

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0112996
(43) 공개일자 2024년07월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) **A61K 39/12** (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01) **C07K 16/08** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) **G01N 33/569** (2017.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7019169
(22) 출원일자(국제) 2022년11월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년06월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/049551
(87) 국제공개번호 WO 2023/086477
국제공개일자 2023년05월19일
(30) 우선권주장
63/277,901 2021년11월10일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
티스캔 테라퓨틱스, 인크.
미국 매사추세츠 월섬 윈터 스트리트 830 (우: 02451)
(72) 발명자
나야르, 리부
미국 매사추세츠 02468 와반 윈슬로 로드 215
장알위, 소날
미국 매사추세츠 01701 프레이밍햄 안젤리카 디알. 78
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 광장리앤코

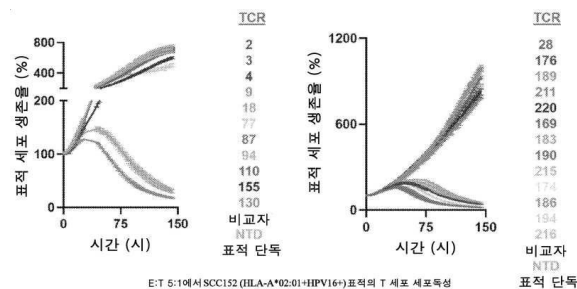
전체 청구항 수 : 총 149 항

(54) 발명의 명칭 HPV16 E7 항원을 인식하는 결합 단백질 및 이의 용도

(57) 요약

HPV16 E7 항원을 인식하는 결합 단백질 및 이의 용도가 본원에 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 31/20 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C07K 16/084 (2013.01)
C07K 16/2833 (2013.01)
G01N 33/56983 (2013.01)
G01N 33/57484 (2013.01)
G01N 2333/025 (2013.01)
G01N 2469/10 (2013.01)

(72) 발명자

폴락스미스, 다니엘

미국 매사추세츠 02067 샤론 마운틴 스트리트 206

부도트, 앙투안, 제이.

미국 매사추세츠 01887 월링턴 미들섹스 에이브이
이. 448

맥베스, 가빈

미국 매사추세츠 01880 웨이크필드 소피아스 웨이
9

(30) 우선권주장

63/317,326 2022년03월07일 미국(US)

63/342,479 2022년05월16일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 표 1에 열거된 T 세포 수용체(TCR) 알파 사슬 CDR 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 알파 사슬 CDR 서열에 대해 적어도 약 80% 동일성을 갖는 TCR 알파 사슬 CDR 서열; 및/또는
- b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 CDR 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 베타 사슬 CDR 서열에 대해 적어도 약 80% 동일성을 갖는 TCR 베타 사슬 CDR 서열을 포함하는 결합 단백질로서, 결합 단백질은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합할 수 있으며, 임의적으로 결합 친화성이 약 5×10^{-4} M 이하의 K_d 를 갖는, 결합 단백질.

청구항 2

- a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 가변(V_α) 도메인 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR V_α 도메인 서열에 대해 적어도 약 80% 동일성을 갖는 TCR V_α 도메인 서열; 및/또는
- b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 가변(V_β) 도메인 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR V_β 도메인 서열에 대해 적어도 약 80% 동일성을 갖는 TCR V_β 도메인 서열을 포함하는 결합 단백질로서, 결합 단백질은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합할 수 있으며, 임의적으로 결합 친화성이 약 5×10^{-4} M 이하의 K_d 를 갖는, 결합 단백질.

청구항 3

- a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 알파 사슬 서열에 대해 적어도 약 80% 동일성을 갖는 TCR 알파 사슬 서열; 및/또는
- b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 베타 사슬 서열에 대해 적어도 약 80% 동일성을 갖는 TCR 베타 사슬 서열을 포함하는 결합 단백질로서, 결합 단백질은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합할 수 있으며, 임의적으로 결합 친화성이 약 5×10^{-4} M 이하의 K_d 를 갖는, 결합 단백질.

청구항 4

- a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 CDR 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 알파 사슬 CDR 서열; 및/또는
- b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 CDR 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 베타 사슬 CDR 서열을 포함하는 결합 단백질로서, 결합 단백질은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합할 수 있으며, 임의적으로 결합 친화성이 약 5×10^{-4} M 이하의 K_d 를 갖는, 결합 단백질.

청구항 5

- a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 가변(V_α) 도메인 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR V_α 도메인 서열; 및/또는
- b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 가변(V_β) 도메인 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR V_β 도메인 서열을 포함하는 결합 단백질로서, 결합 단백질은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합할 수 있으며, 임의적으로 결합 친화성이 약 5×10^{-4} M 이하의 K_d 를 갖는, 결합 단백질.

청구항 6

- a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 알파 사슬 서열; 및/또는
- b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 베타 사슬 서열을 포함하는 결합 단백질로서, 결합 단백질은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합할 수 있으며, 임의적으로 결합 친화성이 약 5×10^{-4} M 이하의 K_d 를 갖는, 결합 단백질.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 1) TCR 알파 사슬 CDR, TCR V_α 도메인 및/또는 TCR 알파 사슬이 표 1에 열거된 TRAV, TRAJ 및 TRAC 유전자의 군으로부터 선택되는 TRAV, TRAJ 및/또는 TRAC 유전자 또는 이의 단편에 의해 인코딩되고/거나 2) TCR 베타 사슬 CDR, TCR V_β 도메인 및/또는 TCR 베타 사슬은 표 1에 열거된 TRBV, TRBJ 및 TRBC 유전자의 군으로부터 선택되는 TRBV, TRBJ 및/또는 TRBC 유전자 또는 이의 단편에 의해 인코딩되고/거나 3) 결합 단백질의 각각의 CDR은 표 1에 열거된 동족 참조 CDR 서열과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환, 삽입, 결실 또는 이들의 조합을 갖는, 결합 단백질.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드가 아미노산 서열 YMLDLQPET를 포함하는, 결합 단백질.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 단백질이 키메라, 인간화된 또는 인간 결합 단백질인, 결합 단백질.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 단백질이 TCR, TCR의 항원-결합 단편, 단일 사슬 TCR(scTCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 또는 TCR 및 이펙터 도메인을 포함하는 융합 단백질이며, 임의적으로 결합 도메인은 막형단 도메인 및 세포내에 있는 이펙터 도메인을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, TCR 알파 사슬 및 TCR 베타 사슬이 공유적으로 연결되고, 임의적으로 TCR 알파 사슬 및 TCR 베타 사슬은 링커 펩티드를 통해 공유적으로 연결되는, 결합 단백질.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, TCR 알파 사슬 및/또는 TCR 베타 사슬이 모이어티에 공유적으로 연결되고, 임의적으로 공유적으로 연결된 모이어티가 친화성 태그 또는 표지를 포함하는, 결합 단백질.

청구항 13

제12항에 있어서, 친화성 태그가 CD34 농축 태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST), 칼모듈린 결합 단백질(CBP), 단백질 C 태그, Myc 태그, HaloTag, HA 태그, Flag 태그, His 태그, 비오틴 태그 및 V5 태그로 구성된 군으로부터 선택되고/거나 표지는 형광 단백질인, 결합 단백질.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 공유적으로 연결된 모이어티가 염증제, 사이토카인, 독소, 세포독성 분자, 방사성 동위원소, 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 단백질이 세포 표면 상의 pMHC 복합체에 결합하는, 결합 단백질.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, MHC가 MHC 멀티머이고, 임의적으로 MHC 멀티머가 테트라머인, 결합 단백질.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, MHC가 MHC 클래스 I 분자인, 결합 단백질.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, MHC가 HLA 혈청형 HLA-A*02인 MHC 알과 사슬을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, HLA 대립유전자가 HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0205, HLA-A*0206 및 HLA-A*0207 대립유전자로 구성된 군으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 대한 결합 단백질의 결합이 면역 반응을 유발하고, 임의적으로, 면역 반응이 T 세포 반응인, 결합 단백질.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포 반응이 T 세포 확장, 사이토카인 방출 및/또는 세포독성 사멸로 구성된 군으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 단백질이 약 1×10^{-4} M 이하, 약 5×10^{-5} M 이하, 약 1×10^{-5} M 이하, 약 5×10^{-6} M 이하, 약 1×10^{-6} M 이하, 약 5×10^{-7} M 이하, 약 1×10^{-7} M 이하, 약 5×10^{-8} M 이하, 약 1×10^{-8} M 이하, 약 5×10^{-9} M 이하, 약 1×10^{-9} M 이하, 약 5×10^{-10} M 이하, 약 1×10^{-10} M 이하, 약 5×10^{-11} M 이하, 약 1×10^{-11} M 이하, 약 5×10^{-12} M 이하, 또는 약 1×10^{-12} M 이하의 K_d 로 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 특이적으로 및/또는 선택적으로 결합할 수 있는, 결합 단백질.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 단백질이 공지된 T-세포 수용체보다 펩티드-MHC(pMHC)에 대해 더 높은 결합 친화성을 갖는, 결합 단백질.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 단백질이 공지된 T-세포 수용체보다 펩티드-MHC(pMHC)에 대해 적어도 1.05배 더 높은 결합 친화성을 갖는, 결합 단백질.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 단백질이 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 발현하는 표적 세포와 접촉되는 경우 공지된 T-세포 수용체보다 더 높은 T 세포 확장, 사이토카인 방출 및/또는 세포독성 사멸을 유도하는, 결합 단백질.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 단백질이 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 발현하는 표적 세포와 접촉되는 경우 공지된 T-세포 수용체보다 T 세포 확장, 사이토카인 방출 및/또는 세포독성 사멸의 적어도

1.05배 증가를 유도하는, 결합 단백질.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 표적 세포가 CaSki, SCC152, 또는 SCC090 세포주인, 결합 단백질.

청구항 28

제25항 또는 제26항에 있어서, 표적 세포가 암 세포이고, 임의적으로 암 세포는 두경부암 세포, 구인두암 세포, 자궁경부암 세포, 항문암 세포, 질암 세포, 외음부암 세포 또는 음경암 세포인, 결합 단백질.

청구항 29

제22항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 단백질이 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합하지 않고, 임의적으로 펩티드가 SPTA1, MPL, HERC1, CPAMD8, INTS4, NUTM1 또는 XM_00172256으로부터 유래되는, 결합 단백질.

청구항 30

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 단백질이 SPTA1-, MPL-, HERC1-, CPAMD8-, INTS4-, NUTM1- 및/또는 XM_00172256-펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합하지 않는, 결합 단백질.

청구항 31

표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 및 베타 사슬 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 알파 사슬 및/또는 베타 사슬.

청구항 32

엄격한 조건 하에, 표 1에 열거된 폴리펩티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 또는 표 1에 열거된 폴리펩티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산에 대해 적어도 약 80% 상동성을 갖는 서열의 상보체와 혼성화되는 분리된 핵산 분자로서, 임의적으로 분리된 핵산 분자는 1) 표 1에 열거된 TRAV, TRAJ 및/또는 TRAC 유전자의 군으로부터 선택되는 TRAV, TRAJ 및 TRAC 유전자 또는 이의 단편 및/또는 2) 표 1에 열거된 TRBV, TRBJ 및 TRBC 유전자의 군으로부터 선택되는 TRBV, TRBJ 및/또는 TRBC 유전자 또는 이의 단편을 포함하는, 분리된 핵산 분자.

청구항 33

제32항에 있어서, 핵산이 숙주 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된, 분리된 핵산.

청구항 34

제32항 또는 제33항의 분리된 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 35

제34항에 있어서, 벡터가 클로닝 벡터, 발현 벡터 또는 바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 벡터가 CD8 α , CD8 β , 우성 음성 TGF β 수용체 II(DN-TGF β RII), 선택가능한 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하며, 임의적으로 선택가능한 단백질 마커는 디하이드로폴레이트 환원효소(DHFR)인, 벡터.

청구항 37

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열이 태그를 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결되는, 벡터.

청구항 38

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 태그를 인코딩하는 핵산이 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는

선택가능한 단백질 마커의 N-말단에 태그가 융합되도록 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열의 5' 업스트림에 있는, 벡터.

청구항 39

제34항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 태그가 CD34 농축 태그인, 벡터.

청구항 40

제32항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 제23항 또는 제24항의 분리된 핵산, 및/또는 TCR8 α , TCR8 β , CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열이 내부 리보솜 진입 부위 또는 자가-절단 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열과 상호연결되는, 벡터.

청구항 41

제32항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-절단 펩티드가 P2A, E2A, F2A 또는 T2A인, 핵산 또는 벡터.

청구항 42

숙주 세포로서, 제32항 또는 제33항의 분리된 핵산을 포함하고/거나 제34항 내지 제41항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하고/거나 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항의 결합 단백질을 발현하며, 임의적으로 세포가 유전자 조작되는, 숙주 세포.

청구항 43

제42항에 있어서, 숙주 세포가 TCR 유전자, HLA 유전자 또는 둘 모두의 염색체 유전자 녹아웃을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 숙주 세포가 α 1 마크로글로불린 유전자, α 2 마크로글로불린 유전자, α 3 마크로글로불린 유전자, β 1 마이크로글로불린 유전자, β 2 마이크로글로불린 유전자 및 이들의 조합으로부터 선택되는 HLA 유전자의 녹아웃을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 TCR α 가변 영역 유전자, TCR β 가변 영역 유전자, TCR 불변 영역 유전자 및 이들의 조합으로부터 선택되는 TCR 유전자의 녹아웃을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 46

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 발현하고, 임의적으로 선택가능한 단백질 마커가 DHFR인, 숙주 세포.

청구항 47

제46항에 있어서, CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커가 CD34 농축 태그에 융합되는, 숙주 세포.

청구항 48

제47항에 있어서, 숙주 세포가 CD34 농축 태그를 사용하여 농축되는, 숙주 세포.

청구항 49

제42항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 면역 세포인, 숙주 세포.

청구항 50

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 세포가 세포독성 림프구, 세포독성 림프구 전구 세포, 세포독성 림프구 간세포, 세포독성 림프구 줄기 세포, CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, CD4/CD8 이중 음성 T 세포, 감마

텔타($\gamma\delta$) T 세포, 자연 살해(NK) 세포, NK-T 세포, 수지상 세포 또는 이들의 조합인, 숙주 세포.

청구항 51

제42항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 나이브 T 세포, 중심 기억 T 세포, 이펙터 기억 T 세포 또는 이들의 조합인, 숙주 세포.

청구항 52

제42항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 일차 T 세포 또는 T 세포주의 세포인, 숙주 세포.

청구항 53

제42항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 내인성 TCR을 발현하지 않거나 더 낮은 표면 발현을 갖는, 숙주 세포.

청구항 54

제42항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 MHC 분자의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체를 포함하는 표적 세포와 접촉되는 경우 사이토카인 또는 세포독성 분자를 생산할 수 있는, 숙주 세포.

청구항 55

제54항에 있어서, 숙주 세포가 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 표적 세포와 접촉되는, 숙주 세포.

청구항 56

제54항 또는 제55항에 있어서, 사이토카인이 TNF- α , IL-2, 및/또는 IFN- γ 인, 숙주 세포.

청구항 57

제54항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성 분자가 퍼포린 및/또는 그랜자임이고, 임의적으로 세포독성 분자가 그랜자임 B인, 숙주 세포.

청구항 58

제54항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 발현하는 표적 세포와 접촉되는 경우 더 높은 수준의 사이토카인 또는 세포독성 분자를 생산할 수 있는, 숙주 세포.

청구항 59

제58항에 있어서, 숙주 세포가 적어도 1.05배 더 높은 수준의 사이토카인 또는 세포독성 분자를 생산할 수 있는, 숙주 세포.

청구항 60

제54항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 MHC 분자의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체를 포함하는 표적 세포를 사멸시킬 수 있는, 숙주 세포.

청구항 61

제61항에 있어서, 사멸이 사멸 검정에 의해 결정되는, 숙주 세포.

청구항 62

제60항 또는 제61항에 있어서, 사멸 검정에서 숙주 세포 및 표적 세포의 비가 20:1 내지 0.625:1인, 숙주 세포.

청구항 63

제60항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포가 1 μ g/mL 내지 50 pg/mL의 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드로 펄

상된 T2 세포인, 숙주 세포.

청구항 64

제60항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 발현하는 표적 세포와 접촉되는 경우 더 많은 수의 표적 세포를 사멸시킬 수 있는, 숙주 세포.

청구항 65

제64항에 있어서, 숙주 세포가 적어도 1.05배 더 많은 수의 표적 세포를 사멸시킬 수 있는, 숙주 세포.

청구항 66

제60항, 제61항, 제64항 및 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포가 CaSki, SCC152, 또는 SCC090인, 숙주 세포.

청구항 67

제54항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드가 아미노산 서열 YMLDLQPET를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 68

제54항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, MHC 분자가 MHC 클래스 I 분자인, 숙주 세포.

청구항 69

제54항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, MHC 분자가 HLA 혈청형 HLA-A*02인 MHC 알파 사슬을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 70

제54항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, HLA 대립유전자가 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:05, HLA-A*02:06 및 HLA-A*02:07 대립유전자로 구성된 군으로부터 선택되는, 숙주 세포.

청구항 71

제54항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포가 CaSki, SCC152 및 SCC090 세포주로 구성된 군으로부터 선택되는 세포주이거나, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드를 발현하는 암 세포이거나, SiHa 세포주가 아니거나/아니고 NCI-H1792 세포주가 아닌, 숙주 세포.

청구항 72

제71항에 있어서, 암 세포가 두경부암 세포, 구인두암 세포, 자궁경부암 세포, 항문암 세포, 질암 세포, 외음부암 세포 및 음경암 세포로 구성된 군으로부터 선택되는, 숙주 세포.

청구항 73

제54항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, a) 숙주 세포가 MHC 분자의 맥락에서 SPTA1, MPL, HERC1, CPAMD8, INTS4, NUTM1 또는 XM_00172256 펩티드 에피토프를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체를 포함하는 표적 세포와 접촉할 때 T 세포 확장, 사이토카인 방출 또는 세포독성 사멸을 유도하지 않고/거나 b) 숙주 세포가 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하지 않고/거나, 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항의 결합 단백질에 의해 인식되지 않고/거나, 혈청형 HLA-A*02가 아니고/거나, HLA-A*02 대립유전자를 발현하지 않으며, 임의적으로 HLA-A*02 대립유전자가 HLA-A*02:01이고/거나 HLA-A*02:06인, 숙주 세포.

청구항 74

제42항 내지 제73항 중 어느 한 항의 숙주 세포의 집단.

청구항 75

a) 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 결합 단백질, b) 제32항 또는 제33항에 따른 분리된 핵산, c) 제34항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 벡터, d) 제42항 내지 제73항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포 및/또는 e) 제74항에 따른 숙주 세포의 집단, 및 담체를 포함하는 조성물.

청구항 76

a) 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 결합 단백질, b) 제32항 또는 제33항에 따른 분리된 핵산, c) 제34항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 벡터, d) 제42항 내지 제73항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포 및/또는 e) 제74항에 따른 숙주 세포의 집단을 포함하는 장치 또는 키트로서, 상기 장치 또는 키트는 pMHC 복합체에 대한 a), d) 및/또는 e)의 결합을 검출하기 위한 시약을 임의적으로 포함하는, 장치 또는 키트.

청구항 77

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 결합 단백질을 생산하기 위한 방법으로서, 방법이 (i) 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 결합 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하는 핵산에 의해 형질전환된 형질전환 숙주 세포를 상기 결합 단백질의 발현을 허용하기에 적합한 조건하에 배양하는 단계; 및 (ii) 발현된 결합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 78

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 결합 단백질을 발현하는 숙주 세포를 생산하는 방법으로서, 방법이 (i) 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 결합 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 숙주 세포 내로 도입하는 단계; (ii) 상기 결합 단백질의 발현을 허용하기에 적합한 조건 하에 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 79

HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 및/또는 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 세포의 존재 또는 부재를 검출하는 방법으로서, 임의적으로 세포가 과증식성 세포이며, 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 결합 단백질 또는 제42항 내지 제73항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 숙주 세포를 사용하여 샘플 중 상기 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함하며, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 검출이 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 및/또는 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 세포의 존재를 나타내는, 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, 적어도 하나의 결합 단백질 또는 적어도 하나의 숙주 세포는 MHC 분자의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드와 복합체를 형성하고, 복합체는 형광 활성화된 세포 분류(FACS), 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사면역 검정(RIA), 면역화학, 웨스턴 블롯 또는 세포내 유동 검정의 형태로 검출되는, 방법.

청구항 81

제79항 또는 제80항에 있어서, 대상체로부터 샘플을 수득하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 82

제79항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 골수 생검에 의해 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 세포를 확인하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 83

대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발의 수준을 검출하는 방법으로서,

a) 대상체로부터 수득된 샘플을 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 결합 단백질, 제42항 내지 제73항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 숙주 세포 또는 제74항에 따른 숙주 세포의 집단과 접촉시키

는 단계; 및

b) 반응성의 수준을 검출하는 단계를 포함하며,

대조군 수준과 비교하여 더 높은 수준의 반응성은 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발의 수준을 나타내는, 방법.

청구항 84

제83항에 있어서, 대조군 수준이 참조 넘버(reference number)인, 방법.

청구항 85

제83항에 있어서, 대조군 수준이 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발이 없는 대상체의 수준인, 방법.

청구항 86

대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발의 진행을 모니터링하는 방법으로서, 방법은

a) 제79항 내지 제85항 중 어느 한 항에 따른 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 또는 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 관심 세포의 수준을 제1 시점에 대상체 샘플에서 검출하는 단계;

b) 후속 시점에서 단계 a)를 반복하는 단계; 및

c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 또는 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 관심 세포의 수준을 비교하여 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발의 진행을 모니터링하는 단계로서, 단계 a)와 비교하여 단계 b)에서 검출된 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 또는 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 관심 세포의 부재 또는 감소된 수준은 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발의 억제된 진행을 나타내는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 87

제86항에 있어서, 제1 시점과 후속 시점 사이에, 대상체가 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발을 치료하기 위한 치료를 받은, 방법.

청구항 88

HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발에 대한 요법의 효능을 평가하는 방법으로서,

a) HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발에 대한 요법의 적어도 일부를 대상체에게 제공하기 전에 대상체로부터 획득된 제1 샘플에서, 대상체로부터 획득된 샘플과 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 결합 단백질, 제42항 내지 제73항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 숙주 세포 또는 제74항에 따른 숙주 세포 집단 사이의 반응성의 존재 또는 수준을 결정하는 단계, 및

b) HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발에 대한 요법의 일부를 제공한 후 대상체로부터 획득된 제2 샘플에서, 대상체로부터 획득된 샘플과 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 결합 단백질, 제42항 내지 제73항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 숙주 세포 또는 제74항에 따른 숙주 세포 집단 사이의 반응성의 존재 또는 수준을 결정하는 단계를 포함하며,

제1 샘플에 비해 제2 샘플에서의 반응성의 부재 또는 감소된 수준은 요법이 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발을 치료하는데 효과적임을 나타내는, 방법.

청구항 89

제83항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 반응성 수준이 a) 결합의 존재 및/또는 b) T 세포 활성화 및/또는 이펙터 기능에 의해 표시되는, 방법.

청구항 90

제89항에 있어서, T 세포 활성화 또는 이펙터 기능이 T 세포 증식, 사멸 또는 사이토카인 방출인, 방법.

청구항 91

제83항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포 결합, 활성화 및/또는 이펙터 기능이 형광 활성화된 세포 분류(FACS), 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사면역 검정(RIA), 면역화학, 웨스턴 블롯 또는 세포내 유동 검정을 사용하여 검출되는, 방법.

청구항 92

대상체에게 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 결합 단백질을 발현하는 세포를 포함하는 조성물을 치료학적 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발을 예방 및/또는 치료하는 방법.

청구항 93

제92항에 있어서, 세포가 동종이계 세포, 동계 세포 또는 자가 세포인, 방법.

청구항 94

제92항 또는 제93항에 있어서, 세포가 유전자 변형된, 방법.

청구항 95

제92항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 TCR 유전자, HLA 유전자 또는 TCR 유전자와 HLA 유전자 둘 모두의 염색체 유전자 녹아웃을 포함하는, 방법.

청구항 96

제92항 내지 95항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 $\alpha 1$ 마크로글로불린 유전자, $\alpha 2$ 마크로글로불린 유전자, $\alpha 3$ 마크로글로불린 유전자, $\beta 1$ 마이크로글로불린 유전자, $\beta 2$ 마이크로글로불린 유전자 및 이들의 조합으로부터 선택되는 HLA 유전자의 녹아웃을 포함하는, 방법.

청구항 97

제92항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 TCR α 가변 영역 유전자, TCR β 가변 영역 유전자, TCR 불변 영역 유전자 및 이들의 조합으로부터 선택되는 TCR 유전자의 녹아웃을 포함하는, 방법.

청구항 98

제92항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 발현하며, 임의적으로 선택가능한 단백질 마커는 DHFR이고 추가로 임의적으로 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커는 CD34 농축 태그에 융합되는, 방법.

청구항 99

제98항에 있어서, 세포가 CD34 농축 태그를 사용하여 농축되는, 방법.

청구항 100

제923항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 면역 세포인, 방법.

청구항 101

제92항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 세포가 세포독성 림프구, 세포독성 림프구 전구 세포, 세포독성 림프구 간세포, 세포독성 림프구 줄기 세포, $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, CD4/CD8 이중 음성 T 세포, 감마 델타($\gamma \delta$) T 세포, 자연 살해(NK) 세포, NK-T 세포, 수지상 세포 또는 이들의 조합인, 방법.

청구항 102

제92항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 나이브 T 세포, 중심 기억 T 세포, 이펙터 기억 T 세포 또는 이들의 조합인, 방법.

청구항 103

제92항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 일차 T 세포 또는 T 세포주의 세포인, 방법.

청구항 104

제92항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 내인성 TCR을 발현하지 않거나 더 낮은 표면 발현을 갖는, 방법.

청구항 105

제92항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 MHC 분자의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체를 포함하는 표적 세포와 접촉되는 경우 사이토카인 또는 세포독성 분자를 생산할 수 있는, 방법.

청구항 106

제92항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 사이토카인이 TNF- α , IL-2, 및/또는 IFN- γ 인, 방법.

청구항 107

제92항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성 분자가 퍼포린 및/또는 그랜자임이고, 임의적으로 세포독성 분자가 그랜자임 B인, 방법.

청구항 108

제92항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 발현하는 표적 세포와 접촉되는 경우 더 높은 수준의 사이토카인 또는 세포독성 분자를 생산할 수 있는, 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 세포가 적어도 1.05배 더 높은 수준의 사이토카인 또는 세포독성 분자를 생산할 수 있는, 방법.

청구항 110

제92항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 MHC 분자의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체를 포함하는 표적 세포를 사멸시킬 수 있는, 방법.

청구항 111

제92항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 발현하는 표적 세포와 접촉되는 경우 더 많은 수의 표적 세포를 사멸시킬 수 있는, 방법.

청구항 112

제111항에 있어서, 숙주 세포가 적어도 1.05배 더 많은 수의 표적 세포를 사멸시킬 수 있는, 방법.

청구항 113

제92항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드가 아미노산 서열 YMLDLQPET를 포함하는, 방법.

청구항 114

제92항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, MHC 분자가 MHC 클래스 I 분자인, 방법.

청구항 115

제92항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, MHC 분자가 HLA 혈청형 HLA-A*02인 MHC 알파 사슬을 포함하는, 방법.

청구항 116

제92항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, HLA 대립유전자가 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:05, HLA-A*02:06, 및 HLA-A*02:07 대립유전자로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 117

제92항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포가 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 비-악성 세포 또는 과증식 세포인, 방법.

청구항 118

제92항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 119

제92항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 비-악성 세포 또는 과증식 세포에 대한 면역 반응을 유도하는, 방법.

청구항 120

제92항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 비-악성 세포 또는 과증식 세포에 대한 항원-특이적 T 세포 면역 반응을 유도하는, 방법.

청구항 121

제92항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-특이적 T 세포 면역 반응이 CD4⁺ 헬퍼 T 림프구(Th) 반응 및 CD8⁺ 세포독성 T 림프구(CTL) 반응 중 적어도 하나를 포함하는, 방법.

청구항 122

제83항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 장애가 HPV 감염과 연관되는, 방법.

청구항 123

제83항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, HPV 감염이 HPV16 감염인, 방법.

청구항 124

제83항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 두경부암인, 방법.

청구항 125

제83항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 두경부 편평 세포 암종(HNSCC)인, 방법.

청구항 126

제83항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 구인두암인, 방법.

청구항 127

제83항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 자궁경부암인, 방법.

청구항 128

제83항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 항문암인, 방법.

청구항 129

제83항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 질암인, 방법.

청구항 130

제83항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 외음부암인, 방법.

청구항 131

제83항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 음경암인, 방법.

청구항 132

제92항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 조혈 세포 이식(HCT)을 받고 있거나 이전에 받았고, 임의적으로 HCT가 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하지 않고/거나 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항의 결합 단백질에 의해 인식되지 않고/거나 혈청형 HLA-A*02가 아니고/거나 HLA-A*02:01 대립유전자를 발현하지 않는 세포를 포함하는, 방법.

청구항 133

제132항에 있어서, HCT가 HLA 성분을 인코딩하는 유전자의 염색체 녹아웃, TCR 성분을 인코딩하는 유전자의 염색체 녹아웃, 또는 둘 모두를 포함하는 공여자 조혈 세포를 포함하는, 방법.

청구항 134

제92항 내지 제133항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 이전에 림프교갈성 화학요법을 받은, 방법.

청구항 135

제134항에 있어서, 림프교갈성 화학요법이 사이클로포스파미드, 플루다라빈, 항-흉선세포 글로불린 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 136

제92항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발에 대한 적어도 하나의 추가 치료제를 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 137

제92항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발에 대한 적어도 하나의 추가 치료제가 조성물과 동시에 또는 순차적으로 투여되는, 방법.

청구항 138

제81항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애의 동물 모델 및/또는 포유동물이고, 임의적으로 포유동물이 인간, 영장류 또는 설치류인, 방법.

청구항 139

CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된

프로모터를 포함하며, 임의적으로 선택가능한 단백질 마커는 DHFR인, 발현 벡터.

청구항 140

제139항에 있어서, CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열은 태그가 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커에 융합되도록 태그를 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결되는, 벡터.

청구항 141

제139항 또는 제140항에 있어서, 태그를 인코딩하는 핵산은 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커의 N-말단에 태그가 융합되도록 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열의 5' 업스트림에 있는, 벡터.

청구항 142

제139항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 태그가 CD34 농축 태그인, 벡터.

청구항 143

제139항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터가 TCR α 및/또는 TCR β 를 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 벡터.

청구항 144

제139항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, TCR α , TCR β , 및/또는 DN-TGF β RII가 돌연변이된 막횡단 도메인 및/또는 돌연변이된 불변 도메인을 포함하는, 벡터.

청구항 145

제139항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이된 막횡단 도메인 및/또는 돌연변이된 불변 도메인이 TCR α , TCR β , 및/또는 DN-TGF β RII의 세포 표면 발현을 향상시키면서 내인성 TCR α , TCR β , 및/또는 TGF β RII의 발현을 감소시키는, 벡터.

청구항 146

제139항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 선택가능한 단백질 마커, TCR α , 및/또는 TCR β 를 인코딩하는 핵산 서열이 내부 리보솜 진입 부위 또는 자가-절단 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열과 상호연결되는, 벡터.

청구항 147

제139항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-절단 펩티드가 P2A, E2A, F2A 또는 T2A인, 벡터.

청구항 148

제139항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터가 표 1에 열거된 폴리펩티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열 또는 표 1에 열거된 폴리펩티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산에 대해 적어도 약 80% 상동성을 갖는 서열을 추가로 포함하며, 임의적으로 분리된 핵산 분자는 1) 표 1에 열거된 TRAV, TRAJ 및/또는 TRAC 유전자의 군으로부터 선택되는 TRAV, TRAJ 및 TRAC 유전자 또는 이의 단편 및/또는 2) 표 1에 열거된 TRBV, TRBJ 및 TRBC 유전자의 군으로부터 선택되는 TRBV, TRBJ 및/또는 TRBC 유전자 또는 이의 단편을 포함하는, 벡터.

