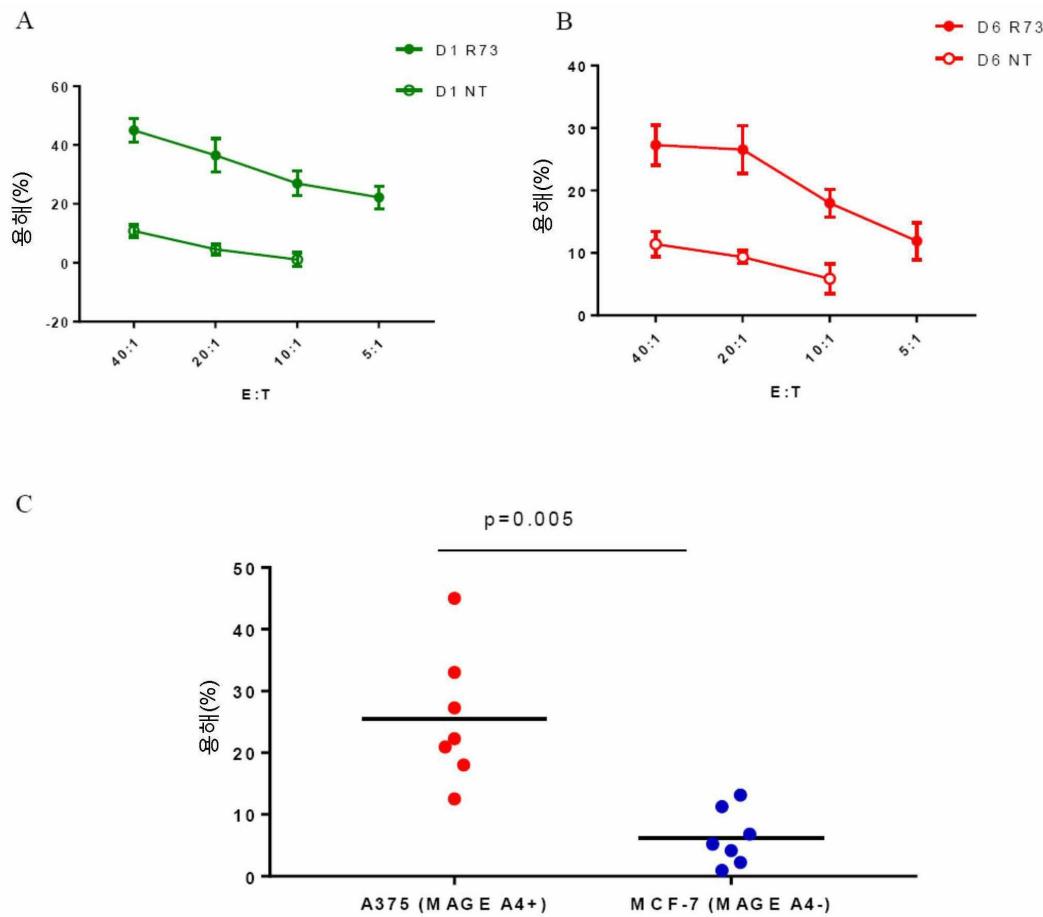
도면14



## 도면15



## 도면16



## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> TRANSFECTED T-CELLS AND T-CELL RECEPTORS FOR USE IN IMMUNOTHERAPY

AGAINST CANCERS

<130> I32955WO

<140> PCT/EP2017/056260

<141> 2017-03-16

<150> GB 1604492.7

<151> 2016-03-16

<150> US 62/308,975

<151> 2016-03-16

<160> 101

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Leu

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Ala

1 5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Ile

1 5

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

Lys Leu Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

Lys Leu Leu Glu His Val Val Arg Leu

1 5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

Lys Leu Leu Glu His Val Val Arg Ala

1 5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

Lys Leu Leu Glu His Val Val Arg Ile

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 9

Lys Ala Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Lys Ala Leu Glu His Val Val Arg Leu

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Ala Leu Glu His Val Val Arg Ala

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Lys Ala Leu Glu His Val Val Arg Ile

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Tyr Leu Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Tyr Leu Leu Glu His Val Val Arg Leu

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Tyr Leu Leu Glu His Val Val Arg Ala

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Tyr Leu Leu Glu His Val Val Arg Ile

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Tyr Ala Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Tyr Ala Leu Glu His Val Val Arg Leu

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Tyr Ala Leu Glu His Val Val Arg Ala

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Tyr Ala Leu Glu His Val Val Arg Ile

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Tyr Val Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Tyr Val Leu Glu His Val Val Arg Leu

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Tyr Val Leu Glu His Val Val Arg Ala

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Tyr Val Leu Glu His Val Val Arg Ile