청구항 149

제139항 내지 제148항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터가 표 3에 제시된 핵산 서열 또는 이의 단편을 갖거나 포함하며, 임의적으로 단편은 DN-TGF β RII를 인코딩하는, 벡터.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 2022년 5월 16일에 출원된 미국 가출원 번호 63/342,479; 2022년 3월 7일에 출원된 미국 가출원 번호 63/317,326; 2021년 11월 10일에 출원된 미국 가출원 번호 63/277,901의 이익을 주장하며; 각각의 상기 출원의 전체 내용은 이 참조로서 그 전체가 본원에 포함된다.

배경 기술

발명의 배경

인유두종 바이러스(HPV)는 많은 고형 종양(예를 들어, 미국에서 매년 20,000-30,000건의 HPV-연관된 암이 진단됨)에서 발견되는 발암성 바이러스로 두경부암의 25% 초과, 구인두암의 70% 초과, 자궁경부암 및 항문암의 90% 초과, 질암, 외음부암, 음경암의 60% 초과를 포함한 다양한 악성종양에 대한 원인이다. HPV E6 및 E7 단백질과 같은 HPV 항원은 1) HPV 단백질이 종양 형성을 촉진하고 암세포 생존에 필수적이고, 2) HPV 단백질이 모든 종양 세포에서 발현되므로 균질한 표적 발현을 초래하고, 3) HPV 단백질은 필수 건강한 조직에 의해 발현되지 않으므로 HPV를 표적화할 때 건강한 조직 독성을 피할 수 있다는 것을 포함한 다수의 이유로 강력한 표적이다. HPV 항원을 표적화하는 TCR-T 세포 요법으로부터의 초기 임상 데이터는 1상 시험(시험 NCT02858310)에서 치료된 환자의 50%(환자 12명 중 6명)에서 종양 축소 및 객관적 반응을 입증했다. 환자의 25 퍼센트(12명 중 3명)는 하나 이상의 종양의 완전한 퇴행을 입증했다. HPV 항원의 발현이 특징인 장애를 치료하는 것과 같은 HPV-특이적 TCR 면역요법을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

발명의 개요

본 발명은 적어도 부분적으로, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 인식하는 T 세포 수용체(TCR)를 포함하는 결합 단백질의 발현에 기초한다.

일 양태에서, a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 CDR 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 알파 사슬 CDR 서열에 대해 적어도 약 80% 동일성을 갖는 TCR 알파 사슬 CDR 서열; 및/또는 b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 CDR 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 베타 사슬 CDR 서열에 대해 적어도 약 80% 동일성을 갖는 TCR 베타 사슬 CDR 서열을 포함하는 결합 단백질로서, 결합 단백질은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합할 수 있으며, 임의적으로 결합 친화성이 약 5×10^{-4} M 이하의 K_d 를 갖는, 결합 단백질이 제공된다.

또 다른 양태에서, a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 가변(V_α) 도메인 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR V_α 도메인 서열에 대해 적어도 약 80% 동일성을 갖는 TCR V_α 도메인 서열; 및/또는 b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 가변(V_β) 도메인 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR V_β 도메인 서열에 대해 적어도 약 80% 동일성을 갖는 TCR V_β 도메인 서열을 포함하는 결합 단백질로서, 결합 단백질은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합할 수 있고, 임의적으로 결합 친화성이 약 5×10^{-4} M 이하의 K_d 를 갖는, 결합 단백질이 제공된다.

여전히 또 다른 양태에서, a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 알파 사슬 서열에 대해 적어도 약 80% 동일성을 갖는 TCR 알파 사슬 서열; 및/또는 b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 베타 사슬 서열에 대해 적어도 약 80% 동일성을 갖는 TCR 베타 사슬 서열을 포함하는 결합 단백질로서, 결합 단백질은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합할 수 있고, 임의적으로 결합 친화성이 약 5×10^{-4} M 이하의 K_d 를 갖는, 결합 단백질이 제공된다.

또 다른 양태에서, a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 CDR 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 알파 사슬 CDR 서열; 및/또는 b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 CDR 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 베타 사슬 CDR 서열을 포함하는 결합 단백질로서, 결합 단백질은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합할 수 있고, 임의적으로 결합 친화성은 약 5×10^{-4} M 이하의 K_d 를 갖는, 결합 단백질이 제공된다.

- [0011] 또 다른 양태에서, a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 가변(V_α) 도메인 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR V_α 도메인 서열; 및/또는 b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 가변(V_β) 도메인 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR V_β 도메인 사슬 서열을 포함하는 결합 단백질로서, 결합 단백질은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합할 수 있고, 임의적으로 결합 친화성은 약 5×10^{-4} M 이하의 K_d 를 갖는, 결합 단백질이 제공된다.
- [0012] 여전히 또 다른 양태에서, a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 알파 사슬 서열; 및/또는 b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 베타 사슬 서열을 포함하는 결합 단백질로서, 결합 단백질은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합할 수 있고, 임의적으로 결합 친화성은 약 5×10^{-4} M 이하의 K_d 를 갖는, 결합 단백질이 제공된다.
- [0013] 본 발명에 의해 포함되는 임의의 양태에 적용되고/거나 본원에 기재된 임의의 다른 구체예와 조합될 수 있는 다수의 구체예가 추가로 제공된다. 예를 들어, 일 구체예에서, 1) TCR 알파 사슬 CDR, TCR V_α 도메인 및/또는 TCR 알파 사슬은 표 1에 열거된 TRAV, TRAJ 및 TRAC 유전자의 군으로부터 선택되는 TRAV, TRAJ 및/또는 TRAC 유전자 또는 이의 단편에 의해 인코딩되고/거나 2) TCR 베타 사슬 CDR, TCR V_β 도메인 및/또는 TCR 베타 사슬은 표 1에 열거된 TRBV, TRBJ 및 TRBC 유전자의 군으로부터 선택되는 TRBV, TRBJ 및/또는 TRBC 유전자 또는 이의 단편에 의해 인코딩되고/거나 3) 결합 단백질의 각각의 CDR은 표 1에 열거된 동족 기준 CDR 서열과 비교하여 5개 이하의 아미노산 치환, 삽입, 결실 또는 이들의 조합을 갖는다. 또 다른 구체예에서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드는 아미노산 서열 YMLDLQPET를 포함한다. 여전히 또 다른 구체예에서, 결합 단백질은 키메라, 인간화 또는 인간 결합 단백질이다. 또 다른 구체예에서, 결합 단백질은 TCR, TCR의 항원-결합 단편, 단일 사슬 TCR(scTCR), 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 TCR 및 이펙터 도메인을 포함하는 융합 단백질이며, 임의적으로 결합 도메인은 막횡단 도메인 및 세포내에 있는 이펙터 도메인을 포함한다. 다른 구체예에서, TCR 알파 사슬 및 TCR 베타 사슬은 공유적으로 연결되고, 임의적으로 TCR 알파 사슬 및 TCR 베타 사슬은 링커 펩티드를 통해 공유적으로 연결된다. 다른 구체예에서, TCR 알파 사슬 및/또는 TCR 베타 사슬은 모이어티에 공유적으로 연결되며, 임의적으로 공유적으로 연결된 모이어티는 친화성 태그 또는 표지를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 친화성 태그는 CD34 농축 태그, 글루타민-S-트랜스퍼라제(GST), 칼모듈린 결합 단백질(CBP), 단백질 C 태그, Myc 태그, HaloTag, HA 태그, Flag 태그, His 태그, 비오틴 태그 및 V5 태그로 구성된 군으로부터 선택되고/거나 표지는 형광 단백질이다. 추가의 또 다른 구체예에서, 공유적으로 연결된 모이어티는 염증제, 사이토카인, 독소, 세포독성 분자, 방사성 동위원소 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로 구성된 군으로부터 선택된다. 또 다른 구체예에서, 결합 단백질은 세포 표면 상의 pMHC 복합체에 결합한다. 또 다른 구체예에서, MHC는 MHC 멀티머이고, 임의적으로 MHC 멀티머는 테트라머이다. 다른 구체예에서, MHC는 MHC 클래스 I 분자이다. 또 다른 구체예에서, MHC는 HLA 혈청형 HLA-A*02인 MHC 알파 사슬을 포함한다. 추가의 또 다른 구체예에서, HLA 대립유전자는 HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0205, HLA-A*0206 및 HLA-A*0207 대립유전자로 구성된 군으로부터 선택된다. 또 다른 구체예에서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 대한 본원에 기재된 결합 단백질의 결합은 면역 반응을 유발하며, 임의적으로 면역 반응은 T 세포 반응이다. 추가의 또 다른 구체예에서, T 세포 반응은 T 세포 확장(예를 들어, 증식), 사이토카인 방출 및/또는 세포독성 사멸로 구성된 군으로부터 선택된다. 추가의 또 다른 구체예에서, 결합 단백질은 약 1×10^{-4} M 이하, 약 5×10^{-5} M 이하, 약 1×10^{-5} M 이하, 약 5×10^{-6} M 이하, 약 1×10^{-6} M 이하, 약 5×10^{-7} M 이하, 약 1×10^{-7} M 이하, 약 5×10^{-8} M 이하, 약 1×10^{-8} M 이하, 약 5×10^{-9} M 이하, 약 1×10^{-9} M 이하, 약 5×10^{-10} M 이하, 약 1×10^{-10} M 이하, 약 5×10^{-11} M 이하, 약 1×10^{-11} M 이하, 약 5×10^{-12} M, 또는 약 1×10^{-12} M 이하의 K_d 로 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 특이적으로 및/또는 선택적으로 결합할 수 있다. 추가의 또 다른 구체예에서, 결합 단백질은 공지된 T-세포 수용체보다 펩티드-MHC(pMHC)에 대해 더 높은 결합 친화성을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 결합 단백질은 공지된 T-세포 수용체보다 펩티드-MHC(pMHC)에 대해 적어도 1.05배 더 높은 결합 친화성을 갖는다. 추가의 또 다른 구체예에서, 결합 단백질은 공지된 T-세포 수용체보다 더 높은 T 세포 확장, 사이토카인 방출 및/또는 세포독성 사멸을 유도한다. 추가의 또 다른 구체예에서, 결합 단백질은 공지된 T-세포 수용체보다 적어도 1.05배 증가된 T 세포 확장, 사이토카인 방출 및/또는 세포독성 사멸을 유도한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 배수 변화에 대한 언급은 일부 구체예에서, 임의의 관심 기준 양식과의 비교, 예컨대, 상이한 결합 단백질과의 비교; 본원에 기재된 다른 제제와 조합

하여 상이한 수준의 상이한 면역 세포에서의 동일한 결합 단백질의 발현과 같이 상이한 맥락 하에 동일한 결합 단백질과의 비교; 동일 수 있다. 또 다른 구체예에서, 표적 세포는 CaSki, SCC152 또는 SCC090 세포주이다. 또 다른 구체예에서, 표적 세포는 암 세포이고, 임의적으로 암 세포는 두경부암 세포, 구인두암 세포, 자궁경부암 세포, 항문암 세포, 질암 세포, 외음부암 세포, 또는 음경암 세포이다. 또 다른 구체예에서, 본원에 기재된 결합 단백질은 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합하지 않으며, 펩티드는 아미노산 서열 YMLDLQPET을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본원에 기재된 결합 단백질은 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합하지 않으며, 임의적으로 펩티드는 SPTA1, MPL, HERC1, CPAMD8, INTS4, NUTM1 또는 XM_00172256으로부터 유래된다. 이들 유전자는 잘 알려져 있고 다음 NCBI 유전자 ID 번호에 따라 주석이 달린 것으로 당업계에서 인식되고 있으며, 그 각각은 ncbi.nlm.nih.gov/gene에서의 World Wide Web에서 이용가능하다: SPTA1: 유전자 ID 6708; MPL: 유전자 ID 4352; HERC1: 유전자 ID 8925; CPAMD8: 유전자 ID 27151; INTS4: 유전자 ID 92105; 및 NUTM1: 유전자 ID 256646. XM_00172256: 염색체 20의 이색 동원체 영역에 매핑되고 RefSeq 주석에서 제거되어 그 발현에 대한 증거가 부족함을 나타낸다.

[0014] 추가의 또 다른 양태에서, 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 및 베타 사슬 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 알파 사슬 및/또는 베타 사슬이 제공된다.

[0015] 또 다른 양태에서, 엄격한 조건 하에, 표 1에 열거된 폴리펩티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 또는 표 1에 열거된 폴리펩티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산에 대해 적어도 약 80% 상동성을 갖는 서열의 상보체와 혼성화되는 분리된 핵산 분자로서, 임의적으로 분리된 핵산 분자는 1) 표 1에 열거된 TRAV, TRAJ 및/또는 TRAC 유전자의 군으로부터 선택되는 TRAV, TRAJ 및 TRAC 유전자 또는 이의 단편 및/또는 2) 표 1에 열거된 TRBV, TRBJ 및 TRBC 유전자의 군으로부터 선택되는 TRBV, TRBJ 및/또는 TRBC 유전자 또는 이의 단편을 포함하는, 분리된 핵산 분자가 제공된다.

[0016] 본 발명에 의해 포함되는 임의의 양태에 적용되고/거나 본원에 기재된 임의의 다른 구체예와 조합될 수 있는 다수의 구체예가 추가로 제공된다. 예를 들어, 일 구체예에서, 핵산은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈 최적화된 다.

[0017] 추가의 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 분리된 핵산을 포함하는 벡터가 제공된다.

[0018] 본 발명에 의해 포함되는 임의의 양태에 적용되고/거나 본원에 기재된 임의의 다른 구체예와 조합될 수 있는 다수의 구체예가 추가로 제공된다. 예를 들어, 일 구체예에서, 벡터는 클로닝 벡터, 발현 벡터 또는 바이러스 벡터이다. 또 다른 구체예에서, 벡터는 CD8 α , CD8 β , 우성 음성 TGF β 수용체 II(DN-TGF β RII), 선택가능한 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하며, 임의적으로 선택가능한 단백질 마커는 디하이드로폴레이트 환원효소(DHFR)이다. 더욱 또 다른 구체예에서, CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열은 태그를 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된다. 또 다른 구체예에서, 태그를 인코딩하는 핵산은 태그가 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커의 N-말단에 융합되도록 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열의 5' 업스트림에 있다. 또 다른 구체예에서, 태그는 CD34 농축 태그이다. 또 다른 구체예에서, 본원에 기재된 분리된 핵산은, 단독으로 (예를 들어, TCR α 및/또는 TCR β 를 인코딩함), 또는 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열과 조합하여 내부 리보솜 진입 부위 또는 자가-절단 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열과 상호연결된다. 추가의 또 다른 구체예에서, 자가-절단 펩티드는 P2A, E2A, F2A 또는 T2A이다.

[0019] 추가의 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 분리된 핵산을 포함하고/거나 본원에 기재된 벡터를 포함하고/거나 본원에 기재된 결합 단백질을 발현하는 숙주 세포로서, 임의적으로 세포가 유전자 조작되는, 숙주 세포가 제공된다.

[0020] 본 발명에 의해 포함되는 임의의 양태에 적용되고/거나 본원에 기재된 임의의 다른 구체예와 조합될 수 있는 다수의 구체예가 추가로 제공된다. 예를 들어, 일 구체예에서, 숙주 세포는 TCR 유전자, HLA 유전자 또는 이 둘 모두의 염색체 유전자 녹아웃을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 α 1 마크로글로불린 유전자, α 2 마크로글로불린 유전자, α 3 마크로글로불린 유전자, β 1 마이크로글로불린 유전자, β 2 마이크로글로불린 유전자 및 이들의 조합으로부터 선택되는 HLA 유전자의 녹아웃을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 TCR α 가변 영역 유전자, TCR β 가변 영역 유전자, TCR 불변 영역 유전자 및 이들의 조합으로부터 선택되는 TCR 유전자의 녹아웃을 포함한다. 더욱 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 발현하며, 임의적으로 선택가능한 단백질 마커는 DHFR이다. 추가의 또 다른 구체예에서, CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커는 CD34 농축 태그에 융합된다. 또 다른 구체예에서,

숙주 세포는 CD34 농축 태그를 사용하여 농축된다. 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 면역 세포이다. 또 다른 구체예에서, 면역 세포는 세포독성 림프구, 세포독성 림프구 전구 세포, 세포독성 림프구 간세포, 세포독성 림프구 줄기 세포, $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, $CD4/CD8$ 이중 음성 T 세포, 감마 델타($\gamma\delta$) T 세포, 자연 살해(NK) 세포, NK-T 세포, 수지상 세포 또는 이들의 조합이다. 또 다른 구체예에서, T 세포는 나이브 T 세포, 중심 기억 T 세포, 이펙터 기억 T 세포 또는 이들의 조합이다. 추가의 또 다른 구체예에서, T 세포는 일차 T 세포 또는 T 세포주의 세포이다. 더욱 또 다른 구체예에서, T 세포는 내인성 TCR을 발현하지 않거나 이의 더 낮은 표면 발현을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 MHC 분자의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체를 포함하는 표적 세포와 접촉되는 경우 사이토카인 또는 세포독성 분자를 생산할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 표적 세포와 접촉된다. 더욱 또 다른 구체예에서, 사이토카인은 TNF- α , IL-2 및/또는 IFN- γ 이다. 또 다른 구체예에서, 세포독성 분자는 퍼포린 및/또는 그랜자임이며, 임의적으로 세포독성 분자는 그랜자임 B이다. 추가의 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 발현하는 표적 세포와 접촉되는 경우 더 높은 수준의 사이토카인 또는 세포독성 분자를 생산할 수 있다. 더욱 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 적어도 1.05배 더 높은 수준의 사이토카인 또는 세포독성 분자를 생산할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 MHC 분자의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체를 포함하는 표적 세포를 사멸시킬 수 있다. 더욱 또 다른 구체예에서, 사멸은 사멸 검정에 의해 결정된다. 추가의 또 다른 구체예에서, 사멸 검정에서 숙주 세포와 표적 세포의 비는 20:1 내지 0.625:1이다. 또 다른 구체예에서, 표적 세포는 1 μ g/mL 내지 50 pg/mL의 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드로 펄싱된 T2 세포이다. 추가의 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 발현하는 표적 세포와 접촉되는 경우 더 많은 수의 표적 세포를 사멸시킬 수 있다. 추가의 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 적어도 1.05배 더 많은 수의 표적 세포를 사멸시킬 수 있다. 또 다른 구체예에서, 표적 세포는 CaSki, SCC152, 또는 SCC090 세포주이다. 추가의 또 다른 구체예에서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드는 아미노산 서열 YMLDLQPET를 포함한다. 또 다른 구체예에서, MHC 분자는 MHC 클래스 I 분자이다. 또 다른 구체예에서, MHC 분자는 HLA 혈청형 HLA-A*02인 MHC 알파 사슬을 포함한다. 추가의 또 다른 구체예에서, HLA 대립유전자는 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:05, HLA-A*02:06 및 HLA-A*02:07 대립유전자로 구성된 군으로부터 선택된다. 추가의 또 다른 구체예에서, 표적 세포는 CaSki, SCC152 및 SCC090 세포주로 구성된 군으로부터 선택되는 세포주이거나, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드를 발현하는 암 세포이거나, siHa 세포주가 아니고/아니거나 NCI-H1792 세포주가 아니다. 또 다른 구체예에서, 암 세포는 두경부암 세포, 구인두암 세포, 자궁경부암 세포, 항문암 세포, 질암 세포, 외음부암 세포 및 음경암 세포로 구성된 군으로부터 선택된다. 또 다른 구체예에서, a) 숙주 세포는 MHC 분자의 맥락에서 SPTA1, MPL, HERC1, CPAMD8, INTS4, NUTM1 및/또는 XM_00172256 펩티드 에피토프를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체를 포함하는 표적 세포와 접촉할 때 T 세포 확장, 사이토카인 방출 또는 세포독성 사멸을 유도하지 않고/거나 b) 숙주 세포는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하지 않고/거나, 본원에 기술된 결합 단백질에 의해 인식되지 않고/거나, 혈청형 HLA-A*02가 아니고/거나 HLA-A*02:01 및/또는 HLA-A*02:06과 같은 HLA-A*02 대립유전자를 발현하지 않는다.

[0021] 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 숙주 세포의 집단이 제공된다.

[0022] 추가의 또 다른 양태에서, a) 본원에 기재된 결합 단백질, b) 본원에 기재된 분리된 핵산, c) 본원에 기재된 벡터, d) 본원에 기재된 숙주 세포 및/또는 e) 본원에 기재된 숙주 세포의 집단, 및 담체를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0023] 추가의 또 다른 양태에서, a) 본원에 기재된 결합 단백질, b) 본원에 기재된 분리된 핵산, c) 본원에 기재된 벡터, d) 본원에 기재된 숙주 세포 및/또는 e) 본원에 기재된 숙주 세포의 집단을 포함하는 장치 또는 키트로서, 상기 장치 또는 키트는 임의적으로 pMHC 복합체의 a), d) 및/또는 e)의 결합을 검출하기 위한 시약을 포함하는, 장치 또는 키트가 제공된다.

[0024] 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 결합 단백질을 생산하는 방법으로서, 방법은 (i) 상기 결합 단백질의 발현을 허용하기에 적합한 조건 하에 본원에 기재된 결합 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하는 핵산에 의해 형질전환된 형질전환된 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 발현된 결합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다.

- [0025] 추가의 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 결합 단백질을 발현하는 숙주 세포를 생산하는 방법으로서, 방법은 (i) 본원에 기재된 결합 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 숙주 세포에 도입하는 단계; (ii) 상기 결합 단백질의 발현을 허용하기에 적합한 조건 하에 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0026] 추가의 또 다른 양태에서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 및/또는 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 세포의 존재 또는 부재를 검출하는 방법으로서, 임의적으로 세포가 과증식성 세포이며, 본원에 기재된 적어도 하나의 결합 단백질 또는 본원에 기재된 적어도 하나의 숙주 세포를 사용하여 샘플에서 상기 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함하며, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 검출이 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 및/또는 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 세포의 존재를 나타내는, 방법이 제공된다.
- [0027] 본 발명에 의해 포함되는 임의의 양태에 적용되고/거나 본원에 기재된 임의의 다른 구체예와 조합될 수 있는 다수의 구체예가 추가로 제공된다. 예를 들어, 일 구체예에서, 적어도 하나의 결합 단백질 또는 적어도 하나의 숙주 세포는 MHC 분자의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드와 복합체를 형성하고, 복합체는 형광 활성화된 세포 분류(FACS), 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사면역 검정(RIA), 면역화학, 웨스턴 블롯 또는 세포내 유동 검정의 형태로 검출된다. 또 다른 구체예에서, 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 것을 추가로 포함한다. 추가의 또 다른 구체예에서, 방법은 골수 생검에 의해 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 세포를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0028] 또 다른 양태에서, 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발의 수준을 검출하는 방법으로서, a) 대상체로부터 수득된 샘플을 본원에 기재된 적어도 하나의 결합 단백질, 본원에 기재된 적어도 하나의 숙주 세포 또는 본원에 기재된 숙주 세포의 모집단과 접촉시키는 단계; 및 b) 반응성의 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 대조군 수준과 비교하여 더 높은 수준의 반응성은 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발의 수준을 나타내는, 방법이 제공된다.
- [0029] 본 발명에 의해 포함되는 임의의 양태에 적용되고/거나 본원에 기재된 임의의 다른 구체예와 조합될 수 있는 다수의 구체예가 추가로 제공된다. 예를 들어, 일 구체예에서, 대조군 수준은 참조 번호이다. 또 다른 구체예에서, 대조군 수준은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발이 없는 대상체의 수준이다.
- [0030] 추가의 또 다른 양태에서, 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발의 진행을 모니터링하기 위한 방법으로서, 방법이 a) 대상체 샘플에서 본원에 기재된 바와 같은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 또는 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 관심 세포의 수준을 제1 시점에서 검출하는 단계; b) 후속 시점에서 단계 a)를 반복하는 단계; 및 c) 단계 a) 및 b)에서 검출된 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 또는 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 관심 세포의 수준을 비교하여 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발의 진행을 모니터링하는 단계를 포함하며, 단계 a)와 비교하여 단계 b)에서 검출된 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 또는 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 관심 세포의 부재 또는 감소된 수준은 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발의 억제된 진행을 나타내는, 방법이 제공된다.
- [0031] 본 발명에 의해 포함되는 임의의 양태에 적용되고/거나 본원에 기재된 임의의 다른 구체예와 조합될 수 있는 다수의 구체예가 추가로 제공된다. 예를 들어, 일 구체예에서, 대상체는 제1 시점과 후속 시점 사이에 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발을 치료하기 위한 치료를 받았다.
- [0032] 또 다른 양태에서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발에 대한 요법의 효능을 평가하는 방법으로서, a) HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발에 대한 요법의 적어도 일부를 대상체에게 제공하기 전에 대상체로부터 수득된 샘플과 본원에 기술된 적어도 하나의 결합 단백질, 본원에 기술된 적어도 하나의 숙주 세포 또는

본원에 기술된 숙주 세포의 집단 사이의 반응성의 존재 또는 수준을 대상체로부터 수득된 제1 샘플에서 결정하는 단계, 및 b) HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발에 대한 요법의 일부를 제공한 후 대상체로부터 수득된 샘플과 본원에 기술된 적어도 하나의 결합 단백질, 본원에 기술된 적어도 하나의 숙주 세포 또는 본원에 기술된 숙주 세포의 집단 사이의 반응성의 존재 또는 수준을 대상체로부터 수득된 제2 샘플에서 결정하는 단계를 포함하며, 제1 샘플과 비교하여 제2 샘플에서의 반응성의 부재 또는 감소된 수준은 상기 요법이 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발을 치료하는데 효과적임을 나타내는, 방법이 제공된다.

[0033] 본 발명에 의해 포함되는 임의의 양태에 적용되고/거나 본원에 기재된 임의의 다른 구체예와 조합될 수 있는 다수의 구체예가 추가로 제공된다. 예를 들어, 일 구체예에서, 반응성의 수준은 a) 결합의 존재 및/또는 b) T 세포 활성화 및/또는 이펙터 기능에 의해 표시된다. 또 다른 구체예에서, T 세포 활성화 또는 이펙터 기능은 T 세포 증식, 사멸 또는 사이토카인 방출이다. 추가의 또 다른 구체예에서, T 세포 결합, 활성화 및/또는 이펙터 기능은 형광 활성화된 세포 분류(FACS), 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사면역 검정(RIA), 면역화학, 웨스턴 블롯 또는 세포내 유동 검정을 사용하여 검출된다.

[0034] 또 다른 양태에서, 대상체에게 본원에 기재된 적어도 하나의 결합 단백질을 발현하는 세포를 포함하는 조성물을 치료학적 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발을 예방 및/또는 치료하는 방법.

[0035] 본 발명에 의해 포함되는 임의의 양태에 적용되고/거나 본원에 기재된 임의의 다른 구체예와 조합될 수 있는 다수의 구체예가 추가로 제공된다. 예를 들어, 일 구체예에서, 세포는 동종이계 세포, 동계 세포 또는 자가 세포이다. 또 다른 구체예에서, 세포는 유전자 변형된다. 추가의 또 다른 구체예에서, 세포는 TCR 유전자, HLA 유전자, 또는 TCR 유전자와 HLA 유전자 둘 모두의 염색체 유전자 녹아웃을 포함한다. 추가의 또 다른 구체예에서, 세포는 α1 마크로글로불린 유전자, α2 마크로글로불린 유전자, α3 마크로글로불린 유전자, β1 마이크로글로불린 유전자, β2 마이크로글로불린 유전자 및 이들의 조합으로부터 선택되는 HLA 유전자의 녹아웃을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 세포는 TCR α 가변 영역 유전자, TCR β 가변 영역 유전자, TCR 불변 영역 유전자 및 이들의 조합으로부터 선택되는 TCR 유전자의 녹아웃을 포함한다. 추가의 또 다른 구체예에서, 세포는 CD8 α, CD8 β, DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 발현하며, 임의적으로 선택가능한 단백질 마커는 DHFR이고, 더욱 임의적으로 CD8 α, CD8 β, DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커는 CD34 농축 태그에 융합된다. 추가의 또 다른 구체예에서, 세포는 CD34 농축 태그를 사용하여 농축된다. 또 다른 구체예에서, 면역 세포. 더욱 또 다른 구체예에서, 면역 세포는 세포독성 림프구, 세포독성 림프구 전구 세포, 세포독성 림프구 간세포, 세포독성 림프구 줄기 세포, CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, CD4/CD8 이중 음성 T 세포, 감마 델타(γ δ) T 세포, 자연 살해(NK) 세포, NK-T 세포, 수지상 세포 또는 이들의 조합이다. 추가의 또 다른 구체예에서, T 세포는 나이브 T 세포, 중심 기억 T 세포, 이펙터 기억 T 세포 또는 이들의 조합이다. 또 다른 구체예에서, T 세포는 일차 T 세포 또는 T 세포주의 세포이다. 추가의 또 다른 구체예에서, T 세포는 내인성 TCR을 발현하지 않거나 이의 더 낮은 표면 발현을 갖는다. 더욱 또 다른 구체예에서, 세포는 MHC 분자의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체를 포함하는 표적 세포와 접촉되는 경우 사이토카인 또는 세포독성 분자를 생산할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 사이토카인은 TNF-α, IL-2 및/또는 IFN-γ이다. 더욱 또 다른 구체예에서, 세포독성 분자는 퍼포린 및/또는 그랜자임이며, 임의적으로 여기서 세포독성 분자는 그랜자임 B이다. 추가의 또 다른 구체예에서, 세포는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 발현하는 표적 세포와 접촉되는 경우 더 높은 수준의 사이토카인 또는 세포독성 분자를 생산할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 세포는 적어도 1.05배 더 높은 수준의 사이토카인 또는 세포독성 분자를 생산할 수 있다. 더욱 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 MHC 분자의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체를 포함하는 표적 세포를 사멸시킬 수 있다. 더욱 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 발현하는 표적 세포와 접촉되는 경우 더 많은 수의 표적 세포를 사멸시킬 수 있다. 또 다른 구체예에서, 숙주 세포는 적어도 1.05배 더 많은 수의 표적 세포를 사멸시킬 수 있다. 추가의 또 다른 구체예에서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드는 아미노산 서열 YMLDLQPET를 포함한다. 또 다른 구체예에서, MHC 분자는 MHC 클래스 I 분자이다. 또 다른 구체예에서, MHC 분자는 HLA 혈청형 HLA-A*02인 MHC 알파 사슬을 포함한다. 추가의 또 다른 구체예에서, HLA 대립유전자는 HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:05, HLA-A*02:06 및 HLA-A*02:07 대립유전자로 구성된 군으로부터 선택된다. 더

혹 또 다른 구체예에서, 표적 세포는 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 비-악성 세포 또는 과증식성 세포이다. 또 다른 구체예에서, 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다. 추가의 또 다른 구체예에서, 조성물은 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 비-악성 세포 또는 과증식성 세포에 대한 면역 반응을 유도한다. 더욱 또 다른 구체예에서, 조성물은 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 비-악성 세포 또는 과증식성 세포에 대한 항원-특이적 T 세포 면역 반응을 유도한다. 또 다른 구체예에서, 항원-특이적 T 세포 면역 반응은 CD4⁺ 헬퍼 T 림프구(Th) 반응 및 CD8⁺ 세포독성 T 림프구(CTL) 반응 중 적어도 하나를 포함한다. 더욱 또 다른 구체예에서, 장애는 HPV16 감염과 같은 HPV 감염과 연관되어 있다. 또 다른 구체예에서, 암은 두경부암(예를 들어, 두경부 편평 세포 암종(HNSCC)), 구인두암, 자궁경부암, 항문암, 질암, 외음부암, 및/또는 음경암이다. 추가의 또 다른 구체예에서, 대상체는 조혈 세포 이식(HCT)을 받았거나 이전에 받았고, 임의적으로 HCT는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하지 않는 세포를 포함하고/거나 본원에 기재된 결합 단백질에 의해 인식되지 않고/거나 혈청형 HLA-A*02가 아니고/거나 HLA-A*02:01 대립유전자를 발현하지 않는다. 더욱 또 다른 구체예에서, HCT는 HLA 성분을 인코딩하는 유전자의 염색체 녹아웃, TCR 성분을 인코딩하는 유전자의 염색체 녹아웃, 또는 둘 모두를 포함하는 공여자 조혈 세포를 포함한다. 추가의 또 다른 구체예에서, 대상체는 이전에 림프구갈성 화학요법을 받았다. 또 다른 구체예에서, 림프구갈성 화학요법은 사이클로포스파미드, 플루다라빈, 항-흉선세포 글로불린 또는 이들의 조합을 포함하였다. 더욱 또 다른 구체예에서, 방법은 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발에 대한 적어도 하나의 추가 치료제를 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 더욱 또 다른 구체예에서, 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발에 대한 적어도 하나의 추가 치료제는 조성물과 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 또 다른 구체예에서, 대상체는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애의 동물 모델이고/거나 대상체는 포유동물이고, 임의적으로 포유동물은 인간, 영장류 또는 설치류이다.

[0036] 추가의 또 다른 양태에서, CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 벡터로서, 임의로 선택가능한 단백질 마커가 DHFR인, 발현 벡터가 제공된다.

[0037] 본 발명에 의해 포함되는 임의의 양태에 적용되고/거나 본원에 기재된 임의의 다른 구체예와 조합될 수 있는 다수의 구체예가 추가로 제공된다. 예를 들어, 일 구체예에서, CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열은 태그가 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커에 융합되도록 태그를 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된다. 또 다른 구체예에서, 태그를 인코딩하는 핵산은 태그가 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커의 N-말단에 융합되도록 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열의 5' 업스트림에 있다. 추가의 또 다른 구체예에서, 태그는 CD34 농축 태그이다. 추가의 또 다른 구체예에서, 벡터는 TCR α 및/또는 TCR β 를 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 또 다른 구체예에서, TCR α , TCR β 및/또는 DN-TGF β RII는 돌연변이된 막횡단 도메인 및/또는 돌연변이된 불변 도메인을 포함한다. 추가의 또 다른 구체예에서, 돌연변이된 막횡단 도메인 및/또는 돌연변이된 불변 도메인은 TCR α , TCR β 및/또는 DN-TGF β RII의 세포 표면 발현을 향상시키면서 내인성 TCR α , TCR β 및/또는 TGF β RII의 발현을 감소시킨다. 추가의 또 다른 구체예에서, CD8 α , CD8 β , DN-TGF β RII, 및/또는 선택가능한 단백질 마커, TCR α 및/또는 TCR β 를 인코딩하는 핵산 서열은 내부 리보솜 진입 부위 또는 자가-절단 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열과 상호연결된다. 또 다른 구체예에서, 자가-절단 펩티드는 P2A, E2A, F2A 또는 T2A이다. 추가의 또 다른 양태에서, 벡터는 표 1에 열거된 폴리펩티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열 또는 표 1에 열거된 폴리펩티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산에 대해 적어도 약 80% 상동성을 갖는 서열을 추가로 포함하며, 임의적으로 분리된 핵산 분자는 1) 표 1에 열거된 TRAV, TRAJ 및/또는 TRAC 유전자의 군으로부터 선택되는 TRAV, TRAJ 및 TRAC 유전자 또는 이의 단편 및/또는 2) 표 1에 열거된 TRBV, TRBJ 및 TRBC 유전자의 군으로부터 선택되는 TRBV, TRBJ 및/또는 TRBC 유전자 또는 이의 단편을 포함한다. 더욱 또 다른 구체예에서, 벡터는 표 3에 제시된 핵산 서열 또는 이의 단편을 갖거나 포함하며, 임의적으로 단편은 DN-TGF β RII를 인코딩한다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도면의 간단한 설명

아래에 달리 기술하지 않는 한, MGMT-변형된 버전의 TCR(예를 들어, E7-11-28 MGMT)을 사용하여 도면에 도시되

고 작업 실시예에 예시된 데이터를 생성했다.

도 1은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 서열을 도시한다.

도 2는 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 인식하는 다양한 TCR의 선택을 도시한다. 사백오십구(459)개 HPV16 E7₁₁₋₁₉(YMLDLQPET)-특이적 TCR이 독점 ReceptorScan 플랫폼을 사용하여 식별되었다. 간략하게, CD14⁺ 단핵구는 -4일차에 HLA-A*02:01 건강한 공여자의 PBMC로부터 분리되었고 성숙한 DC로 분화되었다. -1일차에, 나이브 CD8 T 세포를 자가 PBMC로부터 분리하고 밤새도록 휴지시켰다. 나이브 CD8 T 세포와 DC의 공동-배양은 다중화된 ReceptorScan 스크린의 일부로 1 µg/mL HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드를 사용하여 DC의 3시간 펄싱 후 11일간의 세포 확장 단계에 의해 수행되었다. 클론을 식별하기 위해 HLA-A*02:01-특이적 HPV16 E7₁₁₋₁₉(YMLDLQPET) 텍스트라머를 사용하여 텍스트라머 염색을 수행했다. DNA 바코드 텍스트라머를 사용하여 HPV16 E7₁₁₋₁₉-특이적 세포를 분리했다. TCR 알파 베타 쌍은 10X 유전체학 플랫폼으로 식별되었다.

Pan-T 세포를 형질도입하여 293개 HPV-특이적 TCR을 개별적으로 발현했다. TCR의 표면 발현은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 텍스트라머 염색으로 평가했다. 조작된 T 세포는 1 ng/mL HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드가 장입된 T2 세포 및 CaSki 세포와 같은 Incucyte® NucLight Red-표지 표적 세포와 공동-배양되었다. 표적 세포의 생존은 T 세포 세포독성의 관독으로서 시간-의존적 영상화에 의해 정량화되었다. 비-형질전환된 세포(NTD)가 대조군으로 사용되었다. HPV16 및 HLA-A*02:01 양성 및 음성 세포주에 대한 표면 발현 및 세포독성 잠재력에 대한 추가 평가를 위해 도 2에 나열된 293개 TCR 중 오십구(59)개를 선택했다.

도 3a - 도 3d는 발현 및 세포독성 기능을 기준으로 HPV16 E7₁₁₋₁₉ TCR을 선별한 결과를 도시한다. HLA-A*02:01-양성 건강한 공여자로부터의 범-T 세포를 형질도입하여 상기 도 2에 기술된 VAYG 스크린으로부터 선택된 59개 HPV16 E7₁₁₋₁₉ TCR을 발현시켰다. 59개 TCR 중 이십사(24)개는 HPV16 E7₁₁₋₁₉(YMLDLQPET) 텍스트라머의 높은 표면 결합을 기반으로 선택되었고 시험관내 세포독성 검정에서 추가로 평가되어 '비교자 TCR'과 비교되었다. 도 3a는 A*02:01-특이적 HPV16 E7₁₁₋₁₉(YMLDLQPET) 텍스트라머 염색에 의해 평가된 24개 TCR의 표면 발현의 도트 플롯을 도시한다. HLA-A*02:01⁺ HPV16⁺ 표적 세포주, CaSki(도 3b), SCC152(도 3c) 및 SCC090(도 3d)에 대한 이들 TCR의 세포독성 반응이 도시되어 있다. 조작된 T 세포를 표시된 이펙터 세포 대 표적 세포(E:T) 비율로 Incucyte®NucLight Red 표지된 표적 세포주와 공동-배양하고 그 생존율을 IncuCyte®에서 T 세포의 세포독성의 관독값으로 정량화했다.

도 4a - 도 4k는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ TCR의 기능 평가 결과를 도시한다. 3개의 HLA-A*02:01-양성 건강한 공여자 PBMC로부터 분리된 범 T 세포를 형질도입하여 HPV16 E7₁₁₋₁₉-특이적 TCR, E7-11-194, E7-11-176 및 E7-11-28, 및 '비교자 TCR'을 발현시켰고 HPV16 및 HLA-A*02:01에 대해 양성 및 음성 표적 세포에 대한 기능적 반응에 대해 평가했다. 도 4a는 A*02:01-특이적 HPV16 E7₁₁₋₁₉(YMLDLQPET) 텍스트라머 염색에 의해 평가된 E7₁₁₋₁₉ 특이적 TCR의 발현을 나타내는 도트 플롯 결과를 도시한다. HLA-A*02:01⁺ HPV16⁺ 표적 세포주, CaSki(도 4b 및 도 4c), SCC152(도 4d 및 도 4e), SCC090(도 4d 및 도 4g), HLA-A*02:01⁺ HPV16⁺ 음성 대조군 세포주 SiHa(도 4h 및 도 4i), 및 HLA-A*02:01⁺ HPV16⁻ 세포주 NCI-H1792(도 4j 및 도 4k)에 대한 E7₁₁₋₁₉-특이적 TCR의 기능적 반응이 도시되어 있다. 조작된 T 세포를 Incucyte® NucLight Red-표지된 표적 세포주와 표시된 E:T 비율로 공동-배양하고 그 생존율을 IncuCyte®에서 T 세포의 세포독성 관독값으로 정량화했다. 24시간(E:T 1:1)의 공동-배양 상등액에서 IFN-γ, IL-2, TNF-α 및 그랜자임 B의 생산을 분석하여 도시한다. T 세포-단독 조건을 사용하여 사이토카인 생산의 배경 수준을 결정하였다. 점선은 T 세포-단독 조건에서 사이토카인의 최고 수준(즉, T 세포에 의한 사이토카인 생산 또는 증식의 배경 수준)을 나타낸다. 세포독성 검정의 경우 일원 ANOVA를 사용하고 TCR을 '비교자 TCR'과 비교하는 Dunnett의 다중 비교 테스트를 사용하여 평균을 비교했다. CaSki, SCC152 및 SCC090 세포주들의 경우, 단지 비-유의미한 차이만 도시된다. 나머지 차이는 P<0.05로 유의미하다. SiHa 및 NCI-H1792 세포주에서는 유의미한 차이가 없다.

도 5는 TCR E7-11-28이 110개 HLA 유형 중 108개에 대해 동종반응성을 나타내지 않음을 도시한다. TCR E7-11-28-발현 범 T 세포 또는 형질도입되지 않은 대조군 T 세포를 미국 연구에서 110개의 가장 빈번하게 접하는 클래스 I MHC 중 하나를 재-발현하는 MHC-null HEK293T 세포와 48시간 동안 공동-배양했다. E7₁₁₋₁₉ 에피토프 (YMLDLQPET)와 HLA-A*02:01을 함유하는 HPV16-E7의 단편 둘 모두를 발현하는 HEK293T 세포로 구성된 양성 대조군이 스크린에 포함되었다. 형질도입되지 않은 대조군 T 세포에 의한 것과 비교하여 TCR E7-11-28-발현 범 T 세포에 의한 표적 세포 성장에 대한 억제 효과는 동종 MHC 분자에 대한 TCR E7-11-28의 반응성의 관독값으로서 공동-배양의 48시간 후에 측정되었다. 양성 대조군과 동종반응성 대립유전자(표적 세포 억제 > 20%)가 표시되어 있다.

도 6a 및 도 6b는 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 인식하는 다양한 TCR의 추가 선택을 도시한다. HLA-A*02:01 양성 건강한 공여자 PBMC로부터 분리된 범 T 세포를 형질도입하여 개별적으로 161개 HPV16 E7₁₁₋₁₉-특이적 TCR과 '비교자 TCR'을 발현시켰다. 도 6a는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 텍스트라머 염색 및 200 pg/ml의 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 및 HLA-A*02:01⁺ HPV16⁺ 표적 세포주 SCC152로 펠싱된 T2 세포에 대한 세포독성 반응에 의해 평가된 TCR의 표면 발현에 대한 대표적인 데이터를 도시한다. 도 6b는 161개 TCR 중 15개가 HPV16 및 HLA-A*02:01 양성 및 음성 세포주에 대한 표면 발현 및 세포독성 가능성에 대한 추가 평가를 위해 선택되었음을 도시한다.

도 7은 발현 및 세포독성 기능을 기준으로 HPV16 E7₁₁₋₁₉ TCR을 선별한 결과를 도시한다. HLA-A*02:01 양성 건강한 공여자 PBMC로부터 분리된 범 T 세포를 형질도입하여 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 특이적 TCR E7-11-28 및 E7-11-455와 '비교자 TCR'을 발현시키고 HPV16 및 HLA-A*02:01에 대해 양성 및 음성 표적 세포에 대한 세포독성 반응을 평가했다. HLA-A*02:01⁺ HPV16⁺ 표적 세포주 CaSki, SCC152, SCC090, HLA-A*02:01⁻ HPV16⁺ 음성 대조군 세포주 SiHa 및 HLA-A*02:01⁺ HPV16⁻ 세포주, NCI-H1792에 대한 E7₁₁₋₁₉-특이적 TCR의 기능적 반응이 도시되어 있다. 조작된 T 세포를 표시된 E:T 비율로 IncuCyte® NuLight™ Red-표지된 표적 세포주와 공동-배양하고 그 생존율을 IncuCyte®에서 T 세포의 세포독성 관독값으로 정량화했다. 세포독성 검정의 경우 일원 ANOVA를 사용하고 TCR을 '비교자 TCR'과 비교하는 Dunnett의 다중 비교 테스트를 사용하여 평균을 비교했다. *는 p<0.05를 나타낸다.

도 8은 TCR-28이 비교자 TCR에 비해 비슷한 세포독성 및 월등한 이펙터 기능을 나타냄을 입증하는 요약 결과를 제공한다.

도 9a - 도 9e는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ TCR에 의해 생성된 T 세포 증식 반응을 도시한다. 3개의 HLA-A*02:01 양성 건강한 공여자 PBMC로부터 분리된 범 T 세포를 형질도입하여 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 특이적 TCR E7-11-194, E7-11-176 및 E7-11-28과 '비교자 TCR'을 발현시켰고 HPV16 및 HLA-A*02:01에 대해 양성 및 음성 표적 세포에 대한 기능적 반응에 대해 평가했다. HPV16 E7₁₁₋₁₉-특이적 TCR-발현 T 세포의 증식을 결정하기 위해, 조작된 T 세포를 증식 염료로 표지하고 표적 세포주와 공동-배양하였다(CaSki, 도 9a; SCC152, 도 9b; SCC090, 도 9c; SiHa, 도 9d; 및 NCI-H1792, 도 9e 96시간 동안(E:T 1:1). 이들 세포주는 다음 특성을 갖는다: CaSki, SCC152 및 SCC090은 HLA-A*02:01+HPV16+이고; SiHa는 HLA-A*02:01-HPV16+이고; NCI-H1792는 HLA-A*02:01+HPV16-이다. 염료 희석을 사용하여 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포의 증식을 평가했다. 유세포분석법으로 분석하기 전에 계수 비드를 샘플에 추가하고 분할된 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포의 절대 수를 열거했다. T 세포-단독 조건을 사용하여 증식의 배경 수준을 결정했으며; 점선은 T 세포 단독 조건에서 가장 높은 수준의 증식을 나타낸다. 일원 ANOVA를 사용한 후 Dunnett의 다중 비교 테스트를 사용하여 평균을 비교했으며 TCR은 '비교자 TCR'과 비교하였다. CaSki(도 9a), SCC152(도 9b) 및 SCC090(도 9c) 세포주의 경우, 단지 비-유의미한(ns) 차이만 도시된다. 나머지 차이는 P<0.05에서 유의미하다.

도 10a 및 도 10b는 TCR E7-11-28에 대한 추정되는 표적-외를 식별하기 위한 게놈-와이드 SafetyScan 스크린의 결과를 도시한다. 도 10a는 대표적인 비-제한적 게놈-와이드 SafetyScan 스크린의 개관을 제공한다. 도 10b는 모든 야생형(w.t.) 인간 단백질에 걸쳐 있는 >600,000개 단백질 단편의 스크린에서 7개의 잠재적인 표적-외를 식별하는 TCR E7-11-28의 SafetyScan 스크린 데이터를 도시한다. 이 스크린은 전체-길이의 단백질보다 더 효율적으로 처리되는 90-aa 단백질 단편을 과발현하여 표적-외를 과대 예측하도록 설계되었다. 추정되는 표적-외는 유전자 이름으로 식별된다. XM_0017722256은 염색체 20의 이색 동원체 영역에 매핑되고 RefSeq 주석에서 제거되

어 그 발현에 대한 증거가 부족함을 나타낸다. 정상 조직 샘플, 암 세포주 및 종양 샘플을 포함한 51개 샘플의 RNA-seq 분석을 사용하여 이 유전자의 발현이 검출되지 않았다.

도 11a - 도 11j는 TCR E7-11-28이 추정되는 표적-외를 발현하는 암 세포주에 대해 반응성을 나타내지 않음을 보여준다. TCR E7-11-28-발현 범 T 세포 또는 NTD 세포를 게놈 와이드 안전성 스크린에서 식별된 표적-외를 자연적으로 발현하는 HLA-A*02:01+ 암 세포주에 대한 그 반응성에 대해 테스트했다. 도 11a, 11c, 11e, 11g, 11i는 E7₁₁₋₁₉ 펩티드를 펄싱되거나 펄싱되지 않고, TCR E7-11-28 또는 NTD 세포와 공동-배양한 표적 세포의 결과를 도시한다. 배양 상등액의 IFN γ 분비는 표적 세포에 대한 TCR E7-11-28의 반응성의 판독으로서 사용되었다. 펩티드-펄싱된 T2 세포를 양성 대조군으로 사용했다. HLA-A*02:01+HPV16+ SCC152 세포를 표시된 경우 추가 양성 대조군으로 사용했다. 다중 표적-외를 발현하는 세포주의 경우, 공동배양은 한 번만 수행되었지만 다수의 도면에 도시되어 있다. 도 11b, 11d, 11f, 11h 및 11j는 각각 대조군 유전자인 TBP에 비해 표적 세포에서 결정된 *HERC1*, *INTS4*, *CPAMD8*, *MPL* 및 *SPTA1*의 발현을 도시한다.

도 12a - 도 12i는 TCR E7-11-28이 건강한 인간 일차 세포에 대해 반응성을 나타내지 않음을 도시한다. TCR E7-11-28-발현 범 T 세포 또는 NTD 세포는 게놈-와이드 안전성 스크린에서 식별된 추정되는 표적-외를 자연적으로 발현하는 세포를 포함하여 일차 세포 또는 건강한 HLA-A*02:01+ 인간 공여자로부터의 iPS-유래된 세포의 패널에 대한 반응성에 대해 테스트되었다. 도 12a 내지 도 12o는 E7₁₁₋₁₉ 펩티드를 펄싱되거나 펄싱되지 않고 TCR E7-11-28 또는 NTD 세포와 공동-배양한 표적 세포의 결과를 도시한다. 배양 상등액의 IFN γ 분비는 표적 세포에 대한 TCR E7-11-28의 반응성의 판독으로서 사용되었다. HLA-A*02:01+HPV16+ SCC152 세포는 양성 대조군으로 사용되었고 HLA-A*02:01+ HPV16- NCI-H1792 세포 또는 펄싱되지 않은 T2 또는 OVCAR-3은 음성 대조군으로 사용되었다. 도 12p 및 도 12q는 각각 대조군 유전자인 TBP에 비해 표적 세포에서 측정된 *HERC1* 및 *INTS4*의 발현을 도시한다. RT = 역전사효소.

도 13a - 도 13d는 TCR E7-11-28이 생체내에서 종양 성장을 효율적으로 제어한다는 것을 도시한다. NCG 마우스는 마우스당 1×10^6 Caski 또는 1×10^6 SCC152 세포로 피하로 주사되었다(그룹당 n=8 마우스). 10일차에 종양이 $95 \pm 15 \text{ mm}^3$ 에 도달하면 마우스를 무작위화하고 11일차에 TCR E7-11-28, NTD 또는 비히클의 20×10^6 세포로 처리했다. 도 13a 및 도 13c는 TCR E7-11-28의 20×10^6 세포로 처리한 결과를 보여주며, 이는 생체내에서 종양 성장의 강력한 억제력을 입증한다. 도 13b 및 도 13d는 시간 경과에 따른 그룹당 개별 마우스 종양 성장의 결과를 도시한다. *p<0.05, 일원 ANOVA, 생체내 다중 비교 테스트에 대한 Holms-Sidak 보정. 도 13a 및 도 13c에 도시된 데이터 라인 라벨.

도 14는 우성 음성 TGF β 수용체 II(DN-TGF β RII)가 TGF β 시그널링의 억제 효과에 대한 DN-TGF β RII-발현 세포의 저항성을 제공한다는 것을 도시한다(예를 들어, DN-TGF β RII는 TCR E7-11-28에 TGF β -매개된 억제에 대해 저항성을 부여한다). T 세포는 각각 TCR E7-11-28 및 DN-TGF β RII를 인코딩하는 렌티바이러스로 공동-형질도입되었고 FACS는 DN-TGF β RII-양성 및 DN-TGF β RII-음성 분획으로 분류되었다. TCR-발현 T 세포 내의 세포내 IFN γ 는 펩티드-펄싱된 T2 세포 +/- 5 ng/mL TGF β 와의 공동-배양 24시간 후에 정량화되었다.

도 15a - 도 15c는 대표적인 pNVVD154 및 pNVVD160 벡터에서 TCR E7-11-28 및 DN-TGF β RII의 발현 및 기능 평가 결과를 도시한다. HLA-A*02:01-양성 건강한 공여자로부터 PBMC를 pNVVD154 및 pNVVD160 벡터를 사용하여 HPV16 TCR E7-11-28을 발현하도록 형질감염시켰다. 동일한 공여자로부터 형질감염되지 않은(UTF) PBMC를 대조군으로 사용했다. 도 15a는 A*02:01-특이적 HPV16 E7₁₁₋₁₉(YMLDLQPET) 텍스트라머 염색에 의해 평가된 TGF β RII, CD34 및 TCR E7-11-28의 표면 발현의 도트 플롯을 도시한다. 도 15b는 HLA-A*02:01⁺ HPV16⁺ 표적 세포주 CaSki 및 SCC152, 및 HLA-A*02:01⁺ HPV16⁻ 표적 세포주 NCI-H1792에 대한 TCR E7-11-28-조작된 T 세포의 세포독성 반응을 도시한다. 도 15a의 상단 패널은 IncuCyte® NucLight™ Red-표지된 표적 세포주 CaSki 및 NCI-H1792(E:T 비율 10:1) 및 SCC-152(E:T 비율 5:1)와 공동-배양된 조작된 T 세포의 결과를 도시하고, 이들의 생존율은 T 세포의 세포독성의 판독값으로 IncuCyte®에서 정량화되었다. 도 15b의 하단 패널은 CaSki, SCC-152 및 NCI-H1792 세포주에 대한 96시간에서의 표적 세포 생존을 도시한다. 도 15c는 T-세포 결합력을 테스트한 검정 결과를 도시한다. 예를 들어, HPV16 TCR E7-11-28-발현 T 세포는 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 펄싱된(0-1,000 pg/ml E7-펩티드)

IncuCyte® NuLight™-발현 T2 세포와 5:1의 E:T 비율에서 공동-배양되었다. 그래프는 공동-배양의 0 내지 96 시간 사이에 T2 세포 성장의 곡선 아래 면적(AUC)을 도시한다. 실험은 이중으로 수행되었다. Mann-Whitney t-테스트가 수행되었다.

막대 히스토그램, 곡선 또는 범례와 연관된 기타 데이터를 나타내는 임의의 도면의 경우, 각 표시에 대해 왼쪽에서 오른쪽으로 표시되는 막대, 곡선 또는 기타 데이터는 달리 명시하지 않는 한 범례의 위에서 아래로 또는 왼쪽에서 오른쪽으로 상자의 순서에 따라 직접적으로 대응한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 발명의 상세한 설명

[0040] 본 발명은 적어도 부분적으로 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원(예를 들어, 아미노산 서열, YMLDLQPET를 포함하는 면역원성 펩티드)을 인식하는 T 세포 수용체(TCR)를 포함하는 결합 단백질의 발견에 기초한다.

[0041] 따라서, 본 발명은 부분적으로 확인된 결합 단백질(예를 들어, TCR), 결합 단백질(예를 들어, TCR)을 발현하는 숙주 세포, 결합 단백질(예를 들어, TCR)을 포함하는 조성물 및 결합 단백질(예를 들어, TCR)을 발현하는 숙주 세포, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 세포에 대한 T 세포 반응을 진단, 예측 및 모니터링하는 방법, 및 결합 단백질(예를 들어, TCR)을 발현하는 숙주 세포를 투여함으로써 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발을 예방 및/또는 치료하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0042] I. 정의

[0043] 편의를 위해, 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에 사용된 특정 용어가 여기에 수집된다.

[0044] 관사 "a" 및 "an"은 본원에서 관사의 문법적 대상의 하나 또는 하나 초과(즉, 적어도 하나)를 지칭하는 데 사용된다. 예로서, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.

[0045] 용어 "투여하는"은 약제 또는 조성물을 대상체에게 제공하는 것을 의미하고, 의료 전문가에 의한 투여 및 자가-투여를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이는 당업자에게 공지된 임의의 다양한 방법 및 전달 시스템을 사용하여 치료제를 포함하는 조성물을 대상체에게 물리적으로 도입하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 결합 단백질에 대한 투여 경로는, 예를 들어, 주사 또는 주입에 의한 정맥내, 복강내, 근육내, 피하, 척수 또는 다른 비경구 투여 경로를 포함한다. 본원에서 사용되는 어구 "비경구 투여"는 일반적으로 주사에 의한 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하고, 비제한적으로 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 림프내, 병변내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 기관간, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입뿐만 아니라 생체내 전기천공을 포함한다. 대안적으로, 본원에 기재된 결합 단백질은 비-비경구 경로, 예컨대, 국소, 표피 또는 점막 투여 경로, 예를 들어, 비내, 경구, 질, 직장, 설하 또는 국소로 투여될 수 있다. 투여는 또한, 예를 들어, 1회, 복수회, 및/또는 하나 이상의 연장된 기간에 걸쳐 수행될 수 있다.

[0046] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "항원"은 임의의 천연 또는 합성 면역원성 물질, 예컨대, 단백질, 펩티드 또는 합텐을 지칭한다. 항원은 보호 또는 치료 면역 반응이 요망되는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 또는 이의 단편일 수 있다.

[0047] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "애주번트"는 항원의 투여 전, 이와 함께 또는 후에 투여될 때 항원 단독 투여와 비교하여 항원에 대한 면역 반응의 질 및/또는 강도를 가속화, 연장 및/또는 강화하는 물질을 지칭한다. 애주번트는 백신접종에 의해 유도된 면역 반응의 크기 및 지속기간을 증가시킬 수 있다.

[0048] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "항체"는 전체 항체 및 이의 임의의 항원 결합 단편(즉, "항원-결합 부분") 또는 단일 사슬을 포함한다. 일 구체예에서, "항체"는 디설파이드 결합에 의해 상호연결된 적어도 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 당단백질, 또는 이의 항원 결합 부분을 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 V_H로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 특정 자연 발생 항체에서, 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 특정 자연 발생 항체에서, 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 V_L로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 구성된다. V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역(FR)으로 지칭되는 보다 보존된 영역이 산재된 상보성 결정 영역(CDR)으로 지칭되는 추가변

성 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 은 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역 시스템의 다양한 세포(예를 들어, 이펙터 세포) 및 고전적 보체 시스템의 제1 성분(C1q)을 포함하는 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0049] 용어 "항원 제시 세포" 또는 "APC"는 전문 항원 제시 세포(예를 들어, B 림프구, 단핵구, 수지상 세포, 랑게르한스 세포) 뿐만 아니라 다른 항원 제시 세포(예를 들어, 케라티노사이트, 내피 세포, 성상세포, 섬유아세포 및 회소돌기아교세포)를 포함한다.

[0050] 본원에서 사용되는 바와 같은 결합 단백질, 예컨대, TCR의 "항원-결합 부분"이라는 용어는 항원(예를 들어, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 및 동족체 MHC/HLA)에 (예를 들어, 특이적으로 및/또는 선택적으로) 결합하는 능력을 보유하는 TCR의 하나 이상의 부분을 지칭한다. 이러한 부분은, 예를 들어, 약 8 내지 약 1500개 아미노산 길이, 적합하게는 약 8 내지 약 745개 아미노산 길이, 적합하게는 약 8 내지 약 300개, 예를 들어, 약 8 내지 약 200개 아미노산, 또는 약 10개 내지 약 50개 또는 100개 아미노산 길이이다. TCR의 항원-결합 기능은 전장 TCR의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. TCR의 용어 "항원-결합 부분" 내에 포함되는 결합 부분의 예는 (i) TCR의 V_α 및 V_β 도메인으로 구성된 Fv 단편, (ii) 분리된 상보성 결정 영역(CDR) 또는 (iii) 합성 링커에 의해 임의적으로 연결될 수 있는 2개 이상의 분리된 CDR의 조합물을 포함한다. 또한, V_α 및 V_β 는 별도의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 재조합 방법을 사용하여 V_α 및 V_β 영역이 쌍을 이루어 일가 분자(단일 사슬 TCR(scTCR)로 알려짐)를 형성하는 단일 단백질 사슬로 만들어 질 수 있게 하는 합성 링커에 의해 연결될 수 있다. 이러한 단일 사슬 TCR은 또한 TCR의 용어 "항원-결합 부분" 내에 포함되는 것으로 의도된다. 이러한 TCR 단편은 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 사용하여 수득될 수 있고, 단편은 완전한 결합 단백질과 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다. 항원-결합 부분은 재조합 DNA 기술에 의해, 또는 온전한 면역글로불린의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생산될 수 있다.

[0051] 용어 "상보성 결정 영역" 및 "CDR"은 "초가변 영역" 또는 "HVR"과 동의어이고, 특정 결합 단백질, 예컨대, TCR 가변 영역 내의 아미노산의 비-인접한 서열을 지칭하는 것으로 당 분야에 공지되어 있고, 이는 항원 특이성 및/또는 결합 친화성을 부여한다. TCR의 경우, 일반적으로, 각 α -사슬 가변 영역(α CDR1, α CDR2, 및 α CDR3)에 3개의 CDR 및 각 β -사슬 가변 영역(β CDR1, β CDR2 및 β CDR3)에 3개의 CDR이 존재한다. CDR3은 가공된 항원을 인식하는 주요 CDR인 것으로 여겨진다. CDR1 및 CDR2는 주로 MHC와 상호작용한다.

[0052] 용어 "체액"은 신체로부터 배설되거나 분비되는 체액 뿐만 아니라 신체로부터 정상적으로 배설되거나 분비되지 않는 체액을 지칭한다(예를 들어, 양수, 방수, 담즙, 혈액 및 혈장, 뇌척수액, 귀지 및 이구, 카우퍼액 또는 사정전액, 유미, 유미즙, 대변, 여성 사정액, 간질액, 세포내액, 림프, 월경, 모유, 점액, 흉막액, 고름, 타액, 피지, 정액, 혈청, 땀, 활액, 눈물, 소변, 질 윤활, 유리체액, 구토). 일부 구체예에서, 체액은 면역 세포를 포함하고, 임의적으로 면역 세포는 세포독성 T 세포 및/또는 NK 세포, CD4+ T 세포 등과 같은 세포독성 림프구이다.

[0053] 용어 "코딩 영역"은 아미노산 잔기로 번역되는 코돈을 포함하는 뉴클레오타이드 서열의 영역을 지칭하는 반면, 용어 "비코딩 영역"은 아미노산으로 번역되지 않는 뉴클레오타이드 서열의 영역(예를 들어, 5' 및 3' 비번역 영역)을 지칭한다.

[0054] 용어 "상보적"은 2개의 핵산 가닥의 영역 사이 또는 동일한 핵산 가닥의 2개 영역 사이의 서열 상보성의 광범위한 개념을 지칭한다. 제1 핵산 영역의 아데닌 잔기는 제2 핵산 영역의 잔기와 특정 수소 결합("염기쌍 형성")을 형성할 수 있는데, 이는 잔기가 티민 또는 우라실인 경우 제1 영역과 역평행인 것으로 공지되어 있다. 유사하게는, 제1 핵산 가닥의 시토신 잔기는 제2 핵산 가닥의 잔기와 염기쌍을 형성할 수 있는데, 이는 잔기가 구아닌인 경우 제1 가닥에 역평행인 것으로 알려져 있다. 핵산의 제1 영역은, 2개의 영역이 역평행 방식으로 배열될 때, 제1 영역의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 잔기가 제2 영역의 잔기와 염기 쌍을 형성할 수 있는 경우 동일하거나 상이한 핵산의 제2 영역에 상보적이다. 일부 구체예에서, 제1 영역은 제1 부분을 포함하고, 제2 영역은 제2 부분을 포함하고, 이에 의해, 제1 및 제2 부분이 역평행 방식으로 배열될 때, 제1 부분의 뉴클레오타이드 잔기의 적어도 약 50%, 및 다른 구체예에서, 적어도 약 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예를 들어, 적어도 약 80%-100%는 제2 부분의 뉴클레오타이드 잔기와 염기쌍을 형성할 수 있다. 일

부 구체예에서, 제1 부분의 모든 뉴클레오티드 잔기는 제2 부분의 뉴클레오티드 잔기와 염기쌍을 형성할 수 있다.