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be Lys or Tyr

<220><221> misc\_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be Val, Leu or Ala

<220><221> misc\_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa can be Val, Leu, Ala or Ile

<400> 25

Xaa Xaa Leu Glu His Val Val Arg Xaa

1 5

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

ggaattccat atgagtcaac aaggagaaga agatcc	36
<210> 27	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 27	
 ttgtcagtcg acttagagtc tctcagctgg tacacg	36
<210> 28	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 28	
 tctctcatat ggatggtgga attactcaat ccccaa	36
<210> 29	
<211> 32	
<212> DNA	
 <213> Homo sapiens	
<400> 29	
 tagaaaccgg tggccaggca caccagtgtg gc	32
<210> 30	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 30	
 Ala Val Leu Glu His Val Val Arg Val	
1                       5	
<210> 31	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 31	
 Lys Ala Leu Glu His Val Val Arg Val	
1                       5	
<210> 32	

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Lys Val Ala Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Lys Val Leu Ala His Val Val Arg Val

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Lys Val Leu Glu Ala Val Val Arg Val

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Lys Val Leu Glu His Ala Val Arg Val

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Lys Val Leu Glu His Val Ala Arg Val

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Lys Val Leu Glu His Val Val Ala Val

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Ala

1 5

<210> 39

<211> 274

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Met Glu Lys Met Leu Glu Cys Ala Phe Ile Val Leu Trp Leu Gln Leu

1 5 10 15

Gly Trp Leu Ser Gly Glu Asp Gln Val Thr Gln Ser Pro Glu Ala Leu

20 25 30

Arg Leu Gln Glu Gly Glu Ser Ser Ser Leu Asn Cys Ser Tyr Thr Val

35 40 45

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

50 55 60

Pro Glu Phe Leu Phe Thr Leu Tyr Ser Ala Gly Glu Glu Lys Glu Lys

65 70 75 80

Glu Arg Leu Lys Ala Thr Leu Thr Lys Lys Glu Ser Phe Leu His Ile

85 90 95

Thr Ala Pro Lys Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Gln

100	105	110
Gly Glu Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Met		
115	120	125
Leu Leu Val Ser Pro Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln		
130	135	140
Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp		
145	150	155
Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr		
165	170	175
Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser		
180	185	190
Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn		
195	200	205
Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro		
210	215	220
Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp		
225	230	235
Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu		
245	250	255
Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp		
260	265	270
Ser Ser		

<210> 40  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 40

Met Glu Lys Met Leu Glu Cys Ala Phe Ile Val Leu Trp Leu Gln Leu  
1                5                10                15  
Gly Trp Leu Ser Gly  
20

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 41

Met Glu Lys Met Leu Glu Cys Ala Phe Ile Val Leu Trp Leu Gln Leu

1 5 10 15

Gly Trp Leu Ser Gly Glu Asp Gln Val Thr Gln Ser Pro Glu Ala Leu

20 25 30

Arg Leu Gln Glu Gly Glu Ser Ser Ser Leu Asn Cys Ser Tyr Thr Val

35 40 45

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

50 55 60

Pro Glu Phe Leu Phe Thr Leu Tyr Ser Ala Gly Glu Glu Lys Glu Lys

65 70 75 80

Glu Arg Leu Lys Ala Thr Leu Thr Lys Lys Glu Ser Phe Leu His Ile

85 90 95

Thr Ala Pro Lys Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Gln

100 105 110

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 42

Val Ser Gly Leu Arg Gly

1 5

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 43

Leu Tyr Ser

1

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 15

&lt;

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 44

Cys Ala Val Gln Gly Glu Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Leu Thr Phe

1 5 10 15

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 45

Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Met Leu Leu

1 5 10 15

Val Ser Pro

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85                    90                    95

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

100                    105                    110

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

115                    120                    125

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

130                    135                    140

<210> 47

<211> 314

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Met Gly Pro Gln Leu Leu Gly Tyr Val Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala

1                    5                    10                    15

Gly Pro Leu Glu Ala Gln Val Thr Gln Asn Pro Arg Tyr Leu Ile Thr

20                    25                    30

Val Thr Gly Lys Leu Thr Val Thr Cys Ser Gln Asn Met Asn His

35                    40                    45

Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Gln

50                    55                    60

Ile Tyr Tyr Ser Met Asn Val Glu Val Thr Asp Lys Gly Asp Val Pro

65                    70                    75                    80

Glu Gly Tyr Lys Val Ser Arg Lys Glu Lys Arg Asn Phe Pro Leu Ile

85                    90                    95

Leu Glu Ser Pro Ser Pro Asn Gln Thr Ser Leu Tyr Phe Cys Ala Ser

100                    105                    110

Ser Leu Gly Pro Gly Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro

115                    120                    125

Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro

130                    135                    140

Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln

145                    150                    155                    160

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val

165 170 175

Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser

180 185 190

Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg

195 200 205

Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn

210 215 220

Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu

225 230 235 240

Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val

245 250 255

Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser

260 265 270

Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu

275 280 285

Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met

290 295 300

Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly

305 310

<210> 48

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Met Gly Pro Gln Leu Leu Gly Tyr Val Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala

1 5 10 15

Gly Pro Leu

<210> 49

<211> 114

<212> PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 49

Met Gly Pro Gln Leu Leu Gly Tyr Val Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala

1 5 10 15

Gly Pro Leu Glu Ala Gln Val Thr Gln Asn Pro Arg Tyr Leu Ile Thr

20 25 30

Val Thr Gly Lys Lys Leu Thr Val Thr Cys Ser Gln Asn Met Asn His

35 40 45

Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Gln

50 55 60

Ile Tyr Tyr Ser Met Asn Val Glu Val Thr Asp Lys Gly Asp Val Pro

65 70 75 80

Glu Gly Tyr Lys Val Ser Arg Lys Glu Lys Arg Asn Phe Pro Leu Ile

85 90 95

Leu Glu Ser Pro Ser Pro Asn Gln Thr Ser Leu Tyr Phe Cys Ala Ser

100 105 110

Ser Leu

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 50

Met Asn His Glu Tyr

1 5

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 51

Ser Met Asn Val Glu Val

1 5

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 52

Cys Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gly Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Gln Phe

1 5 10 15

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 53

Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu

1 5 10 15

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 179

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Arg Gly

<210> 55

<211> 272

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu

1 5 10 15

Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser

20 25 30

Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser

35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu

50 55 60

Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln

65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg

85 90 95

Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu

100 105 110

Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser

115 120 125

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

130	135	140
Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp		
145	150	155
Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr		
165	170	175
Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser		
180	185	190
Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe		
195	200	205
Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser		
210	215	220
Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn		
225	230	235
Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu		
245	250	255
Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
260	265	270

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 56

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu

1 5 10 15

Asp Cys Met Ser Arg

20

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 57

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu

1	5	10	15
Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser			
20	25	30	
Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser			
35	40	45	
Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu			
50	55	60	
Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln			
65	70	75	80
Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg			
85	90	95	
Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu			
100	105	110	
<210> 58			
<211> 6			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 58			
Asp Ser Ser Ser Thr Tyr			
1	5		
<210> 59			
<211> 3			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 59			
Ile Phe Ser			
1			
<210> 60			
<211> 12			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 60			

Cys Ala Glu Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe

1 5 10

<210> 61

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser

1 5 10 15

Ile Arg Pro

<210> 62

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

<210> 63

<211> 310

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Met Gly Ser Trp Thr Leu Cys Cys Val Ser Leu Cys Ile Leu Val Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His

35 40 45

Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu

85 90 95

Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala

100 105 110

Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

115 120 125

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

130 135 140

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln

180 185 190

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

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly  
 260 265 270  
 Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys  
 290 295 300

Arg Lys Asp Ser Arg Gly

305 310

<210> 64

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 64

Met Gly Ser Trp Thr Leu Cys Cys Val Ser Leu Cys Ile Leu Val Ala

1 5 10 15

Lys His Thr

<210> 65

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Met Gly Ser Trp Thr Leu Cys Cys Val Ser Leu Cys Ile Leu Val Ala

1 5 10 15

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

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

100	105	110
Ser		

<210> 66  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 66

Ser Gly His Asp Tyr

1	5
---	---

<210> 67

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Phe Asn Asn Asn Val Pro

1	5
---	---

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Cys Ala Ser Arg Ala Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe

1 5 10

<210> 69

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu

1 5 10 15

<210> 70

<211> 179

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

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

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

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 277

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 71

Met Leu Thr Ala Ser Leu Leu Arg Ala Val Ile Ala Ser Ile Cys Val			
---	--	--	--

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Ser Ser Met Ala Gln Lys Val Thr Gln Ala Gln Thr Glu Ile Ser			
20	25	30	

Val Val Glu Lys Glu Asp Val Thr Leu Asp Cys Val Tyr Glu Thr Arg			
---	--	--	--

35	40	45	
----	----	----	--

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

Leu Val Phe Leu Ile Arg Arg Asn Ser Phe Asp Glu Gln Asn Glu Ile			
65	70	75	80
Ser Gly Arg Tyr Ser Trp Asn Phe Gln Lys Ser Thr Ser Ser Phe Asn			
85	90	95	

Phe Thr Ile Thr Ala Ser Gln Val Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
---	--	--	--

100	105	110	
-----	-----	-----	--

Ala Leu Ser Glu Gly Asn Ser Gly Asn Thr Pro Leu Val Phe Gly Lys			
115	120	125	

Gly Thr Arg Leu Ser Val Ile Ala Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala			
130	135	140	

Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu			
145	150	155	160
Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser			

165	170	175	
Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp			
180	185	190	
Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala			
195	200	205	
Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe			
210	215	220	
Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe			
225	230	235	240
Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe			
245	250	255	
Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu			
260	265	270	
Arg Leu Trp Ser Ser			
275			
<210> 72			
<211> 20			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 72			
Met Leu Thr Ala Ser Leu Leu Arg Ala Val Ile Ala Ser Ile Cys Val			

1	5	10	15
Val Ser Ser Met			
20			
<210> 73			
<211> 116			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 73			
Met Leu Thr Ala Ser Leu Leu Arg Ala Val Ile Ala Ser Ile Cys Val			
1	5	10	15
Val Ser Ser Met Ala Gln Lys Val Thr Gln Ala Gln Thr Glu Ile Ser			
20	25	30	

Val Val Glu Lys Glu Asp Val Thr Leu Asp Cys Val Tyr Glu Thr Arg

35 40 45

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

50 55 60

Leu Val Phe Leu Ile Arg Arg Asn Ser Phe Asp Glu Gln Asn Glu Ile

65 70 75 80

Ser Gly Arg Tyr Ser Trp Asn Phe Gln Lys Ser Thr Ser Ser Phe Asn

85 90 95

Phe Thr Ile Thr Ala Ser Gln Val Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

100 105 110

Ala Leu Ser Glu

115

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Thr Arg Asp Thr Thr Tyr Tyr

1 5

<210> 75

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Arg Asn Ser Phe

1

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Cys Ala Leu Ser Glu Gly Asn Ser Gly Asn Thr Pro Leu Val Phe

1 5 10 15

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt;

Homo sapiens

&lt;400&gt; 77

Asn Ser Gly Asn Thr Pro Leu Val Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Ser

1 5 10 15

Val Ile Ala

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 78

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

1 5 10 15

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

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

35 40 45

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

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 313

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 79

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His

35 40 45

Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu

50 55 60

Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro

65 70 75 80

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile

85 90 95

Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser

100 105 110

Ser Leu Ser Ser Gly Ser His Gln Glu Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly

115 120 125

Thr Arg Leu Leu Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu

130 135 140

Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys

145 150 155 160

Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu

165 170 175

Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr

180 185 190

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

195 200 205

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

260 265 270  
 Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly  
 275 280 285  
 Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala  
 290 295 300  
 Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly

305 310

<210> 80

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

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

1 5 10 15  
 Gly Leu Val

<210> 81

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

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

1 5 10 15  
 Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys  
 20 25 30  
 Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His

35	40	45
----	----	----

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

Ser Leu

<210> 82

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Met Asp His Glu Asn

1	5	
---	---	--

<210> 83

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Ser Tyr Asp Val Lys Met

1	5	
---	---	--

<210> 84

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Cys Ala Ser Ser Leu Ser Ser Gly Ser His Gln Glu Thr Gln Tyr Phe

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 85

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 85

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

1 5 10 15

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 179

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 86

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Arg Gly

<210> 87

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

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

1 5 10 15

Leu Met Thr Leu

20

<210> 88

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

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

1 5 10 15

Leu Val Ser Ala Leu Val Leu

20

<210> 89

<211> 274

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Met Glu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Ile Leu Trp Leu Gln Leu Gln Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Gly Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala

35	40	45
----	----	----

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

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

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

Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu  
 245                      250                        255  
 Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp  
 260                      265                        270  
 Ser Ser

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 311

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 90

Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala

1 5 10 15

Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu

20 25 30

Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His

35 40 45

Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg

85 90 95

Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser

100 105 110

Ser Tyr Val Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg

115 120 125

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

130 135 140

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr

145 150 155 160

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser

165 170 175

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro

180 185 190

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

195 200 205

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn

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

275	280	285
Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val		
290	295	300
Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly		

305	310	
<210> 91		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 91		

Phe Leu Leu Glu Thr Val Val Arg Val		
1	5	
<210> 92		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 92		
Ile Leu Asp Glu His Val Gln Arg Val		

1	5	
<210> 93		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		

<400> 93

Ile Val Met Glu His Val Val Phe Leu

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Lys Ile Leu Glu Asp Val Val Gly Val

1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Lys Leu Leu Asp Leu Gln Val Arg Val

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Lys Val Leu Asp Lys Val Phe Arg Ala

1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Lys Val Leu Glu Ile Leu His Arg Val

1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Lys Val Leu Glu Arg Val Asn Ala Val

1 5

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Lys Val Leu Glu Thr Leu Val Thr Val

1 5

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Lys Val Leu Gly Ile Val Val Gly Val

1 5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val

1 5