[0055] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "공동자극"은 활성화된 면역 세포와 관련하여 증식 또는 이펙터 기능을 유도하는 제2의 비-활성화 수용체 매개 신호("공동자극 신호")를 제공하는 공동자극 분자의 능력을 포함한다. 예를 들어, 공동자극 신호는, 예를 들어, T 세포-수용체-매개 신호를 수용한 T 세포에서 사이토카인 분비를 야기할 수 있다. 예를 들어, 활성화 수용체를 통해 세포-수용체 매개 신호를 받은 면역 세포는 본원에서 "활성화된 면역 세포"로 지칭된다.

[0056] "CD3"은 6개 사슬의 다중-단백질 복합체로서 당 분야에 공지되어 있다(문헌 [Abbas and Lichtman, Cellular and Molecular Immunology (9th Edition) (2018); Janeway 등 (Immunobiology) (9th Edition) (2016)] 참조). 포유동물에서, 복합체는 CD3 γ 사슬, CD3 δ 사슬, 2개의 CD3 ϵ 사슬 및 CD3 ζ 사슬의 동종이량체를 포함한다. CD3 γ , CD3 δ 및 CD3 ϵ 사슬은 단일 면역글로불린 도메인을 함유하는 면역글로불린 슈퍼패밀리의 관련 세포 표면 단백질이다. CD3 γ , CD3 δ 및 CD3 ϵ 사슬의 막횡단 영역은 음으로 하전되며, 이는 이러한 사슬이 T 세포 수용체 사슬의 양으로 하전된 영역 또는 잔기와 회합할 수 있게 하는 것으로 여겨지는 특성이다. CD3 γ , CD3 δ 및 CD3 ϵ 사슬의 세포내 꼬리는 각각 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 IT AM으로 공지된 단일 보존 모티프를 함유하는 반면, 각각의 CD3 ζ 사슬은 3개의 ITAM을 갖는다. 이론에 국한시키려는 것은 아니지만, IT AM은 TCR 복합체의 신호전달 능력에 중요한 것으로 여겨진다. 본 발명에 따라 사용되는 CD3은 인간, 마우스, 래트 또는 다른 포유동물을 포함하는 다양한 동물 종으로부터 유래될 수 있다.

[0057] 본원에서 사용되는 바와 같은 "TCR 복합체의 성분"은 TCR 사슬(즉, TCR α , TCR β , TCR γ 또는 TCR δ), CD3 사슬(즉, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ 또는 CD3 ζ), 또는 2개 이상의 TCR 사슬 또는 CD3 사슬에 의해 형성된 복합체(예를 들어, TCR α 와 TCR β 의 복합체, TCR γ 와 TCR δ 의 복합체, CD3 ϵ 와 CD3 δ 의 복합체, CD3 γ 와 CD3 ϵ 의 복합체, 또는 TCR α , TCR β , CD3 γ , CD3 δ 및 2개의 CD3 ϵ 사슬의 서브-TCR 복합체)를 지칭한다.

[0058] "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 자연적으로 발생하지 않거나 숙주 세포에서 자연적으로 발생하지 않는 방식으로 함께 연결된 2개 이상의 아미노산 서열을 함유하도록 조작된 융합 단백질을 지칭하며, 이 융합 단백질은 세포의 표면에 존재하는 경우 수용체로서 기능할 수 있다. 본 발명에 의해 포함되는 CAR은 막횡단 도메인 및 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인(예컨대, 임의적으로 공동-자극 도메인(들)을 함유하는 이펙터 도메인)에 연결된 항원-결합 도메인(즉, 면역글로불린 또는 면역글로불린-유사 분자, 예컨대, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원에 특이적인 TCR, 단일 사슬 TCR-유래된 결합 단백질, 항체로부터 유래된 scFv, NK 세포로부터의 킬러 면역수용체로부터 유래되거나 수득된 항원 결합 도메인 등으로부터 수득되거나 유래됨)을 포함하는 세포의 부분을 포함한다(예를 들어, 문헌[Sadelain 등 (2013) *Cancer Discov.* 3:388; 또한 [Harris and Kranz (2016) *Trends Pharmacol. Sci.* 37: 220; Stone 등 (2014) *Cancer Immunol. Immunother.* 63:1163] 참조).

[0059] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "세포독성 T 림프구(CTL) 반응"은 세포독성 T 세포에 의해 유도된 면역 반응을 지칭한다. CTL 반응은 주로 CD8⁺ T 세포에 의해 매개된다.

[0060] 용어 "필수적으로 구성되는"은 "포함하는"과 동등하지 않고 청구범위의 특정 물질 또는 단계를 지칭하거나 청구된 주체의 기본 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것들을 지칭한다. 예를 들어, 단백질 도메인, 영역 또는 모듈(예를 들어, 결합 도메인, 힌지 영역, 링커 모듈) 또는 단백질(이는 하나 이상의 도메인, 영역 또는 모듈을 가질 수 있음)은 도메인, 영역, 모듈 또는 단백질의 아미노산 서열이 조합하여, 도메인, 영역, 모듈 또는 단백질의 길이의 최대 20%(예를 들어, 최대 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%)에 기여하거나 도메인(들), 영역(들), 모듈(들) 또는 단백질의 활성(예를 들어, 결합 단백질의 표적 결합 친화성)에 실질적으로 영향을 미치지 않는(즉, 활성을 50% 초과만큼 감소시키지 않음, 예를 들어, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 1% 이하) 연장, 결실, 변이 또는 이들의 조합(예를 들어, 아미노- 또는 카르복시-말단 또는 도메인 사이의 아미노산)을 포함하는 경우 특정 아미노산 서열을 필수적 요소로 하여 구성된다.

[0061] 용어 "대상체에 적합한 치료 요법을 결정하는 것"은 발명에 따른 분석의 결과를 기반으로 하거나 필수적으로 기반으로 하거나 적어도 부분적으로 기반으로 시작, 수정 및/또는 종료되는 대상체에 대한 치료 요법(즉, 대상체에서 바이러스 감염의 예방 및/또는 치료를 위해 사용되는 단일 요법 또는 다양한 요법의 조합)의 결정을 의미하는 것으로 간주된다. 한 가지 예는 재발 위험을 감소시키는 것이 목적인 수술 후 애주버트 요법을 시작하는 것이고, 다른 예는 특정 화학요법의 투여량을 변경하는 것일 것이다. 결정은, 본 발명에 따른 분석의 결과에 더하여, 치료될 대상체의 개인적 특성에 기초할 수 있다. 대부분의 경우, 대상체에 적합한 치료 요법의 실제 결정

은 주치의 또는 의사에 의해 수행될 것이다.

[0062] 용어 "우성 음성 TGF β 수용체" 또는 "DN-TGF β R"은 TGF β 시그널링에 대한 저항성을 제공하는 형질전환 성장 인자(TGF) 베타 수용체 변이체 또는 돌연변이체를 지칭한다.

[0063] 5개의 유형 II 수용체(활성화 수용체)와 7개의 유형 I 수용체(시그널링 수용체)가 있다. 활성 TGF β 수용체는 2개의 TGF β 수용체 I(TGF β RI)과 2개의 TGF β 수용체 II(TGF β RII)로 구성된 이종사량체이다. 일부 구체예에서, DN-TGF β R은 DN-TGF β RII(즉, TGF 베타 수용체 II 변이체 또는 돌연변이체)이다. 일부 구체예에서 저항성은 T 세포와 같은 면역 세포에 대한 TGF β 시그널링의 억제 효과에 대한 것이며, TGF β 는 암 세포에 의해 또는 기질 세포, 대식세포, 골수 세포, 상피 세포, 자연 살해 세포 등과 같은 세포 환경 내의 다른 면역 세포에 의해 생성될 수 있다. TGF β 시그널링 억제제는 당업계에서 잘 알려져 있고, 수용체를 격리하여 시그널링을 억제하는 돌연변이체 TGF β , TGF β 및/또는 TGF β 수용체에 결합하는 항체(예를 들어, 레르텔리무맙, 메트리무맙, 프레슬리무맙, 및 등), TGF β 를 격리하는 TGF β 수용체의 부분과 같은 가용성 TGF β -결합 단백질(예를 들어, TGF β RII-Fc 융합 단백질) 또는 베타-글리칸과 같은 기타 결합제를 제한 없이 포함한다. 임의의 그리고 모든 공지된 TGF β 시그널링 억제제가 본원에 기술된 DN-TGF β R(예를 들어, DN-TGF β RII) 대신에 또는 그에 추가하여 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, DN-TGF β R에는 TGF β -매개된 시그널링에 필요한 세포내 부분, 예컨대 전체 세포내 도메인, 키나제 시그널링 도메인 등이 결합되어 있다. DN-TGF β R 작제물은 당업계에서 잘 알려져 있다 (Brand 등 (1993) *J. Biol. Chem.* 268:11500-11503; Weiser 등 (1993) *Mol. Cell Biol.* 13:7239-7247; Bollard 등 (2002) *Blood* 99:3179-3187; PCT Publ. WO 2009/152610; PCT Publ. WO 2017/156484; Kloss 등 (2018) *Mol. Ther.* 26:1855-1866; PCT Publ. WO. 2019/089884; PCT Publ. WO 2020/042647; 및 PCT Publ. WO 2020/042648에서 대표적인 비-제한적 구체예 참조.

[0064] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 하나 이상의 결합 단백질(예를 들어, TCR)을 포함하는 면역 세포 생성물(예를 들어, 조작된 T 세포)은 β -매개 면역억제에 저항성이다. 상기 및 본원에 추가로 기술된 바와 같이, TGF β 는 종양 세포 및 종양 미세환경의 세포에 의해 생산되는 면역억제성 사이토카인이다. TGF β 는 세포독성 및 Th1 헬퍼 T 세포의 기능과 확장을 억제하여 종양-특이적 T 세포 반응의 억제를 초래한다(Dahmani and Delisle (2018) *Cancers* 10:194). T 세포에서 TGF β 시그널링은 우성 음성 TGF β 유형 II 수용체(DN-TGF β RII)의 발현에 의해 폐기될 수 있다(Wieser 등 (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13:7239-7247; Bollard 등 (2002) *Blood* 99:3179-3187). TGF β 에 결합하면 야생형 TGF β RII는 인산화되어 TGF β RI를 활성화하고 세포내 시그널링을 시작한다. 이 시그널링 캐스케이드는 세포내 키나제 도메인(DN-TGF β RII)이 결합된 절두된 TGF β RII를 발현하는 세포에서 중단되어 세포에 TGF β 에 의한 억제에 대한 저항성을 부여한다. DN-TGF β RII는 조작된 T 세포(CAR-T 및 TCR-T 세포 둘 모두)에서 TGF β 시그널링을 차단한다(Bollard 등 (2002) *Blood* 99:3179-3187; Foster 등 (2008) *J. Immunother.* 31:500-505; Kloss 등 (2018) *Mol. Ther.* 26:1855-1866; Alabanza 등 (2022) *Front. Immunol.* 13:832645; Silk 등 (2022) *J. Immunol.* 208:169-180; Li 등 (2020) *Front. Oncol.* 10:1117). 대표적인 연구에서, 호지킨 림프종의 치료를 위한 DN-TGF β RII가 탑재된 EBV-특이적 T 세포를 평가한 결과, DN-TGF β RII로 조작된 T 세포가 안전하고 효능이 있는 것으로 나타났다(Bollard 등 (2018) *J. Clin. Oncol* 36:1128-1139).

[0065] "카이트 T-세포 수용체" 또는 "비교자 T-세포 수용체"는 미국 특허 번호 10,174,098 및 미국 특허 출원 번호 62/004,335; 61/846,167; 및 61/846,161에서 보고된 적어도 하나의 벤치마크 T-세포 수용체(예를 들어, "카이트-439")를 지칭한다. 일부 구체예에서, "카이트" 또는 "비교자" T 세포 수용체는 표 2에 제시된 서열을 갖는다.

[0066] 본원에서 사용되는 바와 같은 "상동성"은 동일한 핵산 가닥의 2개의 영역 사이 또는 2개의 상이한 핵산 가닥의 영역 사이의 뉴클레오타이드 서열 유사성을 지칭한다. 두 영역 모두의 뉴클레오타이드 잔기 위치가 동일한 뉴클레오타이드 잔기에 의해 점유될 때, 영역은 그 위치에서 상동성이다. 각 영역의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 잔기 위치가 동일한 잔기에 의해 점유되는 경우, 제1 영역은 제2 영역에 대해 상동성이다. 2개의 영역 사이의 상동성은 동일한 뉴클레오타이드 잔기가 차지하는 2개의 영역의 뉴클레오타이드 잔기 위치의 비율로 표현된다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 서열 5'-ATTGCC-3'를 갖는 영역 및 뉴클레오타이드 서열 5'-TATGGC-3'를 갖는 영역은 50% 상동성을 공유한다. 일부 구체예에서, 제1 영역은 제1 부분을 포함하고, 제2 영역은 제2 부분을 포함하고, 이에 의해, 각 부분의 뉴클레오타이드 잔기 위치의 적어도 약 50%, 및 다른 구체예에서, 적어도 약 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예를 들어, 적어도 약 80%-100%는 동일한 뉴클레오타이드 잔기에 의해 점유된다. 일부 구체예에서, 각 부분의 모든 뉴클레오타이드 잔기 위치는 동일한 뉴클레오타이드 잔기에

의해 점유된다.

- [0067] 용어 "인유두종 바이러스" 또는 "HPV"는 HPV16(NCBI Ref. Seq. NC_001526.4)과 같은, 그 일부 하위 유형의 감염이 암을 포함한 다수의 장애와 연관된 바이러스 계열을 지칭한다. 일부 경우에는 이러한 장애가 HPV 종양단백질인 E7(예를 들어, 세포 성장 제어를 조절하는 종양 억제자 시그널링 경로를 표적화하는 것으로 여겨짐)의 발현과 연관되어 있다.
- [0068] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원" 또는 "HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 항원" 또는 "HPV16 E7₁₁₋₁₉-합유 펩티드 항원" 또는 "HPV16 E7₁₁₋₁₉ 에피토프" 또는 "HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프" 또는 "HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드"는 YMLDLQPET 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 본질적으로 구성되는 HPV16 E7 종양단백질의 자연적으로 또는 합성적으로 생산된 펩티드 부분을 지칭한다
- [0069] 용어 "HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 과증식성 장애"는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원이 대상체에서 적어도 일부 과증식성 세포에 의해 발현되는 MHC(예를 들어, HLA) 복합체에 존재하는 임의의 과증식성 장애일 수 있다. HPV16 E7₁₁₋₁₉:HLA 복합체를 특징으로 하는 과증식성 장애의 예는 아래에 자세히 기술된 것과 같은 고품 악성종양을 포함한다.
- [0070] 용어 "면역 반응"은 T 세포 매개 및/또는 B 세포 매개 면역 반응을 포함한다. 예시적인 면역 반응은 T 세포 반응, 예를 들어, 사이토카인 생산 및 세포 세포독성을 포함한다. 또한, 용어 면역 반응은 T 세포 활성화, 예를 들어, 항체 생산(체액 반응) 및 사이토카인 반응성 세포, 예를 들어, 대식세포의 활성화에 의해 간접적으로 영향을 받는 면역 반응을 포함한다.
- [0071] 면역 반응 또는 면역 시스템을 자극하는 증가된 능력은 T 세포 공동자극 수용체의 향상된 효능제 활성화 및/또는 억제 수용체의 향상된 길항제 활성화로부터 야기될 수 있다. 면역 반응 또는 면역 시스템을 자극하는 증가된 능력은 면역 반응을 측정하는 검정, 예를 들어, 사이토카인 또는 케모카인 방출, 세포용해 활성(표적 세포에 대해 직접적으로 또는 CD107a 또는 그랜자임 검출을 통해 간접적으로 결정됨) 및 증식의 변화를 측정하는 검정에서 EC₅₀ 또는 최대 활성 수준의 배수 증가에 의해 반영될 수 있다. 면역 반응 또는 면역 시스템 활성을 자극하는 능력은 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 500% 이상 향상될 수 있다.
- [0072] 용어 "면역치료제"는 대상체에서 바이러스 감염에 대한 면역 반응을 발생시키기 위해 숙주 면역 시스템을 자극할 수 있는 임의의 분자, 펩티드, 항체 또는 다른 제제를 포함할 수 있다. 다양한 면역치료제가 본원에 기재된 조성물 및 방법에 유용하다.
- [0073] 용어 "면역 세포"는 골수의 조혈 줄기 세포로부터 기원하는 면역 시스템의 임의의 세포를 지칭하며, 이는 2개의 주요 계통을 발생시킨다: 골수 전구 세포(이는 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 거핵구 및 과립구와 같은 골수 세포를 발생시킴); 및 림프성 간세포(이는 림프계 세포, 예컨대, T 세포, B 세포 및 자연 살해(NK) 세포를 발생시킴). 예시적인 면역 시스템 세포는 CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, CD4 CD8 이중 음성 T 세포, gd T 세포, 조절 T 세포, 자연 살해 세포 및 수지상 세포를 포함한다. 대식세포 및 수지상 세포는 "항원 제시 세포" 또는 "APC"로 지칭될 수 있으며, 이는 펩티드와 복합체화된 APC의 표면 상의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 수용체가 T 세포 표면 상의 TCR과 상호작용하는 경우 T 세포를 활성화시킬 수 있는 특정화된 세포이다.
- [0074] "분리된 단백질"은 세포로부터 분리되거나 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 때 다른 단백질, 세포 물질, 분리 배지, 및 배양 배지, 또는 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없는 단백질을 지칭한다. "분리된" 또는 "정제된" 단백질 또는 이의 생물학적 활성 부분은 결합 단백질, 항체, 폴리펩티드, 펩티드 또는 융합 단백질이 유래된 세포 또는 조직 공급원으로부터의 세포 물질 또는 다른 오염성 단백질을 실질적으로 함유하지 않거나, 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 다른 화학물질로부터 실질적으로 함유하지 않는다. "세포 물질을 실질적으로 함유하지 않는"이라는 용어는 단백질이 분리되거나 재조합적으로 생산되는 세포의 세포 성분으로부터 분리된 바이오마커 폴리펩티드 또는 이의 단편의 제조물을 포함한다. 일 구체예에서, 언어 "세포 물질이 실질적으로 없는"은 약 30% 미만(건조 중량으로)의 비-바이오마커 단백질(본원에서 "오염성 단백질"로도 지칭됨) 또는 일부 구체예에서, 약 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% 미만, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예컨대, 약 1% 내지 5% 미만의, 비-바이오마커 단백질을 갖는 바이오마커 단백질 또는 이의 단편의 제조물을 포함한다. 결합 단백질, 항체, 폴리펩티드, 펩티드 또는 융합 단백질 또는 이의 단편, 예를 들어, 이의 생물학적 활성 단편이 재조합적으로 생산될 경우, 이는 배양 배지가 실질적으로 없을 수 있으며, 즉, 배양

배지는 단백질 제조물의 약 20%, 15%, 10%, 5%, 1% 미만, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예를 들어, 약 1% 내지 5% 미만의 부피 미만을 나타낸다.

[0075] 본원에서 사용되는 용어 "아이소타입"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 인코딩되는 항체 부류(예를 들어, IgM, IgG1, IgG2C 등)를 지칭한다.

[0076] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 " K_D "는 특정 결합 단백질-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭하는 것으로 의도된다. 본 발명에 포함되는 결합 단백질의 결합 친화성은 표준 결합 단백질-표적 결합 검정, 예를 들어, 경쟁 검정, 포화 검정 또는 표준 면역검정, 예컨대, ELISA 또는 RIA에 의해 측정되거나 결정될 수 있다. 상대적으로 더 낮은 K_D 값은 상대적으로 더 높은 결합 친화성을 나타낸다(예를 들어, 약 5×10^{-4} M(500 μ M) 이하의 K_D 값은 1×10^{-4} M(100 μ M)의 K_D 값을 포함하고, 100 μ M K_D 는 500 μ M K_D 와 비교하여 비교적 더 높은 결합 친화성을 나타낸다).

[0077] "키트"는 본 발명에 포함되는 마커의 발현을 특이적으로 검출하고/거나 이에 영향을 미치기 위한 적어도 하나의 시약, 예를 들어, 프로브 또는 소분자를 포함하는 임의의 제조물(예를 들어, 패키지 또는 용기)이다. 키트는 본 발명에 포함되는 방법을 수행하기 위한 단위로서 홍보, 배포 또는 판매될 수 있다. 키트는 본 발명에 포함되는 방법에 유용한 조성물을 발현시키는데 필요한 하나 이상의 시약을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 키트는 참조 표준, 예를 들어, 세포 성장, 분열, 이동, 생존 또는 아포토시스를 제어하는 신호전달 경로에 영향을 미치지 않거나 조절하지 않는 단백질을 인코딩하는 핵산을 추가로 포함할 수 있다. 당업자는 공통의 분자 태그(예를 들어, 녹색 형광 단백질 및 베타-갈락토시다제), GeneOntology 참조에 의한 세포 성장, 분열, 이동, 생존 또는 아포토시스를 포함하는 임의의 경로로 분류되지 않은 단백질, 또는 유비쿼터스 하우스키핑 단백질을 포함하나 이에 제한되지 않는 많은 이러한 대조군 단백질을 구상할 수 있다. 키트의 시약은 개별 용기에 제공되거나 단일 용기에 2개 이상의 시약의 혼합물로 제공될 수 있다. 또한, 키트 내의 조성물의 사용을 설명하는 설명서 자료가 포함될 수 있다.

[0078] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "연결된"은 2개 이상의 분자의 회합을 지칭한다. 연결은 공유 또는 비공유일 수 있다. 연결은 또한 유전적일 수 있다(즉, 재조합적으로 융합됨). 이러한 연결은 화학적 컨주게이션 및 재조합 단백질 생산과 같은 다양한 당 분야에서 인정된 기술을 사용하여 달성될 수 있다.

[0079] 일부 구체예에서, "링커"는 2개의 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 도메인, 영역 또는 모티프를 연결하는 아미노산 서열을 지칭할 수 있고, 2개의 하위-결합 도메인의 상호작용과 양립 가능한 스페이서 기능을 제공하여 생성된 폴리펩티드는 표적 분자에 대한 특이적 결합 친화성을 유지하거나(예를 들어, scTCR) 신호전달 활성을 유지한다(예를 들어, TCR 복합체). 일부 구체예에서, 링커는 예를 들어, 약 2 내지 약 35개의 아미노산, 또는 약 4 내지 약 20개의 아미노산 또는 약 8 내지 약 15개의 아미노산 또는 약 15 내지 약 25개의 아미노산으로 구성된다.

[0080] "주요 조직적합성 복합체"(MHC)는 펩티드 항원을 세포 표면에 전달하는 당단백질을 지칭한다. MHC 클래스 I 분자는 사슬(3개의 α 도메인을 가짐)에 걸친 막 및 비공유적으로 회합된 β_2 마이크로글로불린을 갖는 헤테로다이머이다. MHC 클래스 II 분자는 2개의 막횡단 당단백질 α 및 β 로 구성되며, 둘 모두는 막에 걸쳐 있다. 각 사슬은 2개의 도메인을 갖는다. MHC 클래스 I 분자는 시토솔에서 기원하는 펩티드를 세포 표면으로 전달하며, 여기서 펩티드 항원-MHC(pMHC) 복합체는 $CD8^+$ T 세포에 의해 인식된다. MHC 클래스 II 분자는 소포 시스템에서 기원하는 펩티드를 세포 표면으로 전달하며, 여기서 이들은 $CD4^+$ T 세포에 의해 인식된다. 인간 MHC는 인간 백혈구 항원(HLA)으로 지칭된다.

[0081] 용어 "예방하다", "예방하는", "예방", "예방적 치료" 등은 질환, 장애 또는 병태를 갖고 있지 않거나, 질병, 장애 또는 병태가 발병할 위험이 있거나 발병하기 쉬운 대상체에서 질병, 장애 또는 병태가 발병할 가능성을 감소시키는 것을 지칭한다.

[0082] 용어 "예후"는 바이러스 감염의 가능한 경과 및 결과 또는 질병으로부터의 회복 가능성의 예측을 포함한다. 일부 구체예에서, 통계적 알고리즘의 사용은 개체에서 바이러스 감염의 예후를 제공한다. 예를 들어, 예후는 수술, 바이러스 감염의 임상 서브타입의 발달, 하나 이상의 임상 인자의 발달 또는 질병으로부터의 회복일 수 있다.

[0083] 본원에 사용되는 바와 같은 아미노산 서열 사이의 "백분율 동일성"은 "백분율 상동성"과 동의어이며, 이는 문헌 [Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, modified by Karlin and Altschul

(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877]의 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. 언급된 알고리즘은 문헌 [Altschul 등 (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램에 포함된다. BLAST 뉴클레오타이드 검색은 NBLAST 프로그램, 점수 = 100, 단어 길이 = 12로 수행되어 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드에 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 수득한다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램, 점수 = 50, 단어 길이 = 3으로 수행되어 참조 폴리펩티드에 상동성인 아미노산 서열을 수득한다. 비교 목적을 위한 갭 정렬을 얻기 위해, Gapped BLAST가 문헌 [Altschul 등 (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402]에 기재된 바와 같이 사용된다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 사용할 때, 각각의 프로그램의 디폴트 파라미터(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)가 사용될 수 있다.

[0084] 어구 "약학적으로 허용되는 담체"는 대상 화합물을 하나의 기관 또는 신체의 일부로부터 또 다른 기관 또는 신체의 일부로 운반 또는 수송하는데 관여하는 약학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클, 예를 들어, 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제 또는 용매 캡슐화 물질을 의미한다.

[0085] 용어 "재조합 숙주 세포"(또는 간단히 "숙주 세포")는 세포에 자연적으로 존재하지 않는 핵산을 포함하는 세포, 예컨대, 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭한다. 본 발명에 따른 세포는 특정 대상 세포를 지칭할 뿐만 아니라 이러한 세포의 자손을 포함하는 것으로 의도된다. 특정 변형이 돌연변이 또는 환경 영향으로 인해 후속 세대에서 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은 실제로 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본 발명에 따른 용어 세포의 범위 내에 포함된다.

[0086] 용어 "암 반응", "면역요법에 대한 반응" 또는 "T-세포 매개 세포독성/면역요법 조합 요법의 조절제에 대한 반응"은 T-세포 매개된 세포독성의 조절제와 같은 암 제제, 및 면역요법에 대한 과증식성 장애(예를 들어, 암)의 임의의 반응, 바람직하게는 신애주변트 또는 애주변트 요법의 개시 후 종양 질량 및/또는 부피의 변화에 관한 것이다. 용어 "신애주변트 요법"은 일차 치료 전에 제공된 치료를 지칭한다. 신애주변트 요법의 예는 화학요법, 방사선 요법 및 호르몬 요법을 포함할 수 있다. 과증식성 장애 반응은, 예를 들어, 효능에 대해 또는 신애주변트 또는 애주변트 상황에서 평가될 수 있으며, 여기서 전신 개입 후 종양의 크기는 CT, PET, 유방조영상, 초음파 또는 촉진(palpation)에 의해 측정시 초기 크기 및 치수와 비교될 수 있다. 반응은 또한 생검 또는 외과적 절제 후 종양의 캘리퍼 측정 또는 병리학적 검사에 의해 평가될 수 있다. 반응은 종양 부피의 백분율 변화와 같은 정량적 방식으로 또는 "병리학적 완전 반응"(pCR), "임상 완전 관해"(cCR), "임상 부분 관해"(cPR), "임상 안정 질환"(cSD), "임상 진행성 질환"(cPD) 또는 다른 정성적 기준과 같은 정성적 방식으로 기록될 수 있다. 과증식성 장애 반응의 평가는 신애주변트 또는 애주변트 요법의 개시 후 초기에, 예를 들어, 수 시간, 수일, 수주 후 또는 바람직하게는 수개월 후에 수행될 수 있다. 반응 평가에 대한 전형적인 종점은 신애주변트 화학요법의 종료시 또는 잔류 종양 세포 및/또는 종양 베드의 외과적 제거시이다. 이는 전형적으로 신애주변트 요법의 개시 후 3개월이다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 치료적 치료의 임상 효능은 임상 이익률(CBR)을 측정함으로써 결정될 수 있다. 임상 이익률은 요법 종료로부터 적어도 6개월 시점에 완전 관해에 있는 환자의 백분율(CR), 부분 관해에 있는 환자의 수(PR) 및 안정한 질환을 갖는 환자의 수(SD)의 합을 결정함으로써 측정된다. 이 공식의 속기는 6개월에 걸친 $CBR=CR+PR+SD$ 이다. 일부 구체예에서, 특정 암 치료 요법에 대한 CBR은 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 그 초과이다. 암 요법에 대한 반응을 평가하기 위한 추가 기준은 "생존"과 관련되며, 이는 하기 모두를 포함한다: 전체 생존으로도 알려진 사망까지의 생존(상기 사망은 원인 또는 종양과 무관할 수 있음); "무재발 생존"(여기서, 용어 재발은 국소 재발 및 원격 재발 둘 모두를 포함할 것임); 무전이 생존; 무질병 생존(여기서, 질병이라는 용어는 암 및 이와 관련된 질병을 포함할 것임). 상기 생존 기간은 정의된 시작점(예를 들어, 진단 시점 또는 치료 시작) 및 종료점(예를 들어, 사망, 재발 또는 전이)을 참조하여 계산될 수 있다. 또한, 치료 효능에 대한 기준은 화학요법에 대한 반응, 생존 확률, 주어진 기간 내의 전이 확률, 및 종양 재발 확률을 포함하도록 확장될 수 있다. 예를 들어, 적절한 역치 값을 결정하기 위해, 특정 암 치료 요법이 대상체의 집단에 투여될 수 있고, 결과는 임의의 암 요법의 투여 전에 결정된 바이오마커 측정치와 상관관계가 있을 수 있다. 결과 측정은 신애주변트 환경에서 제공된 요법에 대한 병리학적 반응일 수 있다. 대안적으로, 전체 생존 및 무질병 생존과 같은 결과 측정은 바이오마커 측정 값이 공지된 암 요법 후 대상체에 대해 일정 기간에 걸쳐 모니터링될 수 있다. 특정 구체예에서, 투여되는 용량은 암 치료제에 대해 당 분야에 공지된 표준 용량이다. 대상체가 모니터링되는 기간은 다양할 수 있다. 예를 들어, 대상체는 적어도 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60개월 동안 모니터링될 수 있다. 암 요법의 결과와 상관관계가 있는 바이오마커 측정 임계값은 실시예 섹션에 기재된 것과 같은 당 분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0087] 나타낸 바와 같이, 이 용어는 또한 예를 들어, 재발의 증거가 없는 제1 사건 또는 사망으로서 제2 원발성 암

에 대한 제1 재발 검열까지의 기간인 재발에 대한 증가된 시간, 또는 치료로부터 어떠한 원인으로 인한 사망까지의 기간이 증가된 생존 기간에 의해 반영되는 바와 같은 개선된 예후를 지칭할 수 있다. 반응하거나 반응을 갖는다는 것은 자극에 노출될 때 달성되는 유익한 종말점이 있음을 의미한다. 대안적으로, 음성 또는 유해한 증상은 자극에 노출시 최소화, 완화 또는 악화된다. 종양 또는 대상체가 유리한 반응을 나타낼 가능성을 평가하는 것은 종양 또는 대상체가 유리한 반응을 나타내지 않을 (즉, 반응의 결여를 나타내거나 무반응일) 가능성을 평가하는 것과 동등하다는 것이 이해될 것이다.

[0088] 용어 "내성"은 암 샘플 또는 포유동물의 암 요법에 대한 후천적 또는 자연적 내성(즉, 치료적 치료에 대해 무반응성이거나 감소된 또는 제한된 반응을 가짐), 예컨대, 치료적 치료에 대해 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% 또는 그 초과, 예컨대, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 15-배, 20-배 또는 그 초과, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위만큼 감소된 반응을 가짐을 지칭한다. 반응의 감소는 내성이 획득되기 전에 동일한 암 샘플 또는 포유동물과 비교함으로써, 또는 치료학적 치료에 대해 내성이 없는 것으로 공지된 상이한 암 샘플 또는 포유동물과 비교함으로써 측정될 수 있다. 화학요법에 대한 전형적인 후천적 내성을 "다중약물 내성"이라고 한다. 다중약물 내성은 P-당단백질에 의해 매개될 수 있거나, 다른 기전에 의해 매개될 수 있거나, 포유동물이 다중-약물-내성 미생물 또는 미생물의 조합으로 감염될 때 발생할 수 있다. 치료적 치료에 대한 내성의 결정은 당 분야에서 통상적으로 숙련된 임상사의 기술내에 관례적이며, 예를 들어, "감작"으로서 본원에 기재된 바와 같은 세포 증식 검정 및 세포 사멸 검정에 의해 측정될 수 있다. 일부 구체예에서, 용어 "내성을 역전시킨다"는 일차 암 요법(예를 들어, 화학요법 또는 방사선 요법) 단독이 비치리된 종양의 종양 부피와 비교하여 종양 부피의 통계학적 유의한 감소를 생성할 수 없는 상황에서 일차 암 요법(예를 들어, 화학요법 또는 방사선 요법)과 함께 제2 제제의 사용이 비치리된 종양의 종양 부피와 비교하여 통계학적 유의한 수준(예를 들어, $p < 0.05$)으로 종양 부피의 유의한 감소를 유도할 수 있음을 의미한다. 이는 일반적으로 치료되지 않은 종양이 대수적으로 성장할 때 이루어진 종양 부피 측정에 적용된다.

[0089] 적어도 하나의 바이오마커의 부재, 존재 또는 수준을 검출하거나 결정하는데 사용되는 용어 "샘플"은 전형적으로 뇌 조직, 뇌척수액, 전혈, 혈장, 혈청, 타액, 소변, 대변(예를 들어, 대변), 눈물 및 임의의 다른 체액(예를 들어, "체액"의 정의 하에 상기 기재된 바와 같음), 또는 조직 샘플(예를 들어, 생검), 예컨대, 소장, 결장 샘플 또는 외과적 절제 조직이다. 일부 구체예에서, 본 발명에 포함되는 방법은 샘플 중 적어도 하나의 마커의 부재, 존재 또는 수준을 검출하거나 결정하기 전에 개체로부터 샘플을 수득하는 것을 추가로 포함한다.

[0090] 용어 "감작시키다"는 암 요법(예를 들어, 항-면역 체크포인트, 화학요법 및/또는 방사선 요법)으로 관련된 암의 보다 효과적인 치료를 가능하게 하는 방식으로 암 세포 또는 종양 세포를 변경하는 것을 의미한다. 일부 구체예에서, 정상 세포는 정상 세포가 요법에 의해 과도하게 손상되게 하는 정도로 영향을 받지 않는다. 치료적 치료에 대한 증가된 감수성 또는 감소된 감수성은 세포 증식 검정(Tanigawa 등 (1982) *Cancer Res.* 42:2159-2164) 및 세포 사멸 검정(Weisenthal 등 (1984) *Cancer Res.* 94:161-173; Weisenthal 등 (1985) *Cancer Treat Rep.* 69:615-632; Weisenthal 등, In: Kaspers G J L, Pieters R, Twentymann P R, Weisenthal L M, Veerman A J P, eds. *Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma*. Langhorne, P A: Harwood Academic Publishers, 1993:415-432; Weisenthal (1994) *Contrib. Gynecol. Obstet.* 19:82-90)을 포함하나 이에 제한되지 않는 하기 본원에 기술된 특정 치료 및 방법에 대해 당 분야에 공지된 방법에 따라 측정된다. 감수성 또는 내성은 또한 일정 기간, 예를 들어, 인간의 경우 6개월 및 마우스의 경우 4-6주에 걸쳐 종양 크기 감소를 측정함으로써 동물에서 측정될 수 있다. 조성물 또는 방법은 치료 감수성의 증가 또는 내성의 감소가 이러한 조성물 또는 방법의 부재하의 치료 감수성 또는 내성과 비교하여 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% 또는 그 초과, 예를 들어, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 15-배, 20-배 이상, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위인 경우 치료적 치료에 대한 반응을 감작시킨다. 치료적 치료에 대한 감수성 또는 내성의 결정은 당 분야에서 통상적으로 숙련된 임상사의 기술 범위 내에 있다. 암 요법의 효능을 향상시키기 위한 본원에 기재된 임의의 방법은 과증식성 또는 그렇지 않으면 암성 세포(예를 들어, 내성 세포)를 암 요법에 감작시키기 위한 방법에 동일하게 적용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0091] 용어 "소분자"는 당 분야의 용어이며, 약 1000 분자량 미만 또는 약 500 분자량 미만의 분자를 포함한다. 일 구체예에서, 소분자는 펩티드 결합을 배타적으로 포함하지 않는다. 또 다른 구체예에서, 소분자는 올리고머가 아니다. 활성에 대해 스크리닝될 수 있는 예시적인 소분자 화합물은 펩티드, 펩티드모방체, 핵산, 탄수화물, 소유기 분자(예를 들어, 폴리케타이드)(Cane 등 (1998) *Science* 282:63-68) 및 천연 생성물 추출물 라이브러리를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또 다른 구체예에서, 화합물은 작은 유기 비펩티드 화합물이다. 추가 구체예에

서, 소분자는 생합성이 아니다.

[0092] 용어 "특이적 결합"은 소정의 항원에 결합하는 결합 단백질을 지칭한다. 전형적으로, 결합 단백질은 관심 항원을 분석물로 사용하고 결합 단백질을 리간드로 사용하여 BIAcore™ 검정 장비의 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술과 같은 결합 검정에 의해 결정될 경우 약 5×10^{-4} M 이하, 약 1×10^{-4} M 이하, 약 5×10^{-5} M 이하, 약 1×10^{-5} M 이하, 약 5×10^{-6} M 이하, 약 1×10^{-6} M 이하, 약 5×10^{-7} M 이하, 약 1×10^{-7} M 이하, 약 5×10^{-8} M 이하, 약 1×10^{-8} M 이하, 약 5×10^{-9} M 이하, 약 1×10^{-9} M 이하, 약 5×10^{-10} M 이하, 약 1×10^{-10} M 이하, 약 5×10^{-11} M 이하, 약 1×10^{-11} M 이하, 약 5×10^{-12} M 이하, 약 1×10^{-12} M 이하, 또는 심지어 그 미만, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예를 들어, 약 1-50 마이크로몰, 1-100 마이크로몰, 0.1-500 마이크로몰 등의 친화성(K_D)으로 결합한다. 일부 구체예에서, 결합 단백질은 소정의 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비-특이적 항원(예를 들어, BSA, 카세인)의 결합에 대한 이의 친화성보다 적어도 1.1-, 1.2-, 1.3-, 1.4-, 1.5-, 1.6-, 1.7-, 1.8-, 1.9-, 2.0-, 2.5-, 3.0-, 3.5-, 4.0-, 4.5-, 5.0-, 6.0-, 7.0-, 8.0-, 9.0- 또는 10.0-배 이상의 친화도로 소정의 항원에 결합한다. 어구 "항원을 인식하는 결합 단백질" 및 "항원에 특이적인 결합 단백질"은 본원에서 용어 "항원에 특이적으로 결합하는 결합 단백질"과 상호교환적으로 사용된다. 선택적 결합은 관련 패밀리 구성원 또는 항원 표적에 비해 특정 패밀리 구성원 또는 항원 표적과 같은 다른 항원에 비해 한 항원의 결합을 구별하는 결합 단백질의 능력을 지칭하는 상대적인 용어이다. 예를 들어, 실시예 섹션에 제공된 분석 데이터는 본원에 기재된 결합 단백질이 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 에피토프에 특이적으로 결합하고/거나 다수의 관련 에피토프(예를 들어, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 에피토프 및 밀접하게 관련된 서열)에 선택적으로 결합하여 이러한 표적을 인간 게놈에서 이용 가능한 대다수의 다른 가능한 에피토프로부터 구별함을 입증한다.

[0093] 용어 "대상체"는 임의의 건강한 동물, 포유동물 또는 인간, 또는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발을 앓고 있는 임의의 동물, 포유동물 또는 인간을 지칭한다. 용어 "대상체"는 "환자"와 상호교환가능하다.

[0094] 용어 "생존"은 하기 모두를 포함한다: 전체 생존으로도 알려진 사망까지의 생존(상기 사망은 원인 또는 종양과 무관할 수 있음); "무재발 생존"(여기서, 용어 재발은 국소 재발 및 원격 재발 둘 모두를 포함할 것임); 무전이 생존; 무질병 생존(여기서, 질병이라는 용어는 암 및 이와 관련된 질병을 포함할 것임). 상기 생존 기간은 정의된 시작점(예를 들어, 진단 시점 또는 치료 시작) 및 종료점(예를 들어, 사망, 재발 또는 전이)을 참조하여 계산될 수 있다. 또한, 치료 효능에 대한 기준은 화학요법에 대한 반응, 생존 확률, 주어진 기간 내의 전이 확률, 및 종양 재발 확률을 포함하도록 확장될 수 있다.

[0095] 용어 "상승작용적 효과"는 암 제제/요법 단독의 개별 효과의 합보다 더 큰 2개 이상의 제제(예를 들어, 본원에 기재된 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 관련 제제 및 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애를 치료하기 위한 또 다른 요법)의 조합된 효과를 지칭한다.

[0096] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "T 세포-매개된 반응"은 이펙터 T 세포(예를 들어, CD8⁺ 세포) 및 헬퍼 T 세포(예를 들어, CD4⁺ 세포)를 포함하는 T 세포에 의해 매개되는 반응을 지칭한다. T 세포 매개된 반응은, 예를 들어, T 세포 세포독성 및 증식을 포함한다.

[0097] "전사된 폴리뉴클레오타이드" 또는 "뉴클레오타이드 전사체"는 바이오마커 핵산의 전사 및 존재하는 경우, RNA 전사체의 정상적인 전사-후 프로세싱(예를 들어, 스플라이싱), 및 RNA 전사체의 역전사에 의해 제조된 성숙한 mRNA의 전부 또는 일부에 상보적이거나 상동성인 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA, hnRNA, cDNA, 또는 이러한 RNA 또는 cDNA의 유사체)이다.

[0098] "T 세포"는 흉선에서 성숙하고 T 세포 수용체(TCR)를 생산하는 면역계 세포이다. T 세포는 나이브(항원에 노출되지 않음; T_{CM}과 비교하여 CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 및 CD45RA의 발현 증가, 및 CD45RO의 발현 감소), 기억 T 세포(T_M)(항원-경험 및 긴 수명), 및 이펙터 세포(항원-경험, 세포독성)일 수 있다. T_M은 중심 기억 T 세포(T_{CM}, 나이브 T 세포와 비교하여 CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO 및 CD95의 발현 증가, 및 CD54RA의 발현 감소) 및 이펙터 기억 T 세포(T_{EM}, 나이브 T 세포 또는 T_{CM}과 비교하여 CD62L, CCR7, CD28, CD45RA의 발현 감소, 및 CD127의 발현 증가)의 서브세트로 추가로 분할될 수 있다. 이펙터 T 세포(T_E)는 CD62L, CCR7, CD28의

발현이 감소하고, T_{CM} 과 비교하여 그랜자임 및 퍼포린에 대해 양성인 항원-경험된 CD8+ 세포독성 T 림프구를 지칭한다. 다른 예시적인 T 세포는 조절 T 세포, 예를 들어, $CD4^+ CD25^+(Foxp3^+)$ 조절 T 세포 및 Treg17 세포, 뿐만 아니라 Tr1, Th3, $CD8^+CD28$, 및 Qa-1 제한된 T 세포를 포함한다.

[0099] Tconv 또는 Teffs로도 공지된 통상적인 T 세포는 하나 이상의 T 세포 수용체의 발현으로 인해 면역 반응을 증가시키는 이펙터 기능(예를 들어, 사이토카인 분비, 세포독성 활성화, 항-자가-인지 등)을 갖는다. Tcons 또는 Teff는 일반적으로 Treg가 아니며, 예를 들어, 나이브 T 세포, 활성화된 T 세포, 기억 T 세포, 휴지기 Tcons, 또는 예를 들어, Th1 또는 Th2 계통으로 분화된 Tcons를 포함하는 임의의 T 세포 집단으로 정의된다. 일부 구체예에서, Teff는 비-Treg T 세포의 서브세트이다. 일부 구체예에서, Teff는 $CD4^+$ Teff 또는 $CD8^+$ Teff, 예를 들어, $CD4^+$ 헬퍼 T 림프구(예를 들어, Th0, Th1, Tfh, 또는 Th17) 및 $CD8^+$ 세포독성 T 림프구이다. 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 세포독성 T 세포는 $CD8^+$ T 림프구이다. "나이브 Tcon"은 골수에서 분화되었고, 흉선에서 양성 및 음성 중심 선택 과정을 성공적으로 거쳤지만, 항원에 대한 노출에 의해 아직 활성화되지 않은 $CD4^+$ T 세포이다. 나이브 Tcon은 일반적으로 L-셀렉틴($CD62L$)의 표면 발현, $CD25$, $CD44$ 또는 $CD69$ 와 같은 활성화 마커의 부재, 및 $CD45RO$ 와 같은 기억 마커의 부재를 특징으로한다. 따라서, 나이브 Tcon은 정지하고 비분화되어 항상성 생존을 위해 인터루킨-7(IL-7) 및 인터루킨-15(IL-15)를 필요로 하는 것으로 여겨진다(적어도 WO 2010/101870호 참조). 이러한 세포의 존재 및 활성화는 면역 반응을 억제하는 맥락에서 바람직하지 않다. Treg와 달리, Tcons는 비활동성이 아니며, 항원-기반 T 세포 수용체 활성화에 반응하여 증식할 수 있다(Lechler 등 (2001) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 356:625-637).

[0100] "T 이펙터" (" T_{eff} " 또는 " T_E ") 세포는 세포용해 활성을 갖는 T 세포(예를 들어, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포) 뿐만 아니라 사이토카인을 분비하고 다른 면역 세포를 활성화 및 지시하는 T 헬퍼(Th) 세포를 지칭하나, 조절 T 세포(Treg 세포)는 포함하지 않는다.

[0101] "T 세포 수용체" 또는 "TCR"은 MHC 수용체에 결합된 항원 펩티드에 (예를 들어, 특이적으로 및/또는 선택적으로) 결합할 수 있는 면역글로불린 슈퍼패밀리 구성원(가변 결합 도메인, 불변 도메인, 막횡단 영역, 및 짧은 세포질 꼬리를 가짐; 예를 들어, 문헌[Janeway 등 (1997) *Curr. Biol Publ.* 4:33] 참조)을 지칭한다. TCR은 세포의 표면에서 또는 가용성 형태로 발견될 수 있고, 일반적으로 알파 및 베타 사슬(각각 TCR α 및 TCR β 로도 공지됨), 또는 γ 및 δ 사슬(각각 TCR γ 및 TCR δ 로도 공지됨)을 갖는 헤테로다имер로 구성된다. 면역글로불린(예를 들어, 항체)과 마찬가지로, TCR 사슬(예를 들어, α -사슬 및 β -사슬)의 세포의 부분은 2개의 면역글로불린 도메인을 함유한다: N-말단에서 가변 도메인(예를 들어, α -사슬 가변 도메인 또는 V_α 및 β -사슬 가변 도메인 또는 V_β ; 일반적으로 Kabat 넘버링에 기반한 아미노산 1 내지 116(Kabat 등 (1991) "서열s of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 5th ed.) 및 세포 막에 인접하고 C-말단의 하나의 불변 도메인(예를 들어, α -사슬 불변 도메인 또는 C_α , 전형적으로 Kabat 기반의 아미노산 117 내지 259, β -사슬 불변 도메인 또는 C_β , 전형적으로 Kabat 기반의 아미노산 117 내지 295). 또한 면역글로불린과 마찬가지로, 가변 도메인은 프레임워크 영역("FR")에 의해 분리된 상보성 결정 영역("CDR", 추가변 영역 또는 "HVR"이라고도 함)을 함유한다(예를 들어, 문헌[Fores 등 (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. US.A.* 87:9138; Chothia 등 (1988) *EMBO J.* 7:3745; Lefranc 등 (2003) *Dev. Comp. Immunol.* 27:55] 참조). 일부 구체예에서, TCR은 T 세포(또는 T 림프구)의 표면에서 발견되고 CD3 복합체와 회합한다. 본 발명에 포함되는 TCR의 공급원은 다양한 동물 종, 예컨대, 인간, 마우스, 래트, 토끼 또는 다른 포유동물로부터 유래될 수 있다.

[0102] 용어 "T 세포 수용체" 또는 "TCR"은 완전한 TCR 뿐만 아니라 이의 항원-결합 부분 또는 항원-결합 단편을 포함하는 것으로 이해되어야한다. 일부 구체예에서, TCR은 $\alpha\beta$ 형태 또는 $\gamma\delta$ 형태의 TCR을 포함하는 온전한 또는 전장 TCR이다. 일부 구체예에서, TCR은 전장 TCR보다 작지만 MHC 분자에 결합된 특정 펩티드에 결합하는, 예를 들어, MHC-펩티드 복합체에 결합하는 항원-결합 부분이다. 일부 경우에, TCR의 항원-결합 부분 또는 단편은 전장 또는 온전한 TCR의 구조적 도메인의 일부만을 함유할 수 있지만, 전장 TCR이 결합하는 MHC-펩티드 복합체와 같은 펩티드 에피토프에 여전히 결합할 수 있다. 일부 경우에, 항원-결합 부분은 특정 MHC-펩티드 복합체에 결합하기 위한 결합 부위를 형성하기에 충분한 TCR의 가변 도메인, 예를 들어, TCR의 가변 α 사슬 및 가변 β 사슬을 함유한다. 일반적으로, TCR의 가변 사슬은 펩티드, MHC 및/또는 MHC-펩티드 복합체의 인식과 관련된 상보성 결정 영역(CDR)을 함유한다.

- [0103] 국제 면역유전학 정보 시스템(International Immunogenetics Information System, IMGT)에 의해 확립된 명명법 (또한 Scaviner and Lefranc (2000) *Exp. Clin. Immunogenet.* 17:83-96 and 97-106; Folch and Lefranc (2000) *Exp. Clin. Immunogenet.* 17: 107-114; T Cell Receptor Factsbook", (2001) LeFranc and LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8 참조). IMGT는 TCR을 기술하는데 사용되는 고유한 서열을 제공하고, 본원에 기재된 서열은 본원에 제공된 이러한 고유한 서열을 참조하여 확인될 수 있다. TCR 서열은 imgt.org의 IMGT 데이터베이스에서 공개적으로 이용 가능하다.
- [0104] 상기 기재된 바와 같이, 나이트 알파/베타 헤테로다이어머 TCR은 알파 사슬 및 베타 사슬을 갖는다. 광범위하게, 각각의 사슬은 가변, 연결 및 불변 영역을 포함하고, 베타 사슬은 또한 일반적으로 가변 및 연결 영역 사이에 짧은 다양성 영역을 포함하지만, 이러한 다양성 영역은 종종 연결 영역의 일부로 간주된다. 각각의 가변 영역은 프레임워크 서열에 내장된 3개의 초가변 CDR(상보성 결정 영역)을 포함한다. CDR3은 항원 인식의 주요 매개체로 잘 알려져 있다. 프레임워크, CDR1 및 CDR2 서열에 의해 및 부분적으로 정의된 CDR3 서열에 의해 구별되는 여러 유형의 알파 사슬 가변(V α) 영역 및 여러 유형의 베타 사슬 가변(V β) 영역이 존재한다. V α 유형은 IMGT 명명법에서 고유한 TRAV 번호로 지칭된다. 예를 들어, "TRAV4"는 고유한 프레임워크 및 CDR1 및 CDR2 서열, 및 TCR에서 TCR로 보존되지만 TCR에서 TCR로 변화되는 아미노산 서열을 또한 포함하는 아미노산 서열에 의해 부분적으로 정의되는 CDR3 서열을 갖는 TCR V α 영역을 정의한다. 유사하게, "TRBV2"는 고유한 프레임워크 및 CDR1 및 CDR2 서열을 갖지만 부분적으로 정의된 CDR3 서열만을 갖는 TCR V β 영역을 정의한다. 알파 및 베타 유전자좌 내에 각각 54개의 알파 가변 유전자(이 중 44개는 기능적임), 및 67개 베타 가변 유전자(이 중 42개는 기능적임)가 존재하는 것으로 알려져 있다.
- [0105] TCR의 연결 영역은 고유한 IMGT TRAJ 및 TRBJ 명명법에 의해 유사하게 정의되고, 불변 영역은 IMGT TRAC 및 TRBC 명명법에 의해 정의된다. 베타 사슬 다양성 영역은 IMGT 명명법에서 약어 TRBD로 지칭되며, 언급된 바와 같이, 연결된 TRBD/TRBJ 영역은 종종 연결 영역으로서 함께 고려된다.
- [0106] TCR 알파 및 베타 사슬을 인코딩하는 유전자 풀은 상이한 염색체 상에 위치하고, T 세포 발달 동안 재배열에 의해 함께 모인 별도의 V, (D), J 및 C 유전자 세그먼트를 함유한다. 이는 54개의 TCR 알파 가변 유전자와 61개의 알파 J 유전자 사이 또는 67개의 베타 가변 유전자, 2개의 베타 D 유전자 및 13개의 베타 J 유전자 사이에서 발생하는 많은 수의 잠재적인 재조합 이벤트로 인해 T 세포 알파 및 베타 사슬의 매우 높은 다양성으로 이어진다. 재조합 과정은 정확하지 않으며 CDR3 영역 내에 추가 다양성을 도입한다. 각각의 알파 및 베타 가변 유전자는 또한 IMGT 명명법에서 각각 TRAVxx*01 및 *02, 또는 TRBVx-x*01 및 *02로 지정된 대립유전자 변이체를 포함할 수 있어, 변이의 양을 추가로 증가시킬 수 있다. 동일한 방식으로, 일부 TRBJ 서열은 2개의 공지된 변이를 갖는다. ("*" 수식어의 부재는 관련 서열에 대해 단지 하나의 대립유전자만이 알려져 있음을 의미함을 유의한다). 재조합 및 선택으로부터 생성된 인간 TCR의 자연 레퍼토리는 CDR3 다양성으로부터 결정된 대략 10⁶개의 고유한 베타 사슬 서열을 포함하는 것으로 추정되었고(Arstila 등 (1999) *Science* 286:958-961), 훨씬 더 높을 수 있다(Robins 등 (2009) *Blood* 114:4099-4107). 각각의 베타 사슬은 적어도 25개의 상이한 알파 사슬과 쌍을 이루는 것으로 추정되어, 추가 다양성을 생성한다(Arstila 등 (1999) *Science* 286:958-961).
- [0107] 따라서, 용어 "TCR 알파 가변 도메인"은 TRAV 및 TRAJ 영역; TRAV 영역 단독; 또는 TRAV 및 부분 TRAJ 영역의 연결을 지칭하고, 및 용어 TCR 알파 불변 도메인은 세포의 TRAC 영역 또는 C-말단 절두된 또는 전장 TRAC 서열을 지칭한다. 마찬가지로, 용어 "TCR 베타 가변 도메인"은 TRBV 및 TRBD/TRBJ 영역; TRBV 및 TRBD 영역 단독; TRBV 및 TRBJ 영역 단독; 또는 TRBV 및 부분적 TRBD 및/또는 TRBJ 영역에이 연결을 지칭하고, 용어 TCR 베타 불변 도메인은 세포의 TRBC 영역, 또는 C-말단 절두된 또는 전장 TRBC 서열을 지칭한다. 이러한 TCR 알파 가변 도메인 및 TCR 베타 가변 도메인 명명법은 감마/델타 TCR에 대해 각각 TCR 감마 및 TCR 델타 사슬의 가변 도메인에 유사하게 적용된다. 당업자는, 예컨대, 공개적으로 이용 가능한 IMGT 데이터베이스를 통해 TRAV, TRAJ, TRAC, TRBV, TRBJ 및 TRBC 유전자 서열을 획득할 수 있다.
- [0108] 용어 "TCR 복합체"는 CD3과 TCR의 회합에 의해 형성된 복합체를 지칭한다. 예를 들어, TCR 복합체는 CD3 γ 사슬, CD3 δ 사슬, 2개의 CD3 ϵ 사슬, CD3 ζ 사슬의 동종이량체, TCR α 사슬 및 TCR β 사슬로 구성될 수 있다. 대안적으로, TCR 복합체는 CD3 γ 사슬, CD3 δ 사슬, 2개의 CD3 ϵ 사슬, CD3 ζ 사슬의 동종이량체, TCR γ 사슬, 및 TCR δ 사슬로 구성될 수 있다.
- [0109] 용어 "치료 효과"는 약리학적 활성 물질에 의해 유발되는 동물, 특히 포유동물, 및 보다 특히 인간에서의 국소 또는 전신 효과를 지칭한다. 따라서, 용어는 질병의 진단, 치유, 완화, 치료 또는 예방 또는 동물 또는 인간의

바람직한 신체적 또는 정신적 발달 및 상태의 향상에 사용하기 위한 임의의 물질을 의미한다.

[0110]

용어 "치료학적 유효량" 및 "유효량"은 동물에서 세포의 적어도 하위-집단에서 임의의 치료에 적용 가능한 합리적인 이익/위험 비율로 일부 요망되는 효과, 예컨대, 요망되는 국소 또는 전신 치료 효과를 생성하는 물질의 양을 의미한다. 일부 구체예에서, 물질의 치료학적 유효량은 물질의 치료 지수, 용해도, 약동학, 반감기 등에 의존할 것이다. 대상 화합물의 독성 및 치료 효능은, 예를 들어, LD₅₀ 및 ED₅₀을 결정하기 위해 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 약학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 일부 구체예에서, 큰 치료 지수를 나타내는 조성물이 사용된다. 일부 구체예에서, LD₅₀(치사 투여량)은 측정될 수 있고, 예를 들어, 제제가 투여되지 않은 것과 비교하여 제제에 대해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% 또는 그 초과로 감소될 수 있다. 유사하게, ED₅₀(즉, 증상의 최대 억제에 반을 달성하는 농도)은 측정될 수 있고, 예를 들어, 제제가 투여되지 않은 것과 비교하여 제제에 대해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% 또는 그 초과로 증가될 수 있다. 또한, 유사하게, IC₅₀은 측정될 수 있고, 예를 들어, 제제가 투여되지 않은 것과 비교하여 제제에 대해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% 또는 그 초과로 증가될 수 있다. 일부 구체예에서, 검정에서 T 세포 면역 반응은 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 심지어 100%만큼 증가될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 바이러스 로드에서 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 심지어 100% 감소가 달성될 수 있다.

[0111]

용어 "치료하다"는 관심 병태(예를 들어, 질병 또는 장애)의 치료적 관리 또는 개선을 지칭한다. 치료는 제제 또는 조성물(예를 들어, 약학적 조성물)을 대상체에게 투여하는 것을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 치료는 전형적으로 대상체에게 유리한 방식으로 질병(이 용어는 치료를 보증하거나 잠재적으로 보증하는 임의의 질병, 장애, 증후군 또는 바람직하지 않은 병태를 나타내기 위해 사용됨)의 경과를 변경하기 위한 노력으로 수행된다. 치료 효과는 질병 또는 질병의 하나 이상의 증상 또는 징후를 역전, 완화, 중증도 감소, 발병 지연, 치유, 진행 억제 및/또는 발생 또는 재발의 가능성 감소를 포함할 수 있다. 치료의 바람직한 효과는 질병의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 질병의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 예방, 질병 진행 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 완화, 및 관해 또는 개선된 예후를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 치료제는 질병을 갖거나 일반 집단의 구성원에 비해 질병이 발병할 위험이 증가된 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 치료제는 질병을 앓았지만 더 이상 질병의 증거를 나타내지 않는 대상체에게 투여될 수 있다. 제제는, 예를 들어, 명백한 질병의 재발 가능성을 감소시키기 위해 투여될 수 있다. 치료제는 예방적으로, 즉, 질병의 임의의 증상 또는 징후의 발달 전에 투여될 수 있다. "예방적 치료"는, 예를 들어, 질병이 발생할 가능성을 감소시키거나 발생한 질병의 중증도를 감소시키기 위해 질병이 발병하지 않았거나 질병의 증거를 나타내지 않는 대상체에게 의학적 및/또는 외과적 관리를 제공하는 것을 지칭한다. 대상체는 질병이 발병할 위험이 있는 것으로(예를 들어, 일반 집단에 비해 증가된 위험) 또는 질병이 발병할 가능성을 증가시키는 위험 인자를 갖는 것으로 확인될 수 있다.

[0112]

용어 "무반응성"은 요법에 대한 암 세포의 난치성 또는 자극, 예를 들어, 활성화 수용체 또는 사이토카인을 통한 자극에 대한 치료 세포, 예컨대 번역 세포의 난치성을 포함한다. 무반응은, 예를 들어, 면역억제제에 대한 노출 또는 고용량의 항원에 대한 노출로 인해 발생할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "비활동성" 또는 "내성"은 수용체-매개된 자극 활성화에 대한 난치성을 포함한다. 이러한 난치성은 일반적으로 항원-특이적이며, 관용 항원에 대한 노출이 중단된 후에도 지속된다. 예를 들어, T 세포에서의 비활동성(무반응과 대조적으로)은 사이토카인 생산, 예를 들어, IL-2의 결여를 특징으로 한다. T 세포 비활동성은 T 세포가 항원에 노출되고 제2 신호(공동자극 신호)의 부재 하에 제1 신호(T 세포 수용체 또는 CD-3 매개된 신호)를 수신할 때 발생한다. 이러한 조건 하에, 동일한 항원에 대한 세포의 재노출(재노출이 공동자극 폴리펩티드의 존재하에서 발생하더라도)은 사이토카인 생산 실패 및 이에 따른 증식 실패를 초래한다. 그러나, 비활동성 T 세포는 사이토카인(예를 들어, IL-2)과 함께 배양되는 경우 증식할 수 있다. 예를 들어, T 세포 비활동성은 또한 ELISA에 의해 또는 지표 세포주를 사용한 증식 검정에 의해 측정된 바와 같이 T 림프구에 의한 IL-2 생산의 부족에 의해 관찰될 수 있다. 대안적으로, 리포터 유전자 작제물이 사용될 수 있다. 예를 들어, 비활동성 T 세포는 5' IL-2 유전자 인핸서의 제어 하에 이중성 프로모터에 의해 또는 인핸서 내에서 발견될 수 있는 AP1 서열의 다량체에 의해 유도된 IL-2 유전자 전사를 개시하지 못한다(Kang 등 (1992) *Science* 257:1134).

[0113] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 면역글로불린 슈퍼패밀리 결합 단백질(예를 들어, TCR)의 항원에 대한 결합에 관여하는 면역글로불린 슈퍼패밀리 결합 단백질(예를 들어, TCR α -사슬 또는 β -사슬(또는 γ δ TCR의 경우 γ 사슬 및 δ 사슬)의 도메인을 지칭한다. 천연 TCR의 α -사슬 및 β -사슬의 가변 도메인(각각 V_α 및 V_β)은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(FR) 및 3개의 CDR을 포함한다. V_α 도메인은 2개의 개별 DNA 세그먼트, 가변 유전자 세그먼트 및 연결 유전자 세그먼트(V-J)에 의해 인코딩되고; V_β 도메인은 3개의 개별 DNA 세그먼트, 가변 유전자 세그먼트, 다양성 유전자 세그먼트, 및 연결 유전자 세그먼트(V-D-J)에 의해 인코딩된다. 단일 V_α 또는 V_β 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정 항원에 결합하는 TCR은 각각 상보적인 V_α 또는 V_β 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 TCR로부터 V_α 또는 V_β 도메인을 사용하여 분리될 수 있다.

[0114] 용어 "벡터"는 이것이 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 일부 구체예에서, 벡터는 에피솜, 즉, 염색체외 복제가 가능한 핵산이다. 일부 구체예에서, 벡터는 이들이 연결된 핵산의 자율 복제 및/또는 발현이 가능한 것들이다. 벡터가 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있는 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 종종 일반적으로 원형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"의 형태이며, 이는 벡터 형태에서 염색체에 결합되지 않는다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 벡터의 가장 일반적으로 사용되는 형태이기 때문에 상호교환적으로 사용된다. 그러나, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 발명은 동등한 기능을 제공하고 이후 당 분야에 공지되는 이러한 다른 형태의 발현 벡터를 포함하는 것으로 의도된다.

[0115] 유전자 코드(하기 도시됨)에 의해 정의된 바와 같이, 특정 단백질의 아미노산 서열과 단백질을 코딩할 수 있는 뉴클레오타이드 서열 사이에는 공지되고 명확한 상응성이 존재한다. 마찬가지로, 유전자 코드에 의해 정의된 바와 같이, 특정 핵산의 뉴클레오타이드 서열과 해당 핵산에 의해 인코딩되는 아미노산 서열 사이에는 공지되고 명확한 상응성이 존재한다.

[0116] 유전자 코드

[0117]	알라닌 (Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT
[0118]	아르기닌 (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
[0119]	아스파라긴 (Asn, N)	AAC, AAT
[0120]	아스파르트산 (Asp, D)	GAC, GAT
[0121]	시스테인 (Cys, C)	TGC, TGT
[0122]	글루탐산 (Glu, E)	GAA, GAG
[0123]	글루타민 (Gln, Q)	CAA, CAG
[0124]	글리신 (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT
[0125]	히스티딘 (His, H)	CAC, CAT
[0126]	이소류신 (Ile, I)	ATA, ATC, ATT
[0127]	류신 (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
[0128]	리신 (Lys, K)	AAA, AAG
[0129]	메티오닌 (Met, M)	ATG
[0130]	페닐알라닌 (Phe, F)	TTC, TTT
[0131]	프롤린 (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
[0132]	세린 (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
[0133]	트레오닌(Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
[0134]	트립토판 (Trp, W)	TGG

- [0135] 티로신 (Tyr, Y) TAC, TAT
- [0136] 발린 (Val, V) GTA, GTC, GTG, GTT
- [0137] 종료 신호(종료) TAA, TAG, TGA
- [0138] 유전자 코드의 중요하고 잘 알려진 특징은 이의 중복성이며, 이에 의해 단백질을 제조하는데 사용되는 대부분의 아미노산에 대해, 하나 초과와 코딩 뉴클레오티드 삼중항이 사용될 수 있다(상기 예시됨). 따라서, 다수의 상이한 뉴클레오티드 서열이 주어진 아미노산 서열을 코딩할 수 있다. 이러한 뉴클레오티드 서열은 모든 유기체에서 동일한 아미노산 서열을 생산하기 때문에 기능적으로 동등한 것으로 간주된다(비록 특정 유기체는 일부 서열을 다른 것보다 더 효율적으로 번역할 수 있음). 또한, 때때로, 퓨린 또는 피리미딘의 메틸화된 변이체는 주어진 뉴클레오티드 서열에서 발견될 수 있다. 이러한 메틸화는 트리뉴클레오티드 코돈과 상응하는 아미노산 사이의 코딩 관계에 영향을 미치지 않는다.
- [0139] 전술한 바와 같이, 바이오마커 핵산(또는 이의 임의의 부분)을 인코딩하는 DNA 또는 RNA의 뉴클레오티드 서열은 DNA 또는 RNA를 아미노산 서열로 번역하기 위해 유전자 코드를 사용하여 폴리펩티드 아미노산 서열을 유도하는데 사용될 수 있다. 마찬가지로, 폴리펩티드 아미노산 서열의 경우, 폴리펩티드를 인코딩할 수 있는 상응하는 뉴클레오티드 서열은 유전자 코드로부터 추론될 수 있다(이의 중복성으로 인해, 임의의 주어진 아미노산 서열에 대한 다중 핵산 서열을 생성할 것임). 따라서, 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 본원의 설명 및/또는 개시는 또한 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열의 설명 및/또는 개시를 포함하는 것으로 간주되어야한다. 유사하게, 본원의 폴리펩티드 아미노산 서열의 설명 및/또는 개시는 또한 아미노산 서열을 인코딩할 수 있는 모든 가능한 뉴클레오티드 서열의 설명 및/또는 개시를 포함하는 것으로 간주되어야한다.
- [0140] II. 결합 단백질
- [0141] 본 발명에 포함되는 양태에서, MHC 분자(예를 들어, MHC 클래스 I 분자)의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 (예를 들어, 특이적으로 및/또는 선택적으로) 결합하는 결합 단백질이 본원에서 제공된다. 일부 구체예에서, 결합 단백질은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드-MHC (pMHC) 복합체에 약 5×10^{-4} M 이하, 약 1×10^{-4} M 이하, 약 5×10^{-5} M 이하, 또는 약 1×10^{-5} M 이하, 약 5×10^{-6} M 이하, 약 1×10^{-6} M 이하, 약 5×10^{-7} M 이하, 약 1×10^{-7} M 이하, 약 5×10^{-8} M 이하, 약 1×10^{-8} M 이하, 약 5×10^{-9} M 이하, 약 1×10^{-9} M 이하, 약 5×10^{-10} M 이하, 약 1×10^{-10} M 이하, 약 5×10^{-11} M 이하, 약 1×10^{-11} M 이하, 약 5×10^{-12} M 이하, 약 1×10^{-12} M 이하, 또는 심지어 그 미만, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예를 들어, 약 1-50 마이크로몰, 1-100 마이크로몰, 0.1-500 마이크로몰 등의 K_d로 (예를 들어, 특이적으로 및/또는 선택적으로) 결합할 수 있다. 일부 구체예에서, MHC 분자는 HLA 혈청형 HLA-A*02인 MHC 알파 사슬을 포함한다. 일부 구체예에서, HLA 대립유전자는 HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0205, HLA-A*0206 및 HLA-A*0207 대립유전자로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, HLA 대립유전자는 HLA-A*0201이다. 일부 구체예에서, 본원에 제공된 결합 단백질은 유전자 조작되고/거나 분리되고/거나 정제된다.
- [0142] 일부 구체예에서, 결합 단백질은 공지된 T-세포 수용체(예를 들어, 본원에 기재된 카이트 TCR)보다 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드-MHC(pMHC)에 대해 더 높은 결합 친화성을 갖는다. 예를 들어, 결합 단백질은 공지된 T-세포 수용체(예를 들어, 본원에 기재된 카이트 TCR)보다 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드-MHC(pMHC)에 대한 적어도 1.2배, 1.5배, 1.8배, 2.0배, 2.2배, 2.5배, 2.8배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 5.5배, 6배, 6.5배, 7배, 7.5배, 8배, 8.5배, 9배, 9.5배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 1000배, 5000배, 10000배, 50000배, 100000배, 500000배, 1000000배 이상, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예를 들어, 1.2배 내지 2배 더 높은 결합 친화성을 가질 수 있다.
- [0143] 일부 구체예에서, 결합 단백질은 특정 수준 이하로 HPV16 E7₁₁₋₁₉의 발현을 갖는 표적 세포와 접촉될 때 공지된 T-세포 수용체(예를 들어, 본원에 기재된 카이트 TCR)보다 더 높은 T 세포 확장, 사이토카인 방출 및/또는 세포 독성 사멸을 유도한다. 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 양태의 일부 구체예에서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 수준은 백만 당 전사체의 관점에서 표현될 수 있고, 예를 들어, 백만 전사체 당 약 1,000 전사체(TPM: transcript per million transcripts), 950 TPM, 900 TPM, 850 TPM, 800 TPM, 750 TPM, 700 TPM, 650 TPM, 600 TPM, 550 TPM, 500

TPM, 450 TPM, 400 TPM, 350 TPM, 300 TPM, 250 TPM, 200 TPM, 150 TPM, 100 TPM, 95 TPM, 90 TPM, 85 TPM, 80 TPM, 75 TPM, 70 TPM, 65 TPM, 60 TPM, 55 TPM, 50 TPM, 45 TPM, 40 TPM, 35 TPM, 34 TPM, 33 TPM, 32 TPM, 31 TPM, 30 TPM, 29 TPM, 28 TPM, 27 TPM, 26 TPM, 25 TPM, 24 TPM, 23 TPM, 22 TPM, 21 TPM, 20 TPM, 19 TPM, 18 TPM, 17 TPM, 16 TPM, 15 TPM, 14 TPM, 13 TPM, 12 TPM, 11 TPM, 10 TPM, 9 TPM, 8 TPM, 7 TPM, 6 TPM, 5 TPM, 4 TPM, 3 TPM, 2 TPM, 및 1 TPM, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예컨대, 약 1,000 TPM 이하 내지 약 35 TPM 이하일 수 있다. 일부 구체예에서, 낮은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현 수준은 약 1 TPM 내지 약 35 TPM, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예를 들어, 32 TPM 또는 1-32 TPM을 의미하는 "이형집합 발현"으로 지칭된다. 더 높은 발현은 36 TPM 이상이다. 본원에 추가로 기재된 바와 같이, TPM은 RNA-Seq와 같은 널리 공지된 기술에 따라 측정되고, 유전자 발현 TPM 데이터는 다양한 세포주, 조직 유형 등에 대해 당 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, The Broad Institute Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) on the World Wide Web at portals.broadinstitute.org 참조). 일부 구체예에서, 결합 단백질은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프를 발현하는 표적 세포와 접촉될 경우, 공지된 T-세포 수용체(예를 들어, 본원에 기재된 카이트 TCR)보다 적어도 1.2배, 1.5배, 1.8배, 2.0배, 2.2배, 2.5배, 2.8배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 5.5배, 6배, 6.5배, 7배, 7.5배, 8배, 8.5배, 9배, 9.5배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 1000배 이상, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예를 들어, 1.2배 내지 2배 T 세포 확장, 사이토카인 방출 및/또는 세포독성 사멸 증가를 유도할 수 있다.

[0144] 일부 구체예에서, HPV16 E7₁₁₋₁₉의 발현은 RNA-시퀀싱(RNA-seq)을 사용하여 검출된다. RNA-seq는 일반적으로 하기 단계를 포함한다: 유전 물질을 함유하는 샘플을 수득하는 단계, 수득된 샘플로부터 총 RNA를 분리하는 단계, 총 RNA로부터 증폭된 cDNA 라이브러리를 제조하는 단계, 증폭된 cDNA 라이브러리를 시퀀싱하는 단계, 및 증폭된 cDNA를 분석 및 프로파일링하여 다양한 전사체의 발현 수준을 평가하는 단계. 샘플은 세포의 집단, 조직 샘플, 생검 샘플, 세포 배양물 또는 단일 세포일 수 있다. 총 RNA는 당 분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 생물학적 샘플로부터 분리될 수 있다. 특정 구체예에서, 총 RNA는 혈장으로부터 추출된다. 혈장 RNA 추출은 문헌 [Enders 등, "The Concentration of Circulating Corticotropin-Releasing Homer mRNA in Material Plasma Is Inclined in Preclampsia," Clinr]에 기술되어 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 원심분리 단계 후에 수집된 혈장을 Trizol LS 시약(Invitrogen) 및 클로로포름과 혼합한다. 혼합물을 원심분리하고 수성 층을 새로운 튜브로 옮긴다. 에탄올을 이 수성 층에 첨가한다. 이어서, 혼합물을 RNeasy 미니 컬럼(Qiagen)에 넣고 제조업체의 권고에 따라 가공한다.

[0145] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 RNA-seq는 총 RNA로부터 증폭된 cDNA를 제조하는 단계를 포함한다. 예를 들어, cDNA를 제조하고 분리된 RNA 샘플을 희석 없이 무작위로 증폭시키거나, 분리된 RNA에서 유전 물질의 혼합물을 개별 반응 샘플에 분산시킨다. 특정 구체예에서, 증폭은 mRNA 및 비-폴리아데닐화된 전사체 둘 모두를 증폭시키기 위해 샘플의 3' 말단에서 및 전체 전사체에 걸쳐 무작위로 개시된다. 이러한 방식으로, 이중-가닥 cDNA 증폭 생성물은 차세대 시퀀싱 플랫폼을 위한 시퀀싱 라이브러리의 생성에 최적화된다. 본 발명에 포함되는 방법에 의한 cDNA의 증폭에 적합한 키트는, 예를 들어, Ovation® RNA-Seq System을 포함한다.

[0146] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 RNA-seq는 증폭된 cDNA를 시퀀싱하는 단계를 포함한다. 임의의 공지된 시퀀싱 방법을 사용하여 단일 분자 시퀀싱 방법을 포함하는 증폭된 cDNA 혼합물을 시퀀싱할 수 있다. 특정 구체예에서, 증폭된 cDNA는 전체 전사체 샷건 시퀀싱에 의해 시퀀싱된다. 전체 전사체 샷건 시퀀싱은 Illumina® Genome Analyzer 플랫폼, ABI SOLiD™ 시퀀싱 플랫폼, 또는 Life Science의 454 시퀀싱 플랫폼과 같은 다양한 차세대 시퀀싱 플랫폼을 사용하여 수행될 수 있다.

[0147] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 RNA-seq는 cDNA에 대한 디지털 카운팅 및 분석을 수행하는 것을 추가로 포함한다. 증폭된 샘플에서 각각의 전사체에 대한 증폭된 서열의 수는 서열 관독(증폭된 가닥 당 하나의 관독)에 의해 정량화될 수 있다. 일부 구체예에서, 백만 당 전사체(TPM)는 특정 전사체의 발현 수준을 정량화하는데 사용된다. TPM은 문헌 [Wagner 등 (2012) *Theory in Biosciences* 131:281-285]에 제시된 바와 같이 계산될 수 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0148] 일부 구체예에서, 결합 단백질은 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합하지 않으며, 임의적으로 펩티드는 SPTA1, MPL, HERC1, CPAMD8, INTS4, NUTM1 또는 XM_00172256으로부터 유래된다.

[0149] 일부 구체예에서, 결합 단백질은 SPTA1-, MPL-, HERC1-, CPAMD8-, INTS4-, NUTM1- 및/또는 XM_00172256-펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합하지 않는다.

- [0150] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 결합 단백질은 a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 알파 사슬 서열에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 TCR 알파 사슬 서열; 및/또는 b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 베타 사슬 서열에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 TCR 베타 사슬 서열을 포함한다 (예를 들어, 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성된다).
- [0151] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 결합 단백질은 a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 알파 사슬 서열; 및/또는 b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 베타 사슬 서열을 포함한다(예를 들어, 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성된다).
- [0152] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 결합 단백질은 a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 가변(V_α) 도메인 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 알파 사슬 가변(V_α) 도메인 서열에 대해 적어도 약 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 TCR V_α 도메인 서열; 및/또는 b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 가변(V_β) 도메인 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 베타 사슬 가변(V_β) 도메인 서열에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 TCR V_β 도메인 서열을 포함한다(예를 들어, 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성된다).
- [0153] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 결합 단백질은 a) 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 가변(V_α) 도메인 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR V_α 도메인 서열; 및/또는 b) 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 가변(V_β) 도메인 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR V_β 도메인 서열을 포함한다(예를 들어, 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성된다).
- [0154] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 결합 단백질은 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 상보성 결정 영역(CDR) 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 알파 사슬 CDR 서열에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 TCR 알파 사슬 CDR 서열을 (예를 들어, 적어도 하나(예를 들어, 1개, 2개 또는 3개, 예를 들어, CDR3 단독 또는 CDR1 및 CDR2와 조합하여) 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성됨)을 포함한다. CDR3은 처리된 항원을 인식하는 주요 CDR인 것으로 여겨지며, CDR1 및 CDR2는 주로 MHC와 상호작용하는 것으로 여겨지며, 따라서 일부 구체예에서, 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬로부터의 CDR3 단독 및/또는 TCR 베타로부터의 CDR3 단독을 포함하는 결합 단백질이 제공되며, 각각의 CDR3은 이 단락에서 인용된 바와 같은 서열 상동성을 갖는다.
- [0155] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 결합 단백질은 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 상보성 결정 영역(CDR) 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR 베타 사슬 CDR 서열에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 TCR 베타 사슬 CDR 서열을 (예를 들어, 적어도 하나(예를 들어, 1개, 2개 또는 3개, 예를 들어, CDR3 단독 또는 CDR1 및 CDR2와 조합하여)를 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성됨) 또한 포함할 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, CDR3은 처리된 항원을 인식하는 주요 CDR인 것으로 여겨지며, CDR1 및 CDR2는 주로 MHC와 상호작용하는 것으로 여겨지며, 따라서 일부 구체예에서, 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬로부터의 CDR3 단독 및/또는 TCR 알파 사슬로부터의 CDR3 단독을 포함하는 결합 단백질이 제공되며, 각각의 CDR3은 이 단락에서 인용된 바와 같은 서열 상동성을 갖는다.
- [0156] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 결합 단백질은 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 상보성 결정 영역(CDR)을 (예를 들어, 적어도 하나(예를 들어, 1개, 2개 또는 3개) 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성된다) 포함한다.
- [0157] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 결합 단백질은 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 상보성 결정 영역(CDR)을 (예를 들어, 적어도 하나(예를 들어, 1개, 2개 또는 3개) 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성됨) 또한 포함할 수 있다.
- [0158] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 결합 단백질은 표 1에 열거된 TCR 알파-사슬 불변 영역(C_α) 서열에 대한 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,

99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 TCR C_α 서열을 포함한다(예를 들어, 포함하거나, 필수적 요소로 구성되거나, 구성된다).

[0159] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 결합 단백질은 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 불변 C_β 서열에 대한 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 TCR C_β 서열을 또한 포함할 수 있다(예를 들어, 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성된다).

[0160] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 결합 단백질은 표 1에 열거된 TCR 알파 사슬 불변 영역(C_α) 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR C_α 서열을 포함한다(예를 들어, 포함하거나, 필수적 요소 하여 구성되거나, 구성된다).

[0161] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 결합 단백질은 표 1에 열거된 TCR 베타 사슬 불변 영역(C_β) 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 TCR C_β 서열을 또한 포함할 수 있다(예를 들어, 포함하거나, 필수적 요소 하여 구성되거나, 구성된다).

[0162] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 결합 단백질은 키메라, 인간화, 인간, 영장류 또는 설치류(예를 들어, 래트 또는 마우스)인 불변 영역을 포함한다. 예를 들어, 인간 가변 영역은 무린 불변 영역으로 키메라화될 수 있거나, 무린 가변 영역은 인간 불변 영역 및/또는 인간 프레임워크 영역으로 인간화될 수 있다. 일부 구체예에서, 불변 영역은 돌연변이되어 기능성을 변형시킬 수 있다(예를 들어, TCR 알파 및 베타 사슬 사이의 친화성을 증가시키는데 유용한 디설파이드 결합을 제공하기 위해 TCR 알파 및 베타 사슬에서 반대 잔기 위치에서 비-천연 발생 시스테인 치환의 도입). 유사하게, 돌연변이는 불변 영역의 막횡단 도메인에서 만들어져 기능성을 변형시킬 수 있다(예를 들어, 소수성 아미노산으로 잔기의 비-천연 발생 치환을 도입함으로써 소수성을 증가시킴). 일부 구체예에서, 세포 표면 발현을 증가시키기 위해 불변 영역에 돌연변이가 이루어질 수 있다.

[0163] **표 1**

[0164] E7-11-28 WT 서열("E7-11-28 MGTM"과 같은 CDR)

[0165] 알파 사슬:

[0166] TRAV25/TRAJ37/TRAC

[0167] 알파 사슬 DNA 서열

[0168] ATGCTGCTGATCACCTCCATGCTGGTGTGTGGATGCAGCTGAGCCAAGTGAACGGCCAGCAAGTGATGCAGATCCCTCAGTACCAGCACGTGCAAGAAGGC
GAGGACTTCAACCACTACTGCAACAGCAGC**ACCACACTGAGCAAC**ATCCAGTGGTACAAGCAGCGGCCTGGCGGACACCCTGTGTTTCTGATCCAG**CTGGTC**
AAGTCCGGCGAAGTGAAGAAGCAGAAGCGGCTGACCTTCCAGTTCGGCGAGGCCAAGAAGAACAGCAGCCTGCACATACCCGCCACACAGACCACAGATGTG
GGCACCCTACTT**TGGCTGGCATCGGTAGCAGCAACACCGGTAAGCTCATCTTT**GGGCAAGGGACAACCTTACAAGTAAACCAGatattcagaacctgac
cctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaaatgtgtcacaaagt aaggattct
gatgtgtatatacacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgca
aacgccttcaacaacagcattatccagaagacaccttcttcccagcccagaaagt tctctgtatgtcaagctggcgagaaagctttgaaacagat acg
aacctaaactttcaaacctgtcagtgattgggttccgaatcctcctcctgaaagtgccgggtttaatctgctcatgacgctgcggtgtgggtccagc

[0169] 알파 사슬 단백질 서열

[0170] MLLITSMLVLWMQLSQVNGQQVMQIPQYQHVQEGEDFTTYCNSS**ITLSNI**QWYKQRPGGHPVFLIQ**LVKSGEV**KKQKRLTFQFGEAKKNSSLHITATQTDTV
GTYFC**CAGIGSSNTGKLIF**GQGTTLQVKPDiqnpdpavyqlrdsksdksvcfltdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawnsksdfaca
nafnnsiipedtffpspesscdvklveksfetdtnlnfqnlsvigfrilllkvagfnlmltirlwss

[0171] 베타 사슬:

[0172] TRBV2/TRBJ2-7/TRBC1

[0173] 베타 사슬 DNA 서열

[0174] ATGGATACCTGGCTCGTGTGTTGGGCCATCTTTAGCCTGCTGAAGGCCGACTGACCGAGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTACTCAGATG
GGGCAAGAAGTCATTCTGCGTTGCGTGCCCATC**AGCAACCACCTGTACT**TTTATTGGTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAAGTGAATTCCTGGTGTCC**TTC**
TACAACAATGAGATCTCCGAGAAGTCCGAGATCTTCGACGACCAAGTTCCTCGTGAAAGACCCGACGGCAGCAACTTCACACTGAAGATCCGGTCTACCAAA

CTTGAGGACTCCGCTATGTATTTTTGTGCAATCACAGGTCGCGTTTCATATGAGCAATATTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACAGgagacctgaac
aaggtgttccacccgaggtcgctgtgtttgagccatcagaagcagagatctccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggttcttccct
gaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtcagcacggaccgcagccctcaaggagcagccgccctcaatgactcc
agatactgctgagcagccgctgagggctctcgccaccttctggcagaacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagtctacgggctctcggagaat
gacgagtggaccaggatagggccaaacccgtcaccagatcgtcagcgcgaggcctgggtagagcagactgtggctttacctcggtgtcctaccagcaa
ggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatcctgctaggggaaggccacctgtatgctgtgctggtcagcgcccttgtgttgatggccatggtcaagaga
aagatttc

[0175] 베타 사슬 단백질 서열

[0176] MDTWLCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGEVILRCVPISNHLYFYWYRQILGQKVEFLVSFYNNELSEKSEIFDDQFSVERPDGNSFTLKIRSTK
LEDSAMYFCAITGRVSYEQYFGPGTRLTVTEdlnkvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgfpdhvelswwvngkevhsgvstdpplkeqpals
ryclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvfylsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgftsvsyqqvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkr
kdf

[0177] E7-11-176 WT 서열

[0178] 알파 사슬:

[0179] TRAV29DV5/TRAJ41/TRAC

[0180] 알파 사슬 DNA 서열

[0181] Atggccatgctgctgggagccagcgtgctgattctttggctccagcctgactgggtcaacagccagcagaagaacgacgatcagcaagtgaagcagaacagc
cccagcctgagcgtgcaagaaggcagaatctccatcctgaactgcgactacaccaactctatgttcgactactctctgttgtacaagaagtaccccgccgag
ggaccacaccttctgatcagcatcagctccatcaaggacaagaaacgaggacggccggttcaccgtgttctgaacaagagcgccaagcacctgagcctgcac
atcgtgccttctcagcctggggattccgcccgtgtatttctgcGCCGCAAAAAATTCAAATTCAGGTTATGCCCTCAACTTTGGCAAAGGCACCTCGCTGTG
GTCACACCCCatatccagaacctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaatccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaa
acaaatgtgtcacaaagttaggattctgatgtgtatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgtgtggcctgg
agcaacaaatctgactttgcatgtgcaaagccttcaacaacagcattatccagaagacaccttcttccccagcccagaaagtctctgtgatgtcaagctg
gtcgagaaaaagctttgaacagatacgaacctaaactttcaaaacctgtcagtgtatggggttcggaatcctcctcctgaaagtggccgggtttaatctgctc
atgacgctgcggctgtggtccagc

[0182] 알파 사슬 단백질 서열

[0183] MAMLLGASVLLWLQPDWVNSQQKNDDQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLH
IVPSQPGDSAVYFCAAKNSNSGYALNFKGKTSLLVTPHiqnpdpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyyitdktvldmrsmdfksnsavaw
snksdfacanafnnsiipedtffpspesscdvklveksfetdtnlnfnqlsvigfrillkvagfnlmltirlwss

[0184] 베타 사슬:

[0185] TRBV24-1/TRBJ2-6/TRBC1

[0186] 베타 사슬 DNA 서열

[0187] ATGGCCAGCCTGCTGTTCTTCTGCGGCGCCTTTTATCTGCTCGGCACCGGCTCTATGGACGCCGACGTTACACAGACCCCTCGGAACAGAATCACCAAGACC
GGCAAGCGGATCATGCTGGAATGCAGCCAGACCAAGGGCCACGACCGGATGTACTGGTACAGACAGGATCCAGGACTGGGCCTGCAGCTGATCTACTACAGC
TTCGACGTGAAGGACATCAACAAGGGCGAGATCAGCGACGGCTACAGCGTGTCAAGACAGGCCAGGCCAAGTTCAGCCTGAGCCTGGAAGCGCTATCCCC
AACCAGACTGCCCTGTACTTCTTGCGCCACTTCCGATCGCTCCTCCGGGCCAACGTTCTTACCTTTGGGGCCGGCAGCAGGCTGACCGTGTGGgagacctg
aacaaggtgttccacccgaggtcgctgtgtttgagccatcagaagcagagatctccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggttcttcc
cctgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtcagcacggaccgcagccctcaaggagcagccgccctcaatgac
tccagatactgcctgagcagccgctgagggctctcgccaccttctggcagaacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagtctacgggctctcggag
aatgacgagtggaccaggatagggccaaacccgtcaccagatcgtcagcgcgaggcctgggtagagcagactgtggctttacctcggtgtcctaccag
caagggtctctgtctgccaccatcctctatgagatcctgctaggggaaggccacctgtatgctgtgctggtcagcgcccttgtgttgatggccatggtcaag
agaaaggatttc

[0188] 베타 사슬 단백질 서열

[0189] MASLLFFCGAFYLLGTGSMADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMWYRQDPGLGLQLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSLESAIP

NQTALYFCATSDRSSGANVLTFGAGSRLTVLEdlnkvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswwvngkevhsgvstdpqplkeqpaind
sryclssrlrvsatfwqnpnrnhfrcqvfgygl sendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgftsvsyqqgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkrkdf

[0190] E7-11-194 WT 서열

[0191] 알파 사슬:

[0192] TRAV25/TRAJ37/TRAC

[0193] 알파 사슬 DNA 서열

[0194] Atgctgctgatcacctccatgctgggtgctgtggatgcagctgagccaagtgaacggccagcaagtgatgcagatccctcagtaccagcacgtgcaagaaggc
gaggacttcaccacactactgcaacagcagcaccacactgagcaaacatccagtggtacaagcagcggcctggcggacaccctgtgtttctgatccagctggctc
aagtccggcgaagtgaagaagcagaagcggctgacctccagttcggcgaggccaagaagaacagcagcctgcacatcacgcccacagaccacagatgtg
ggcacctacttcTGGCTGGGCTCGGTTCTCTAATACTGGTAACTGATTTTTGGGCAAGGGACAACCTTACAAGTAAAACCAAGatccagaaccctgac
cctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagctgtctgcctattcaccgattttgattctcaacaaatgtgtcacaaagt aaggattct
gatgtgtatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgca
aacgccttcaacaacagcattatccagaagacaccttcttcccagcccagaaagttcctgtgatgtcaagctggcgagaaaagctttgaaacagatacg
aacctaaacttcaaacctgtcagtgattgggttccgaatcctcctcctgaaagtggccgggtttaatctgctcatgacgctgcggctgtggccagc

[0195] 알파 사슬 단백질 서열

[0196] MLLITSMLVLWMQLSQVNGQVMQIPQYQHVQEGEDFTTYCNSSITLSNIQWYKQRPGGHPVFLIQLVKSGEVKKQKRLTFQFGEAKKNSSLHITATQTTDV
GTYFCAGLGSSNTGKLIFGQGTTLQVKPDiqn dpavyqlrdskssdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawnsksdfaca
nafnnsiipeditffspesscdvklveksfetdtnlnfnlsvigfrillkvagfnlmltrlwss

[0197] 베타 사슬:

[0198] TRBV2/ TRBJ2-7/TRBC1

[0199] 베타 사슬 DNA 서열

[0200] ATGGATACCTGGCTCGTGTGTTGGGCCATCTTTAGCCTGCTGAAGGCCGGACTGACCGAGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTGA CTGACTCAGATG
GGGCAAGAAGTCATTCTGCGTTGCGTGCCATCAGCAACCACCTGTACTTTTATTGGTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAAGTGGAATTCTGTGTGCTCCITC
TACAACAATGAGATCTCCGAGAAGTCCGAGATCTTCGACGACCAAGTTCTCCGTGGAAGACCCGACGGCAGCAACTTCACACTGAAGATCCGGTCTACCAAA
CTTGAGGACTCCGCTATGTATTTTGGCGCACTACTGGTCGCGCAAGTTACGAACAGTACTTTGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGgaggacctgaac
aaggtgttccaccccgaggtcgctgtgtttgagccatcagaagcagagatctccacacccaaaaggccacactgggtgtgctggccacaggcttcttcct
gaccagctggagctgagctgggtggaatgggaaggaggtgcacagtgagggtcagcacggacccgcagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactcc
agatactgctgagcagccgctgagggtctcgccaccttctggcagaacccccgaaccacttccgctgtcaagtcagttctacgggctctcggaat
gacgagtgagccagcataggccaaaacccgtcaccagatcgtcagcgccgaggcctgggttagagcagactgtggctttacctcggtgtcctaccagcaa
ggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatcctgctagggaaaggccacctgtatgctgtgctggtcagcgcccttgtgttgatggccatggtcaagaga
aagatttc

[0201] 베타 사슬 단백질 서열

[0202] MDTWLCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGEVILRCVPI SNHLYFYWRQILGQKVEFLVSFYNNIEISEKSEIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTK
LEDSAMYFCATTGRASYEQYFGPGTRLTVTEdlnkvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswwvngkevhsgvstdpqplkeqpainds
ryclssrlrvsatfwqnpnrnhfrcqvfgygl sendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgftsvsyqqgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkrrkdf

[0203] E7-11-455 WT 서열

[0204] 알파 사슬:

[0205] TRAV12-3/TRAJ37/TRAC

[0206] 알파 사슬 DNA 서열

[0207] Atgatgaagtcctcgcggtgctgctcgatgtttgtggctgcagctgtcttgggtctggctccagcaaaaagaggtggaacaggacctggacctctgtct
gtgctgaaggcgccattgtgtccctgaactgtacctacgcacacagcgccctccagttatgtggtacaggcagtaacagccggaaggccctgagctg

ctgatgtacacatacagcagcggaacaaagaggacggcagattcacagcccaggtggacaagtcagcaagtacatctccctgttcatccgggacagccag
cctagcgatagcgccacctacctgtgtGCCATGGCTGGCTCAGGGAATACTGGCAAGCTCATCTTCGGGCAAGGGACAACCTTTACAAGTAAAACCAG
atatccagaaccctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgcagagctgtgtctgcctattcaccgat tttgattctcaacaaatgtgt
caciaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaat
ctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattatccagaagacacctcttccccagcccagaaagt tccgtgtgatgtcaagctggcgagaaaa
gctttgaaacagatacgaacctaaactttcaaacctgtcagtgattgggttccgaatcctcctcctgaaagtggccgggtttaatctgctcatgacgctgc
ggctgtgggtccagc

[0208] 알파 사슬 단백질 서열

[0209] MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGLSVPEGAI VSLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFI RDSQ
PSDSATYLCAMAGSGNTGKLIFGQGTTLQVKPDiqnpdpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyyitdktvldmrsmdfksnsavawnsksd
facanafnnsiipeditffpspesscdvklveksfetdtnlnfnqlsvigfrilllkvagfnlmltrlwss

[0210] 베타 사슬:

[0211] TRBV7-9/TRBJ2-4/TRBC1

[0212] 베타 사슬 DNA 서열

[0213] ATGGGAACCTCTCTGCTGTGCTGGATGGCCCTGTGTCTGCTGGGAGCCGATCATGCCGATACGGGAGTGTCAGGATCCTCGGCACAAGATTACCAAGAGG
GGCCAGAACGTGACCTTCCGCTGTGACCCATATCAGCGAGCACAAACCGGCTGTATTGGTACAGACAGACTCGGCCAGGGGCTGAATTTCTCACATAC TTC
CAGAACGAAGCCAGCTGAAAAAGTCCCGGCTGCTGAGCGATAGATTTTCCGCCGAGAGGCCAAGGGCTCCTTCAGCACTCTGGAATTCAGCGACCCGAG
CAGGGCGACTCTGCCATGTATCTGTGCGCCTCATCATCCTCTACAAAAAATATTAGTATTTCGGCGCCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGGaggacctgaac
aaggtgttccaccaggagtgctgtgtttgagccatcagaagcagagatctccacacccaaaaggccacactgggtgtgcctggccacaggttcttccct
gaccagctggagctgagctgggtgaatgggaaggaggtgcacagtgagggtcagcacggaccgcagccctcaaggagcagccgcctcaatgactcc
agatactgctgagcagccgctgagggtctcgccaccttctggcagaaccccgcaaccacttccgctgtcaagtcaggttctacgggctctcgagaaat
gacgagtgagccaggataggccaaaacccgtcaccagatcgtcagcgccgagggctgggtagagcagactgtggctttacctcggtgtcctaccagcaa
ggggctcctgtctgccaccatcctctatgagatcctgctaggaaggccacctgtatgctgtgctggtcagcgcccttgtgttgatggccatggtcaagaga
aagattttc

[0214] 베타 사슬 단백질 서열

[0215] MGTSLLCWMLCLLGADHADTGVSQDPRHKITKRQNVTFRCDPIS EHNRLYWRQTLGQGPEFLTYFQNEAQL EKSRLLSDRFSAERP KGSFSTLEIQRTE
QGDSAMYL CASSSSTKNIQYFAGAGTRL SVLEdlnkvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevhsgvstdpqplkeqpalnds
ryclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvfylsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgftsvsyqqgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkr
kdf

[0216] E7-11-28 MGTM 코돈 최적화된 서열("TCR28", "28" 또는 "TCR-200-A02"로도 알려짐. 일부 구체예에서, TCR을 인
코딩하는 코돈 최적화된 알파 사슬 및 베타 사슬 DNA 서열은 표 3에 제공된 벡터, 예컨대 벡터 pNVD160에 도시
된 바와 같이 사용될 수 있다.)

[0217] 알파 사슬:

[0218] TRAV25/TRAJ37/MGTM 변형된 TRAC

[0219] 알파 사슬 DNA 서열

[0220] ATGCTGCTGATCACCTCCATGCTGGTGTGTGGATGCAGCTGAGCCAAGTGAACGGCCAGCAAGTGATGCAGATCCCTCAGTACCAGCACGTGCAAGAAGGC
GAGGACTTACCACCTACTGCAACAGCAGCACCACACTGAGCAACATCCAGTGGTACAAGCAGCGCCTGGCGGACACCTGTGTTTCTGATCCAGCTGGTIC
AAGTCCGGCGAAGTGAAGAAGCAGAAGCGGCTGACCTTCCAGTTCGGCGAGGCCAAGAAGAACAGCAGCCTGCACATACCGCCACACAGACCACAGATGTG
GGCACCTACTTCTGCGCTGGCATCGGTAGCAGCAACACCGGTAAGCTCATCTTTGGGCAAGGGACAACCTTTACAAGTAAAACCAGacatccagaaccccgac
cccgccgtgtaccagctgagggactccaagtcagcgacaagagcgtgtgtgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaaagcaaggacagc
gacgtctacataacggataaagaccgtgctggacatcgggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggccaacaagagcgacttcgctgcgcc
aacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttcttccccagcagcgacgtgccctgcgacgtgaaactgggtggagaagtcttcgagacagacacc
aatctgaactttcagaacctgctggatgctgctgcggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgacctgcggctgtggagc

[0221] 알파 사슬 단백질 서열

- [0222] MLLITSMLVLWMQLSQVNGQQVMQIPQYQHVQEGEDFTTYCNSSTLSNIQWYKQRPGGHPVFLIQLVKSGEVKKQKRLTFQFGEAKNSSLHITATQTDTV
GTYFCAGIGSSNTGKLIFFGQGTTLQVKPDiqn dpavyqlrdsksdsksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawnsksdfaca
nafnnsi ipedtffpssdvpdcvklveksfetdtnlnfnqllvivlrillkvagfnllmtlr lws
- [0223] 베타 사슬:
- [0224] TRBV2/TRBJ2-7/MGTM 변형된 TRBC
- [0225] 베타 사슬 DNA 서열
- [0226] ATGGATACCTGGCTCGTGTGTTGGGCCATCTTTAGCCTGCTGAAGGCCGACTGACCGAGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTGACTCAGATG
GGCAAGAAGTCATTCTGCGTTGCGTGCCCATCAGCAACCACCTGTACTTTTATTGGTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAAGTGAATTCTGGTGTCCTTC
TACAACAATGAGATCTCCGAGAAGTCCGAGATCTTCGACGACCAGTTCTCCGTGGAAGACCCGACGGCAGCAACTTCACACTGAAGATCCGGTCTACCAAA
CTTGAGGACTCCGCTATGTATTTTTGTGCAATCACAGGTCGCGTTTCATATGAGCAATATTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGAGTCAgaagatctgaac
aaggtgttccctccagaggtggcctgttcgagccttctaaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgctggccaccgctttttcccc
gaccagctggaactgtcttgggtgggtcaacggcaaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgcctgaacgacagc
cggtactgcctgagctccagactgagagtgtcgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcgagaac
gacgagtggaaccaggacagagccaagccctgacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgatcgccgatcaccagcgctcctatcaccag
ggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgctgggcaaggccacctgtacgcctgctggtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaagcgg
aaggactttggcagcggcagagccaaaaggtccgggagcgggt
- [0227] 베타 사슬 단백질 서열
- [0228] MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQEVILRCVPISNHLYFYWYRQILGQKVEFLVSFYNNEISEKSEIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTK
LEDSAMYFCAITGRVSYEQYFGPGTRLTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgfpdhvelswwvngkevhsgvstdpqplkeqpaln ds
ryclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvfqygl sendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqgvl satilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkr
kdfgsgrakrsgsg
- [0229] 완전한 베타 및 알파 ORF DNA 서열("Furin-P2A" 부위의 밑줄 친 이탤릭체 영역은 단일 카세트에서 2개의 폴리펩
티드 사슬의 발현을 허용하는 서열을 인코딩한다.)
- [0230] ATACCTGGCTCGTGTGTTGGGCCATCTTTAGCCTGCTGAAGGCCGACTGACCGAGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTGACTCAGATGGGGC
AAGAAGTCATTCTGCGTTGCGTGCCCATCAGCAACCACCTGTACTTTTATTGGTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAAGTGAATTCTGGTGTCCTTCTAC
ACAATGAGATCTCCGAGAAGTCCGAGATCTTCGACGACCAGTTCTCCGTGGAAGACCCGACGGCAGCAACTTCACACTGAAGATCCGGTCTACCAAACTTG
AGGACTCCGCTATGTATTTTTGTGCAATCACAGGTCGCGTTTCATATGAGCAATATTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGAGTCAgaagatctgaacaagg
tgttccctccagaggtggcctgttcgagccttctaaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgctggccaccgctttttccccgacc
acgtggaactgtcttgggtgggtcaacggcaaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgcctgaacgacagccggt
actgcctgagctccagactgagagtgtcgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcgagaacgacg
agtggaaccaggacagagccaagccctgacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgatcgccgatcaccagcgctcctatcaccaggcgg
tgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgctgggcaaggccacctgtacgcctgctggtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaagcggaaagg
actttggcagcggcagagccaaaaggtccgggagcgggtGCGACAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCTATGCTGC
TGATCACCTCCATGCTGGTGTGTGGATGCAGCTGAGCCAAGTAACGCCAGCAAGTGATGCAGATCCCTCAGTACCAGCACGTGCAAGAAGCGGAGGACT
TCACCACCTACTGCAACAGCAGCACCACACTGAGCAACATCCAGTGGTACAAGCAGCGCCTGGCGGACACCCTGTGTTTCTGATCCAGCTGGTCAAGTCCG
GCGAAGTGAAGAAGCAGAAGCGGCTGACCTTCCAGTTCGGCGAGGCCAAGAAGAAGCAGCAGCTGCACATCACCGCCACACAGACCACAGATGTGGGCACCT
ACTTCTGGCTGGCATCGGTAGCAGCAACACCGGTAAGCTCATCTTTGGGCAAGGGACAACCTTTACAAGTAAACACAGacatccagaacccccgacccccgccg
tgtaccagctgagggactccaagtcagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaagcaaggacagcgacgtct
acataacggataagaccgtgctggacatcgaggagatggactcaagagcaacagcgccgtggcctggtccaacaagagcgacttcgctgcgccaacgcct
tcaacaacagcatcatccccgaggacaccttcttccccagcagcgacgtgcctgcgacgtgaaactggtggagaagtcttcgagacagacaccaatctga
actttcagaacctgctggtgatcgtgctgcggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgacctgcggctgtggagc
- [0231] 완전한 베타 및 알파 ORF 단백질 서열("Furin-P2A" 부위의 밑줄 친 이탤릭체 영역은 단일 카세트에서 2개의 폴
리펩티드 사슬의 발현을 허용한다.")
- [0232] MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQEVILRCVPISNHLYFYWYRQILGQKVEFLVSFYNNEISEKSEIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTK
LEDSAMYFCAITGRVSYEQYFGPGTRLTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgfpdhvelswwvngkevhsgvstdpqplkeqpaln ds
ryclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvfqygl sendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqgvl satilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkr

kdfgsgkrakrsgsgATNFSLLKQAGDVEENPGFMLLITSMLVLWMQLSQVNGQQVMQIPQYQHVEGEDFTTYCNSSTLNSNIQWYKQRPGGHPVFLIQLVK
SGEVKKQKRLTFQFGEAKKNSSLHITATQTTDVGTYFCAGIGSSNTGKLI FGQGTTLQVKPDiqn dpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqskdsd
vyitdktvldmrsmdfksnsavawnsksdfacanafnnsiipedtffpsddvpcdvklveksfetdtnlnfnqllvivlrillkvagfnllmtlr lws

[0233] E7-11-176 MGTM 코돈 최적화된 서열(또한 "TCR176" 또는 "176"으로 알려짐)

[0234] 알파 사슬:

[0235] TRAV29DV5/TRAJ41/MGTM 변형된 TRAC

[0236] 알파 사슬 DNA 서열

[0237] Atggccatgctgctgggagccagcgtgctgattctttggctccagcctgactgggtcaacagccagcagagaacgacgatcagcaagtgaagcagaacagc
cccagcctgagcgtgcaagaaggcagaatctccatcctgaactgcgactacaccaactctatgttcgactacttctctgttgtacaagaagtaccccgccgag
ggaccacaccttctgatcagcatcagctccatcaaggacaagaacgaggagcggcgggttcacgtgtttctgaacaagagcgccaagcacctgagcctgcac
atcgtgccttctcagcctggggattccgccgtgtatttctgcGCCGCAAAAAATTCAAATTCAGGTTATGCCCTCAACTTTGGCAAAGGCACCTCGCTGTTG
GTCACACCCAcacatccagaaccccgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtcagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccag
accaacgtgagtc aaagcaaggacagcgacgtctacataacggat aagaccgtgctggacatgaggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctgg
tccaacaagagcgacttcgcctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttcttcccagcagcgacgtgccttgcgacgtgaaactg
gtggagaagtcttcgagacagacaccaatctgaactttcagaacctgctggtgatcgtgctgcggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctg
atgacctgcggctgtggagc

[0238] 알파 사슬 단백질 서열

[0239] MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTN~~SMFDY~~FLWYKKYPAEGPTFLIS~~ISSIKDK~~NEDGRFTVFLNLSAKHLSLH
IVPSQPGDSAVYFC~~AAKNSNSGYALNFG~~KGTSLLVTPHIqn dpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavaw
nsksdfacanafnnsiipedtffpsddvpcdvklveksfetdtnlnfnqllvivlrillkvagfnllmtlr lws

[0240] 베타 사슬:

[0241] TRBV24-1/TRBJ2-6/MGTM 변형된 TRBC

[0242] 베타 사슬 DNA 서열

[0243] ATGGCCAGCCTGCTGTTCTTCTGCGGCGCCTTTTATCTGCTCGGCACCGGCTCTATGGACGCCGACGTTACACAGACCCCTCGGAACAGAATCACCAAGACC
GGCAAGCGGATCATGCTGGAATGCAGCCAGACCAAGGGCCACGACCGGATGTACTGTTACAGACAGGATCCAGGACTGGGCTGCAGCTGATCTACTACAGC
TTTCGACGTGAAGGACATCAACAAGGGCGAGATCAGCGACGGCTACAGCGTGTCAAGACAGGCCAGGCCAAGTTCAGCCTGAGCCTGGAAGCGCTATCCCC
AACCAGACTGCCCTGTACTTCTGCGCCACTTCCGATCGCTCCTCGGGCGCCAACGTTCTTACCTTTGGGGCCGGCAGCAGGCTGACCGTGTGgaagatctg
aacaaggtgttccctccagaggtggccgtgttcgagccttctaaaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggcttttct
cccgaccacgtggaactgtcttggtgggtcaacggcaaaaggtgcactccggcgtgtcaacggatcccagcctctgaaagaacagcctgccctgaacgac
agccggtactgcctgagctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcgag
aacgacgagtggaaccaggacagagccaagccgtgacacaaatcgtgtctgcgaagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgccctctatcac
cagggcgctgtgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgtgggcaaggccaccctgtacgccgtgtggtgtctgctgtggtgctgatggccatggtcaag
cggaaggactttggcagcggcagagccaaaaggtccgggagcggt

[0244] 베타 사슬 단백질 서열

[0245] MASLLFFCGAFYLLGTGSMADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTK~~GHDR~~MYWYRQDPGLGLQLIYY~~SFDVKD~~INKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSLESAIP
NQATALYFC~~CATSDRSSGANVLT~~FAGSRLTVLEdlnkvfppevavfepskaei ahtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevshgsvst dpqplkeqpalnd
sryclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvfqygl sendewtqdrakpvtqivsaewgradcgitsasyhqvlsatilyeillgkatlyavlvlsalvlmamvk
rkdfgsgkrakrsgsg

[0246] 완전한 베타 및 알파 ORF DNA 서열("Furin-P2A" 부위의 밑줄 친 이탤릭체 영역은 단일 카세트에서 2개의 폴리펩
티드 사슬의 발현을 허용하는 서열을 인코딩한다")

[0247] ATGGCCAGCCTGCTGTTCTTCTGCGGCGCCTTTTATCTGCTCGGCACCGGCTCTATGGACGCCGACGTTACACAGACCCCTCGGAACAGAATCACCAAGACC
GGCAAGCGGATCATGCTGGAATGCAGCCAGACCAAGGGCCACGACCGGATGTACTGTTACAGACAGGATCCAGGACTGGGCTGCAGCTGATCTACTACAGC
TTTCGACGTGAAGGACATCAACAAGGGCGAGATCAGCGACGGCTACAGCGTGTCAAGACAGGCCAGGCCAAGTTCAGCCTGAGCCTGGAAGCGCTATCCCC
AACCAGACTGCCCTGTACTTCTGCGCCACTTCCGATCGCTCCTCGGGCGCCAACGTTCTTACCTTTGGGGCCGGCAGCAGGCTGACCGTGTGgaagatctg

aacaaggtgttccctccagaggtggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcttggccaccggtttttc
cccgaccacgtggaactgtcttggtgggtcaacggcaaagaggtgactcggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgccctgaacgac
agccggtactgcctgagctccagactgagagtgtcgccacctcttgccagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcgag
aacgacgagtggaaccagagacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgaggcatcaccagcgccctcctatcac
cagggcggtgtgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgctgggcaaggccaccctgtacgcccgtgctggtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaag
cggaaggactttggcagcggcagagccaaaaggtcgggagcggtGCGACAAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCT
ATGGCCATGCTGCTGGGAGCCAGCGTGTGATTCTTTGGCTCCAGCCTGACTGGGTCAACAGCCAGCAGAAGAAGCAGCATCAGCAAGTGAAGCAGAACAGC
CCCAGCTGAGCGTGCAAGAAGGCAGAATCTCCATCCTGAACTGCGACTACACCAACTCTATGTTTCGACTACTTCCTGTGGTACAAGAAGTACCCCGCCGAG
GGACCCACCTTTCTGATCAGCATCAGCTCCATCAAGGACAAGAACGAGGACGCGCCGTTTACCGTGTCTTGAACAAGAGCGCCAAGCACCTGAGCCTGCAC
ATCGTGCCTTCTCAGCCTGGGGATTCCGCCGTGTATTCTTGGCCGCAAAAAATTCAAAATTCAGGTTATGCCCTCAACTTTGGCAAAGGCACCTCGCTGTTG
GTCACACCCAcacatccagaacccccgaccccccggtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccag
accaacgtgagtcagaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgaggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctgg
tccaacaagagcgacttcgcctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttcttcccagcagcgacgtgcctgcgacgtgaaactg
gtggagaagtcttcgagacagacaccaatctgaactttcagaacctgctggtgatcgtgctgcggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctg
atgacctgcggtgtggagc

[0248] 완전한 베타 및 알파 ORF 단백질 서열("Furin-P2A" 부위의 밀줄 친 이탤릭체 영역은 단일 카세트에서 2개의 폴
리펩티드 사슬의 발현을 허용한다"))

[0249] MASLLFFCGAFYLLGTGSMADVTQTPNRNITKTGKRIMLECSQTKGHDRLMYWYRQDPGLGLQLIYYSFVDKIDINKGEISDGYSVSRQAQKFSLSLESAIP
NQALYFCATSDRSSGANVLTFGAGSRLTVLEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevhsrvstpdqplkeqpalnd
sryclssrlrvsatfwqnpnrnhfrcqvfqylsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqgvlsatilyeillgkatlyavlsalvlmamvk
rkdfgsgrakrsgsgATNFSLLKQAGDVEENPGFMAMLLGASVILWLQPDWVNSQKNDQVQKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNMFDFYFLWYKKYPAE
GPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNLSAKHLSLHIVPSQPQDSAVVFCAAKNSNSGYALNFGKGTSLLVTPHinqndpavyqlrdsksdsksvclftdfdsq
tnvsqskdsdvyitdkvtldmrsmdfksnsavawnsksdfacanafnnsiipedtffpsdvpdcvklveksfetdtnlnfnqlllvivrlillkvagfnll
mtlrlws

[0250] E7-11-194 MGMT 코돈 최적화된 서열(또한 "TCR194" 또는 "194"로도 알려짐)

[0251] 알파 사슬:

[0252] TRAV25/TRAJ37/MGMT 변형된 TRAC

[0253] 알파 사슬 DNA 서열

[0254] Atgctgctgatcacctccatgctggtgctgtggatgcagctgagccaagtgaacggccagcaagtgatgcagatccctcagtaccagcagctgcaagaaggc
gaggacttcaccactactgcaacagcagcaccacactgagcaaacatccagtggtacaagcagcggcctggcggaacacctgtgtttctgatccagctggctc
aagtccggcggaagtgaagaagcagaagcggctgaccttccagttcggcgaggccaagaagaacagcagcctgcacatcaccgccaacagaccacagatgtg
ggcacctacttTGGCTGGGCTCGGTTCCTCTAATACTGGTAACTGATTTTTGGGCAAGGACAACCTTACAAGTAAACAGacatccagaaccccgac
cccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcagaagcaaggacagc
gacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgaggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggtccaacaagagcgacttcgcctgcgcc
aacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttcttcccagcagcgacgtgccctgcgacgtgaaactggtggagaagtcttcgagacagacacc
aatctgaactttcagaacctgctggtgatcgtgctgcggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgacctgcggtgtggagc

[0255] 알파 사슬 단백질 서열

[0256] MLLITSMLVLWMQLSQVNGQVMQIPQYQHVQEGEDFTTYCNSSITLSNIQWYKQRPGGHPVFLIQLVKSGEVKKQKRLTFQFGEAKKNSSLHITATQTDTV
GTYFCAGLGSNSTGKLIFFGQGTTLQVKPDinqndpavyqlrdsksdsksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdkvtldmrsmdfksnsavawnsksdfaca
nafnnsiipedtffpsdvpdcvklveksfetdtnlnfnqlllvivrlillkvagfnllmtlrlws

[0257] 베타 사슬:

[0258] TRBV2/ TRBJ2-7/MGMT 변형된 TRBC

[0259] 베타 사슬 DNA 서열

[0260] ATGGATACCTGGCTCGTGTGTTGGCCATCTTTAGCCTGCTGAAGGCCGACTGACCGAGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTACTCAGATG
GGGCAAGAAGTCATTCTGCGTTGCGTGCCCATCAGCAACCACCTGTACTTTTATTGGTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAAGTGAATTCTGGTGTCCATC

TACAACAATGAGATCTCGAGAAGTCGAGATCTTCGACGACCAGTTCTCCGTGGAAGAACCCGACGGCAGCAACTTCACACTGAAGATCCGGTCTACCAA
CTTGAGGACTCCGCTATGTATTTT**TGCGCAACTACTGGTCGCGCAAGTTACGAACAGTACTTT**GGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACaagaatctgaac
aagggtgttccctccagaggtggccgtgttcgagccttctaaagccgagatcgcccacacacaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggctttttccc
gaccacgtggaactgtcttggtgggtcaacggcaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgcctgaacgacagc
cggtactgcctgagctccagactgagagtggtcgccaccttctggcgaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcgagaac
gacgagtggaaccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgatcgggcatcaccagcgctctatcaccag
ggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgtgggcaagggccacctgtacggcgtgctggtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaagcgg
aaggactttggcagcggcagagccaaaaggtcggggagcgt

[0261] 베타 사슬 단백질 서열

[0262] MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVQTQMGQEVILRCVPI SNHLYFYWYRQILGQKVEFLVS FYNNEISEKSEIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTK
LEDSAMYF CATTGRASYEQYFGGPGTRLTVTEDlnkvfppevavfepskaeihtkqatlvclatgfpdhlvelswvngkevhsgvstdpqp1keqpals
ryclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvfylsendewtqdrakpvtqivsaewgradcgitsasyhgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkr
kdfgsgrakrsgsg

[0263] 완전한 베타 및 알파 ORF DNA 서열("Furin-P2A" 부위의 밀줄 친 이탤릭체 영역은 단일 카세트에서 2개의 폴리펩티드 사슬의 발현을 허용하는 서열을 인코딩한다")

[0264] ATGGATACCTGGCTCGTGTGTGGGCCATCTTTAGCTGCTGAAGGCCGGACTGACCGAGCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTGACTCAGATG
GGGCAAGAAGTCATTCTGCGTTGCGTGCCCATCAGCAACCACCTGTACTTTTATTGGTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAAGTGAATTCCTGGTGTCC**TTC**
TACAACAATGAGATCTCCGAGAAGTCCGAGATCTTCGACGACCAGTTCTCCGTGGAAGACCCGACGGCAGCAACTTCACACTGAAGATCCGGTCTACCAAA
CTTGAGGACTCCGCTATGTATTTT**TGCGCAACTACTGGTCGCGCAAGTTACGAACAGTACTTTT**GGGCCGGGCACCAGGCTACGGTCAAGaagatctgaac
aaggtgttccctccagaggtggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggctttttccc
gaccacgtggaactgtcttgggtgggtcaacggcaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatcccagcctctgaaagaacagcctgccctgaacgacag
cggtagtgcctgagctccagactgagagtgtccgccacctctggcagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcgagaac
gacgagtggaaccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgcctcctatcaccag
ggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgctgggcaaggccacctgtacgccgtgctggtgtctgctgtggtgctgatggccatggtcaagcgg
aaggactttggcagcggcagagccaaaaggtccgggagcgggt**GCGACAAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCTATG**
CTGCTGATCACCTCCATGCTGGTGTGTGGATGCAGCTGAGCCAAGTGAACGGCCAGCAAGTGATGCAGATCCCTCAGTACCAGCAGCTGCAAGAAGCGAG
GACTTCACCACCTACTGCAACAGCAGC**ACCACACTGAGCAAC**ATCCAGTGGTACAAGCAGCGCCTGGCGGACACCCTGTGTTTCTGTATCCAG**CTGGTCAAG**
TCCGGCGAAGTGAAGAAGCAGAAGCGGCTGACCTTCCAGTTCCGGCAGGGCCAAGAAGAAGCAGCAGCTGCATCACCGCCACACAGACCACAGATGTGGGC
ACCTACTTC**TGGCTGGGCTCGGTTCTCTAATACTGGTAAACTGATTTTT**GGGCAAGGGACAACCTTTACAAGTAAAACAGacatccagaaccccgacccc
gccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtc aaagcaaggacagcgac
gtctacataaacggataagaccgtgtcggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggtccaacaagagcgacttcgcttgcgccaac
gccttcaacaacagcatcatccccaggagacacctcttccccagcagcgacgtgccctgcgacgtgaaactggtggagaagtcttcgagacagacaccaat
ctgaaactttcagaacctgctggtgatcgtgctgcggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgacctgcggctgtggagc

[0265] 완전한 베타 및 알파 ORF 단백질 서열("Furin-P2A" 부위의 밀줄 친 이탤릭체 영역은 단일 카세트에서 2개의 폴립еп티드 사슬의 발현을 허용한다")

[0266] MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGEVILRCVPISHNLYFYWYRQILGQKVEFLVSFYNNEISEKSEIFDDQFSVERPDGNSFTLKRSTK
LEDSAMYFCATTGRASYEQYFGGPGTRLTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtkqatlvc latgfpdhvelswwwngkevhsqvstdpqplkeqpaln
ryclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhgqylsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkr
kdfgsgrakrsgsgATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLITSMLVLWMLQSQVNGQQVMQIPQYQHVEGEDFTTYCNSSTLSNIQWYKQRPGGHPVFLIQLVK
SGEVKKQKRLTFQGEAKNSSLHITATQTTDVGTYFCAGLGSSNTGKLIFGQGTTLQVKPDiqnpdpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqskdsd
vyitdktvldmrsmdfksnsavawnsksdfacanafnnsiipeditffpsddvpdcvklveksfetdtnlnfgnlvlvivlrillllkvagfnlmltirlws

[0267] E7-11-455 MGMT 코돈 최적화된 서열(또한 "TCR455" 또는 "455"로도 알려짐)

[0268] 알파 사슴:

[0269] TRAV12-3/TRAJ37/ MGTM 변형된 TRAC

[0270] 알파 사슬 DNA 서열

[0271] Atgatgaagtcacctgacgggtgctgctcgtgattttgtggctgcagctgtcttgggtctgggtcccagcaaaaagaggtggaacaggaccttgacctctgtct

gtgcctgaaggcgccattgtgtccctgaactgtacctacagcaacagcgcccttccagtactttatgtggtacaggcagtagagccggaaggccctgagctg
ctgatgtacacatacagcagcggaacaagaaggacggcagattcacagcccaggtggacaagtccagcaagtacatctccctgttcatccgggacagccag
cctagcgatagcgccacctacctgtgtGCCATGGCTGGCTCAGGAATACTGGCAAGCTCATCTTCGGCAAGGACAACCTTACAAGTAAACCAGacatc
cagaaccccgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaa
agcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgcgagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggccaacaagagcgac
ttcgctgcgcaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttctccccagcagcgacgtgcctcgacagtgaaactggaggagaagtccttc
gagacagacaccaatctgaactttcagaacctgctggatgctgctgcggattctgctgctgaaagtggccggttcaatctgctgatgacctgcggctg
tggagc

[0272] 알파 사슬 단백질 서열

[0273] MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGLSVPEGAIVSLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIKDSQ
PSDSATYL**CAMAGSGNTGKLIF**GQGTTLQVKPDiqnpdpavyqlrdsksdsksvclftdfdsqtnvsqskdsdvdyitdkvtldmrsmdfksnsavawnsksd
facanafnnsiipedtffpsdvpdcvklveksfetdtnlnfnqlllvivlrillkvagfnllmtlrllws

[0274] 베타 사슬:

[0275] TRBV7-9/TRBJ2-4/MGTM 변형된 TRBC

[0276] 베타 사슬 DNA 서열

[0277] ATGGGAACCTCTCTGCTGTGCTGGATGGCCCTGTGTCTGCTGGGAGCCGATCATGCCGATACGGGAGTGTCAGGATCCTCGGCACAAGATTACCAAGAGG
GGCCAGAACGTGACCTTCCGCTGTGACCTATC**AGCGAGCACAAACCGG**CTGTATTGTTACAGACAGACTCGGCCAGGGCCTGAATTTCTACATAC**TTC**
CAGAACGAAGCCAGCTGGAAGTCCCGCTGTGAGCGATAGATTTTCCGCCAGAGGCCAAGGGCTCCTCAGCACTCTGGAATTCAGCGACCCGAG
CAGGGCGACTCTGCCATGTATCTG**TGCGCCTCATCATCCTCTACAAAAATATTAGTATTT**CGGCGCCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGgaagatctgaac
aaggtgttccctccagaggtggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggctttttcccc
gaccagctggaactgtcttgggtgggtcaacggcaagaggtgcaactccggcgtgtcaacggatcccagcctctgaaagaacagcctgcctgaacgacagc
cgggtactgcctgagctccagactgagagtgctcgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcgagaac
gacgagtggaaccaggacagagccaagcccgtagacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattcgcgcatcaccagcgccctctatcaccag
ggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgctgggcaaggccaccctgtacgcctgctggtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaagcgg
aaggactttggcagcggcagagccaaaaggtccgggagcgggt

[0278] 베타 사슬 단백질 서열

[0279] MGTSLLCWMLCLLGADHADTVGSQDPRHKITKRGQNVTFRCDPIS**SEHNRL**YWYRQTLGQGPEFLTY**FQNEAQ**LEKSRLLSDRFSAERP KGSFSTLEIQRTE
QGDSAMYL**CASSSTKNIQYF**GAGTRLVLEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswvwngekvhsqvstdpqplkeqpalnds
ryclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvfylsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitasyhqgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkr
kdfgsgrakrsgsg

[0280] 완전한 베타 및 알파 ORF DNA 서열 ("Furin-P2A" 부위의 밑줄 친 이탤릭체 영역은 단일 카세트에서 2개의 폴리펩
티드 사슬의 발현을 허용하는 서열을 인코딩한다")

[0281] ATGGGAACCTCTCTGCTGTGCTGGATGGCCCTGTGTCTGCTGGGAGCCGATCATGCCGATACGGGAGTGTCAGGATCCTCGGCACAAGATTACCAAGAGG
GGCCAGAACGTGACCTTCCGCTGTGACCTATC**AGCGAGCACAAACCGG**CTGTATTGTTACAGACAGACTCGGCCAGGGCCTGAATTTCTACATAC**TTC**
CAGAACGAAGCCAGCTGGAAGTCCCGCTGTGAGCGATAGATTTTCCGCCAGAGGCCAAGGGCTCCTCAGCACTCTGGAATTCAGCGACCCGAG
CAGGGCGACTCTGCCATGTATCTG**TGCGCCTCATCATCCTCTACAAAAATATTAGTATTT**CGGCGCCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGgaagatctgaac
aaggtgttccctccagaggtggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggctttttcccc
gaccagctggaactgtcttgggtgggtcaacggcaagaggtgcaactccggcgtgtcaacggatcccagcctctgaaagaacagcctgcctgaacgacagc
cgggtactgcctgagctccagactgagagtgctcgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcgagaac
gacgagtggaaccaggacagagccaagcccgtagacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattcgcgcatcaccagcgccctctatcaccag
ggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctgctgggcaaggccaccctgtacgcctgctggtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaagcgg
aaggactttggcagcggcagagccaaaaggtccgggagcgggt GCGACAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCTATG
ATGAAGTCCCTGCGGGTGTGCTGCTGATTTTGTGGCTGCAGCTGTCTTGGGTCTGGTCCAGCAAAAAGAGGTGGAACAGGACCTTGGACCTCTGTCTGTG
CCTGAAGGCGCCATTGTGTCCCTGAAGTGTACCTACAGCA**AACAGCGCCTTCCAGTACT**TTTATGTGTTACAGGCAGTACAGCCGGAAGGGCCTGAGCTGCTG
ATGTAC**ACATACAGCAGCGGCAAC**AAAGAGGACGGCAGATTACAGCCAGGTGGACAAGTCCAGCAAGTACATCTCCCTGTTTCATCCGGGACAGCCAGCCT
AGCGATAGCGCCACCTACCTG**TGTGCCATGGCTGGCTCAGGAATACTGGCAAGCTCATCTTC**GGGCAAGGACAACCTTACAAGTAAACCAGacatccag
aaccgcgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtcagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaaagc

aaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgaggacatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggccaacaagagcgacttc
gcctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccaggagacacttctccccagcagcgacgtgccctgcgacgtgaaactggaggagaagtccttcgag
acagacaccaatctgaactttcagaacctgctggatgctgctgcggattctgctgctgaaagtgccggcttcaatctgctgatgacctgcggctgtgg
agc

[0282] 완전한 베타 및 알파 ORF 단백질 서열("Furin-P2A" 부위의 밑줄 친 이탤릭체 영역은 단일 카세트에서 2개의 폴
리펩티드 사슬의 발현을 허용한다")

[0283] MGTSLLCWMALCLLGADHDTGVSQDPRHKITKRGQNVTFRCDPIS**SEHNRL**YWYRQTLGQGPEFLTY**FQNEAQ**LEKSRLLSDRFSAERPKGFSFSTLEIQRT
QGDSAMYL**CASSSTKNIQYF**GAGTRLVLEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwvngkevhsgvstdpqplkeqpalnds
ryclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvfylsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkr
kdfgsgakrsgsg**ATNFSLLKQAGDVEENPGF**MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGLSVPEGAIVSLNCTYS**NSAFQY**FMWYRQYSRKGPELL
MY**TYSSGN**KEDGRFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLC**CAMAGSGNTGKLI**FGQGTTLQVKPDiqn dpavylrdsksdksvclftdfdsqtnvsqs
kdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawnsksdfacanafnnsiipedtfpssdvpcdvklveksfetdtnlnfnqlilvivlriillkvagfnlmtlrlw
s

[0284] 표 2

[0285] Kite TCR 서열(또한 "비교자"로도 알려짐):

[0286] 알파 사슬:

[0287] TRAV1-2/TRAJ7/코돈 최적화 마우스 불변 알파

[0288] 알파 사슬 DNA 서열

[0289] ATGTGGGGTGTCTTCTTTTGTACGTCAGCATGAAGATGGGAGGCACTACTGGGCAAAACATAGATCAGCCTACCGAAATGACTGCTACCGAGGGAGCCATT
GTCCAAATCAACTGCACCTATCAG**ACTAGCGGCTTCAATGG**ACTCTTCTGGTACCAACAGCATGCGGGCAAGCACCTACCTTCTTGCTCTAT**AATGTCTTG**
GATGGTCTCGAGAGAAAGGCAGATTCTCAGTTTCTCAGCCGGAGCAAGGATACTCATATCTTCTCTGAAAGAGCTTCAGATGAAGATTCTGCATCC
TATCTCT**TGTGCTTCAGTCGATGGCAATAACCGACTCGCCTTT**TGGAAAAGGGAATCAAGTGGTCGCATACCGaatattcagaacccgaaccagcgatata
cagttgaaggaccaagatctcagatagtagactctgtttgtttacggactttgactcacaaatcaacgtcccgaagactatggaagtggtacgttcattc
acagataagtgcttctggacatgaaggctatggactcaagagcaacggggcaattgcttgggtccaaccagacaagctttacctgtcaggacatttttaag
gagactaatgctacttatccctccagcgacgttccgtgtgatgcgactctaccgagaagctcttttgagaccgatatgaatctcaacttcagaatctgctg
tgatcggtctgcggatcctgcttctgaaggttgaggattcaatcttcttgactctccggctctggtcttca

[0290] 알파 사슬 단백질 서열

[0291] MWGVFLLYVSMKMGTTGQNIDQPTMTATEGAIVQINCTYQ**TSGFNGL**FWYQQHAGEAPTFLSY**NVLDGL**EEKGRFSSFLSRSGKYSYLLKELQMKDSAS
YL**CASVDGNRLAF**GKGNQVVVIPNIqnpepavyqlkdprsqdstlclftdfdsqinvpktmesgtfitedkcvldmkamdsksngaiaawsnqtsftcqdfk
etnatypssdvpdatlteksfetdmnlfnqlilvmvlriillkvagfnlmtlrlwss

[0292] 베타 사슬:

[0293] TRBV5-6/TRBJ2-1/코돈 최적화 마우스 불변 베타

[0294] 베타 사슬 DNA 서열

[0295] ATGGCCCCGGGGCTTTTGTGTTGGGCCTTGCTTTGTTGCTTGGGGCAGGCTTGGTGGATGCTGGAGTCACACAGTCACCCACACACCTCATTAAACCAGG
GGACAACAAGTCACTCTGCGTGCAGTCCTAAG**TCAGGCCATGACACA**GTTTCTGGTATCAACAGGCTCTGGGGCAGGGCCCTCAGTTTCATTTTCCA**TAT**
TACGAGGAAGAGGAACGCCAACGCGGTAATTTCCCCGATCGGTTCTCTGGGCACCAAGTTCCTCAAGTGAAGTGAACGTAAATGCTCTCCTCCTC
GGAGACTCCGCCCTCTACTTG**TGTGCCAGTTCTCTTGGTTGGCGGGGCGGCCGATA**CAATGAACAATTTTGGACCTGGTACTCGGCTGACCGTGCTAGag
gacctgcgaacgtcacccaccaaaggtagcttgtttgagccatcaaaggcggagatcgccaacaaacagaaagctacgtcgtgtgtttggctcggggc
tcttccccagaccacgtagaacttctcgtgggtcaatggaaaggaggttcattccggagtgtgcactgatccccagcgtacaaggaatccaactatagc
tactgtctctcatctcggtcgggtgagtcgacattctggcataatcctcggaaccacttccgatccaagtgagctttcatgggttgagcgaggaagac
aagtgccccgagggcagtcctaaaccagtcactcaaacataagcgccgagggatgggtagagccgattgtgggttactagcgttcataccaacaagg
gtattgagcgctacaattctttacgaaattctcctcggaaggcgacgctctacgccgtactggtgtctactctcgtggttatggcaatggtgaacggaaa
aacagc

[0296] 베타 사슬 단백질 서열

- [0297] MAPGLLCWALLCLLGAGLVDAGVTQSPHTLIKTRGQVTLRCSPKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYVEEERQGRGNFPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLL
GDSALYL**CASSLWGRGGRYNEQFF**GPGRITLVLEdlrntvtpkvsIfepskaeIankqkatlvclargfFpdhvelswwvngkevshgvcTdpqaykesnys
yclssrlrvsatfwhnprnhfrcqvfqfhlseedkwpegsppkvtqnisaeawgradcgitsasyqqgvlSATILYEILLGkatlyavlvtlvmmamvkrk
ns
- [0298] 완전 베타 및 알파 ORF DNA 서열
- [0299] ATGCCCCCGGGCTTTTGTGTTGGCCCTTGCTTTGTTGCTTGGGGCAGGCTTGGTGGATGCTGGAGTCACACAGTCACCCACACACCTCATTAAACCAGG
GGACAACAAGTACTCTGCGCTGCAGTCCTAAG**TACAGGCCATGACACA**TTTCTGGTATCAACAGGCTCTGGGGCAGGGCCCTCAGTTTCATTTTCCA**ATAT**
TACGAGGAAGAGGAACGCCAACGCGTAATTTCCCGATCGGTCTCTGGGCACAGTTCCCAAATACTCAAGTGAGTTGAACGTAAATGCTCTCCTCCTC
GGAGACTCCGCCCTCTACTTG**TGTGCCAGTTCTCTTGGTTGGCGGGGCGGCCGATACAATGAACAATTTTT**TGGACCTGGTACTCGGCTGACCGTGCTAGag
gacctgcgaacgtcacccaccaaaggtcagtttgttttagccatcaaaggcggagatcgccaacaacagaaagctacgctcgtgtgtttggctcggggc
ttcttcccagaccacgtagaactttcttggtgggtcaatggaaaggaggttcattccggagtgtgactgatcccaagcgtacaaggaatccaactatagc
tactgtctctcatctcggtccgggtgagtgcgacattctggcataatcctcggaaccactttcgatgccaagtgcagtttcatgggttgagcgaggaagac
aagtggcccagggcagtcctaaaccagtcactcaaacataagcgccgaggcatggggtagagccgattgtgggattactagcgcttcataccaacaaggg
gtattgagcgctacaattctttacgaaattctctcggaaggcgacgctctacgccgtactggtgtctactctcgtggttatggcaatggtgaacgggaaa
aacagcAGAGCCAAAGAAGTGGTTCTGGCGGACGAATTTTAGTTTGCTTAAGCAAGCCGAGATGTGGAGGAAATCTGGACCGATGTGGGGTGTCTTC
CTTTGTACGTACAGATGAAGATGGGAGGCACTACTGGGCAAAACATAGATCAGCCTACCGAAATGACTGCTACCGAGGGAGCCATTGTCCAAATCAACTGC
ACCTATCAG**ACTAGCGGCTTCAATGGA**CTCTTCTGGTACCAACAGCATGCGGGCGAAGCACCTACCTTCTGTCTAT**AATGTCTTGGATGGTCTC**GGAAGAG
AAAGGAGATTCTCCAGTTTCTCAGCCGAGCAAGGGATACTCATATCTTCTCCTGAAAGAGCTTCAGATGAAGGATTCTGCATCTATCTC**TGTGCTTCA**
GTCGATGGCAATAACCGACTCGCCTTTGAAAAAGGAATCAAGTGGTCGTCATACCGaatttcagaacccgaaccagccgtatatcagttgaaggacca
agatctcaggatagtagactctgtttgtttacggactttgactcacaatacaacgtcccgaagactatggaaagtggtagcttcatcacagataagtgctt
ctggacatgaaggctatggactcaaagagcaacggggcaattgcttgggtccaaccagacaagctttacctgtcaggacatttttaaggagactaatgctact
tatccctccagcgacttccgtgtgatgcgactcttaccgagaagctcttttagaccgatatgaatctcaacttcagaatctgctgggtgatcgttctgcgg
atcctgcttctgaaggttgaggattcaatctcttatgactctccgctctgggtcttca
- [0300] 완전 베타 및 알파 ORF 단백질 서열
- [0301] MAPGLLCWALLCLLGAGLVDAGVTQSPHTLIKTRGQVTLRCSPKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYVEEERQGRGNFPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLL
GDSALYL**CASSLWGRGGRYNEQFF**GPGRITLVLEdlrntvtpkvsIfepskaeIankqkatlvclargfFpdhvelswwvngkevshgvcTdpqaykesnys
yclssrlrvsatfwhnprnhfrcqvfqfhlseedkwpegsppkvtqnisaeawgradcgitsasyqqgvlSATILYEILLGkatlyavlvtlvmmamvkrk
nsRAKRS~~SGS~~GATNFSLKQAGDVEENPGFMWGVFLLYVSMKMGTTGQNIHQPTMTATEGAIVQINCTYQ**TSGFNGL**FWYQQHAGEAPTFLSYNVLDGLEE
KGRFSSFLRSKGYSYLLKELQMKDSASYL**CASVDGNRLAF**GKGNQVVVIPNIqnepavyqlkdprsqdstlclftdfdsqinvpktmesgtfitedkcv
ldmkamdsksngaiawsnqtsftcqdifketnatypssdvpcdatlteksfetdmnlfnqlvmvlrillkvagfnllmtlrlwss
- [0302] * 대표적인 TCR 서열을 제공하는 표 1은 MHC 혈청형 제시에 따라 그룹화되고 MHC 혈청형에 의해 제시되고 하위-
그룹화된 TCR에 의해 결합되는 다양한 펩티드에 따라 하위-그룹화된다. 표에 대표적으로 예시된 것과 같은 개별
TCR 뿐만 아니라, 단독으로 또는 본원에 제공된 표에 그룹화된 것들과 같은 MHC와의 복합체로 본원에 기재된 펩
티드 에피토프 서열에 결합하는 결합 단백질의 속이 기재되고 청구된다. 또한, 본원에 기재된 각각의 TCR 알파
사슬에 대한 TRAV, TRAJ 및 TRAC 유전자, 및 본원에 기재된 각각의 TCR 베타 사슬에 대한 TRBV, TRBJ 및 TRBC
유전자가 제공된다. 본원에 기재된 각각의 TCR에 대한 서열은 각각의 명명된 TCR에 대한 동족 알파 사슬 및 베타
사슬의 쌍으로서 제공된다. 본원에 기재된 TCR 서열은 주석이 달린다. 가변 도메인 서열은 대문자로 표시된
다. 불변 도메인 서열은 소문자이다. CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은 굵은체 및 밑줄친 텍스트를 사용하여 주석 처
리된다. CDR1, CDR2 및 CDR3은 왼쪽(N-말단)에서 오른쪽(C-말단)으로의 표준 제시 순서로 제시되어 있다. 본원
에 기재된 각각의 TCR 알파 사슬에 대한 TRAV, TRAJ 및 TRAC 유전자, 및 본원에 기재된 각각의 TCR 베타 사슬에
대한 TRBV, TRBJ 및 TRBC 유전자는 본원에 기재된 잘 공지된 IMGT 명명법에 따라 주석 처리된다. 유사하게,
TRAV 및 TRBV의 CDR1 및 CDR2는 잘 공지되어 있고 주석 처리된 TRAV 및 TRBV 서열(예를 들어, imt.org에서 이
용가능한 IMGT 및 iedb.org에서 이용가능한 IEDB와 같은 데이터베이스에 주석 처리된 것과 같음)을 기반으로 하
기 때문에 당업계에 잘 공지되어 있다.
- [0303] **표 3**
- [0304] 벡터: pTSLV102-MSCV-E7-11-28-MGTM-Q-CD8-opt
- [0305] tggagggtcaattcactcccaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttcctgatagcagaactacacaccagggc

caggggtcagatatccactgacctttggatgggtgctacaagctagtagaccagttgagccagataaggtagaagaggccaataaaggagagaacaccagcttgt
 tacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtgagggtttgacagccgctagcatttcatcacgtggcccgagagctgc
 atccggagtagtcaagaactgctgatatcgagcttgctacaaggagctttccgctggggactttccaggaggcgtggcctggcgaggactggggagtggc
 gagccctcagatcctgcatataagcagctgcttttggctgtagtggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaa
 ccactgcttaagcctcaataaagcttgcccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagaccccttttag
 tcagtgtggaatactctagcagtgccgcccgaacaggagcttgaaagcgaaagggaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggttgtggaagcgc
 gcacggcaagaggcgaggggcgcgactggtgagtacgcaaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagttatagc
 gggggagaattagatcgcatgggaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaataataataaacatagatagggcaagcaggagctagaac
 gattcgagttaatcctggctgttagaaacatcagaagctgtagacaaatctgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagat
 cattatataatcacagtagcaacccctctattgtgtgcatcaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaaacaaa
 glaagaccaccgcacagcaagcgccggccgctgactttagacactggaggaggagatagagggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtgt
 aaaaaatgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtggaataggagctttgttcttgggttctt
 gggagcagcaggaagcactatggcgcgagcgtcaatgacgctgacggtagcggccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgcag
 ggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaagatacctaaaggatcaaca
 gctcctggggatttggggtgtctctggaactcatttgaccactgctgtgcttggatgctagtggagtaataaatctctggaacagatttggatca
 cacgacctggatggagtgggacagagaaattacaatatcaacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaaga
 attattggaatagataaatggcaagtttgtggaattggtttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggagcttgggt
 aggtttaagaatagttttgtgtactttctatagtgaatagagtaggcaggagatattaccattatcggttcagacccacctcccaaccccgaggggacc
 cgacaggcccgaaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgccgaatttaattcaca
 aatggcagttatcatccacaattttaaaagaaaaggggggattggggggtagcgtgcaggggaaagaatagtacataatagcaacagacatacaactaa
 agaattacaaaaacaattacaaaaattcaaaattttcggggtttattacaggCGcGCcagagatccagtttggacCTgcAGGTGAAAGACCCACCTGTAGG
 TTTGGCAAGTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGA
 ATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGC
 GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCTGTGCTTATTTGAACATAACCAATCAGTTtGCTTCTtGCTTCTGTTtGtGtGCTTC
 TGCTCCCTGAGCTCAATAAAAGAGCCCAACCCCTCACTtGGtGgGCCAGTCTCTtGATAGACTGtGTCcCtGGaTACCCGTACggtaccgctagcgcca
 ccATGGATACCTGGCTCGTGTGTTGGGCCATCTTTAGCCTGCTGAAGGCCGACTGACCGAGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTGACTCAGA
 TGGGGCAAGAAGTACTTTCGCTGCGTGGCCATCAGCAACCACTGTACTTTTATTTGTTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAAGTGAATTCCTGGTGTCTT
 TCTACAACAATGAGATCTCCGAGAAGTCGAGATCTTCGACGACCAGTTCTCCGTGGAAGACCCGACGCGCAGCAACTTCACACTGAAGATCCGGTCTACCA
 AACTTGAGGACTCCGCTATGTATTTTGTGCAATCACAGGTGCGTTCATATGAGCAATATTTGGGCCGGGACCAGGCTCACGGTCACAGAAGATCTGA
 ACAAGGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCGTGTTCGAGCCTTCTAAGGCCGAGATCGCCACACAAAAAGCCACCTCGTGTGCTGGCCACCGGCTTTTTC
 CCGACCAGTGGAAGTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAGAGGTGCACCTCCGCGTGTCAACGGATCCCCAGCCTCTGAAAGAACAGCCTGCCCTGAACGACA
 GCCGCTACTGCTGAGCTCCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTTACGGCTGAGCGAGA
 ACGACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAGCCGTGACACAAATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGAAGAGCCGATTGCGGCATCACCAGCGCTCTATCACC
 AGGGCGTGTGAGCGCCACAATCCTGTACGAAATCTGTGTTGGCAAGGCCACCTGTACGCCGTGTGTTGCTCTGCTCTGTTGCTGATGGCCATGGTCAAGC
 GGAAGACTTTTGGCAGCGCAGAGCCAAAAGGTCCGGGAGCGGTGCGACAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCAGCTTGAAGAGAACCCCGACCTA
 TGCTGCTGATCACCTCCATGCTGGTGTGTGGATGCAGCTGAGCCAAGTGAACGGCCAGCAAGTATGCAGATCCCTCAGTACCAGCAGTGAAGAAGGCG
 AGGACTTCACCACCTACTGCAACAGCAGCACCACTGAGCAACATCCAGTGGTACAAGCAGCGCCTGGCGGACACCCTGTGTTTCTGATCCAGCTGGTCA
 AGTCCGGCAAGTGAAGAAGCAGAAGCGGTGACCTTCCAGTTCGGCGAGGCCAAGAAGAACAGCAGCCTGCACATCACCGCCACACAGACCACAGATGTGG
 GCACCTACTTCTGCGCTGGCATCGGTAGCAGCAACACCGGTAAGCTCATCTTTGGGCAAGGACAACTTTACAAGTAAACCAGACATCCAGAACCCCGACC
 CCGCGTGTACAGCTGAGGGACTCCAAGTCCAGCGACAAGAGCGTGTGTCTGTTTACGGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGAGTCAAAGCAAGGACAGCG
 ACGTCTACATAACGGATAAGACCGTGTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCGTGGCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCTGCGCCA
 ACGCCTTCAACAACAGCATCATCCCGAGGACACCTTCTTCCCCAGCAGCGAGTGCCTGCGAGCTGAAACTGGTGGAGAAGTCTTCGAGACAGACACCA
 ATCTGAACTTTCAGAACCTGCTGGTGTGCTGCTGCGGATTCTGCTGCTGAAAGTGCGCGGCTTCAATCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGAGCAGCAGGG
 CTAAGAGGTCCGGCAGCGGAGCCACCAATTTTCCCTGCTGAAACAGGCTGGTGACGTGGAAGAAAACCTGGCCCCATGGCGCTGCCCGTACCCGCTGCG
 TGCTGCCCTGGCGCTGTGTTACACGCCGCTCGGCCAGAGCTTCCACCCAGGGCACATTTCCAACGTGTCCACCAATGTGTGGGAGGCGCGGATCGT
 CCCAGTTCAGAGTGTCCCTCTGGACCGCACCTGGAACCTGGGCGAGACCGTGGAGTGAATGTCAGGTCTGCTGAGCAACCCGACCTCCGGGTGCAGTT
 GGCTGTTCCAGCGCGTGGTGTGCCGAAGCCCTACGTTCTGCTTTACCTGAGCCAGAACAAGCCCAAGGCGCGGAGGGCTGGACACCCAGAGATTCT
 CCGCAAGCGCTGGGGACACATTCTGTGCTTACTTTGAGCGATTTCGCGAGAGAGAACGAGGGCTACTATTTCTGTTTCGGCGCTGAGCAATTCCATCATGT
 ATTTACGCCACTTTGTGCCAGTGTCTGCTGCCAAGCCTACCACAACACAGCTCCCCGCTCCCCGACTCCGGCGCTACCATCGCGAGTCAACCGTTGA
 GCCTGAGGCTGAGGCTTGTGCGCCGCTGCGGGGGTGCCTCCACACAGGGGCTCGACTTTGCGTGCAGATCTATATTTGGGCGCTCTGGCGGGTA
 CCTGCGGGGTGCTGCTGTGTCATTGGTGATTACCTGTACTGCAATACCGCAACCGCGCGGGTCTGTAAGTGCCCAACCGCTGTGGTCAAGTCCGGTG

ACAAACCGTCGCTCTCGGCTCGCTACGTGCGCGCTAAGCGCAGCGGTCCGGGGCCACCAACTTTTCATTGCTGAAGCAGGCCGGTGATGTGGAGGAGAATC
CAGGGCCCATGCGCCCCAGGCTTTGGCTCCTTCTTGCTGCTCAGCTCACTGTCTTGCATGGCAACTCCGTTCTGCAGCAGACTCCCGCTACATCAAGGTGC
AGACGAACAAGATGGTGATGCTGTCATGCGAGGCCAAGATCTCTCTTTCAAATATGAGAATTTATTGGCTACGACAGCGCCAGGCCCTCCAGCGACAGCC
ACCACGAGTTCTGGCGCTTTGGGATTCTGCTAAAGGCACCATCGAGAGGAGGTGGAACAGGAGAAGATAGCTGTCTCCGCGACGCATCCCGCTTCA
TCCTGAACCTGACCAGCGTGAAGCCGGAGGACAGCGGCATCTACTTCTGTATGATCGTTGGCTCCCCGAGCTGACCTTCGGCAAAGGCACCCAGCTGTCCG
TGGTGGACTTCTGCCCACCACAGCCAGCCAACCAAGAAATCCACCCTCAAGAAGCGCGTGTGCCGACTGCCCGCCCTGAAACCCAGAAGGGCCCTCTGT
GCTCCCCATCACCTTGGACTGCTGGTGGCGGGAGTCTGGTGTCTGCTGATCTCTGGGTGTGCCATCCACTGTGTGCCGCCGCCGCCGCCGCC
TGAGGTTTATGAAACAGTTTACAAGTGATAAatcgatagatcctaatacaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggattcttaactatgtt
gctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctgggtg
ctgtctctttatgaggagttgtggccggtgtcaggcaacctggcgtggtgtgactgtgtttgctgacgcaacccccactgggtggggcatgtgccaccacc
tgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttgcccgtgctggacaggggctcggtgttgt
ggcactgacaattccgtggtgtgtcggggaaatcatcgctcctttccttggctgctcgctgtgttgccacctggattctgcgaggagctccttctgtctac
gtcccttcggccctcaatccagcggaccttcttcccgccgctgctgcccgtctcgccgtcttcgcttgccttcagcagagtcggatc
tccctttgggcccctccccgctgagatcctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaaggggggactggaag
ggctaattcactcccaacgaagacaagatctgctttttgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggga
accactgcttaagcctcaataaagcttgcccttgagtgttcaagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagaccctttt
agtcatgtggaaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattatcagatttataacttgcaagaaatgaatcatgagagtgagagggccgggt
taattaaagaaaagggtagatcatcttgaagacgaaaggccctcgtagacgcctattttataggttaatgtcatgataaatggtttcttagacgtca
gggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaataatgtatccgctcatgagacaataacccgtataaatg
cttcaataatattgaaaaaggaagagtagatattcaacattccgtgtcgcccttattcccttttttgccgcatttgccttctgttttgtcaccca
gaaacgctggtagaaataaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcg
cccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtgtgacgcggcggaaggaactcgggtcgccgcata
cactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataaacatg
agtataaacactgcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagtaaacgctttttgcacaacatgggggcatgtaactcgccctgat
cgttggaacccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgccaaactattaaactggcgaa
ctacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggaataaagtgcaggaccacttctgcgctcgcccttccggctggctgggttatt
gctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagtatctacacgacgggg
agttaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggctccctcactgattagcattggttaactgtcagaccaagtttactcataataactt
tagattgattttaaacttcatttttaattttaaaggatctaggtgaagatccttttgtataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgttccac
tgagcgtcagacccctagaaaaagatcaaaggatctcttgagatccttttttctgcgctaatctgctgcttgcaaaaaaaaccaccgctaccagcg
gtgggttgtttgcccgatcaagagctaccaactccttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgagataccaaatactgttctctagttagccgtag
ttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgctctgtaaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataaagtctgtcttacc
gggttggaactcaagacgatagttaccggataaaggcgagcggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggaagcgaacgacctacaccgaa
ctgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttccgaaggagaaaggcgagcaggtatccggttagcgccaggggtcggaacaggagagcgc
acgaggggagcttcagggggaaacgctggatctttatagtcctgtcggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggg
cgagcctatggaaaaacgcaacgacggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttcttctcgttatccCTGATTCT
GTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCA
ATACGCAAACCGCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTATTAATGCAGCAAGCTCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGCCGAGGCCGCTCGG
CCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTGGAGGCGCTAGGCTTTGCAAAAAGCTCCCCGTGGCAGCAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGC
AGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGA
TAACAATTTACACAGGAACAGCTATGACATGATTACGAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAAT
GTATCTTATCATGTCTGGATCAACTGGATAACTCAAGCTAACCAAAATCATCCAAACTTCCACCCCATACCTATTACACTGCCAATTACCTGTGGTTT
CATTTACTCTAAACCTGTGATTCTCTGAATTATTTTCATTTTAAAGAAATGTATTGTGTTAAATATGTACTACAAACTt agt agt

[0306] 벡터: pHAGE-MSCV-E7-11-28-P2A-dnTGFbRII

[0307] tggagggttaattcactcccaagaagacaagatattccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttcctgattagcagaactacacaccagggc
caggggtcagataccactgacctttggatggtgtacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagaggccaataaaggagagaacaccagcttgt
tacacctgtgagcctgcatgggatggatgaccggagagagaagtgttagagtggaggtttgacagccgctagcatttcatcacgtggcccagagctgc
atccggagtacttcaagaactgctgatctgagccttgctacaaggagcttccgctggggacttccaggaggcggtggcctgggggggactggggagtggc
gagccctcagatcctgcatataagcagctgctttttgctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaa
ccactgcttaagcctcaataaagcttgcccttgagtgttcaagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttag

ctgagtgtaggaaatctctagcagtggtggccgaacaggggacttgaagcggaagggaacacagaggagctctctcgacgcaggactcggttgcctgaagcgcacacggaagaggcgagggcgcgcgactggtgagtagcgcacaaatatttactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagttatgaaggggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaaatataaataaaacatatagtagggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaagatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaagtaagaccaccgcacagcaagcggcgcgcgctgatcttcagacctggaggaggagatatagggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagtaggtgcagagagaaaaagagcagtgggaaataggagctttgttccctgggttcttgggagcagcaggaagcactatggcgcgagcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtcagcagcagaacaatttgctgagggtattaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttggggtgctcttgaaaaactcatttgaccactgctgtgcttggaaatgctagttggagtataaatctctggaacagatttggaaatcacagacctggatggagtgggacagagaaataaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaaagatgaacaagaattattggaaatagataaatgggcaagtttgtggaattgggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtaggtttaagaatagtttttgtctgactttctatagtgaatagagtaggacaggatattaccattatcggttcagaccacctcccaaccccaggggaccgcagagggccgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgccgaattaatcacaaatggcagttatcatccacaattttaaaagaaaaggggggatggggggtagagtgacggggaaagaatagtagacataatgaacacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaaatttcgggtttattacaggCGcGCcagagatccagtttggacCTgcAGGTGAAAACCCACCTGTAGGTTTGCAAGTtagctTAAGTAACGCCATTTTGAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGATATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTCTGCCCCGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGCGAACCATCAGATGTTTCCAGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTtGCTTCTtGCTTCTGTTtGtGtGCTTC TGCTCCctGAGCTCAATAAAAGAGCCACAACCCCTACTtGgtGgGCCAGTCTCTtGATAGACTGtGTCcCtGgATACCCGTAcggtaccgctagcgccaccatggatacctggctcggtgtgttgggcatctttagcctgctgaaggccggactgaccgagcctgaagtgaaccagactccaagccatcaagtgactcagatggggcaagaagtcattctgcgttgcgtgcccatcagcaaccacctgtacttttattggatcgccagatcctgggccaagaagtggaaattcctgggtgctcttacaacaatgagatctccgagaagtcagagatcttcgacgaccagttctecgtggaaagaccgcagggcagcaacttcacactgaagatccggtctaccaacttgaggactccgctatgtatttttgtgcAATCACAGGTGCGGTTTCATATGAGCAATATTTGCGGCCGGGCACCAAGGCTCACGGTCACAGAAGATCTGACAAAGGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTAAGGCCGAGATCGCCACACACAAAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTCCCGACACGTGGAACGTGTTTGGTGGGTCAACGGCAAGAGGTGCACTCCGGCGTGTAACGGATCCCCAGCCTCTGAAAGAACAGCCTGCCCTGAACGACAGCCGTTACTGCTGAGCTCCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTTGGCAGAACCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACACAAATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGAAGAGCCGATTGCGGCATCACCAGCGCCTCCTATCACAGGGCGTGCTGAGCGCCACAATCCTGTACGAAATCCTGTCTGGGAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGTCTGATGGCCATGGTCAAGGGGAAGGACTTTGGCAGCGGCAGAGCCAAAAGGTCCGGGAGCGGTGCGACAAACTTTAGCCTGTTGAAAcaagccggCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCTatgctgctgatcacctccatgctggtgctgtggatgcagctgagccaagtgaacggccagcaagtgatgcagatccctcagtagcagcagtgcaagaaggcaggacttcaccacctactgcaacagcagcaccacactgagcaacatccagtggtacaagcagcggcctggcggaacacctgtgtttctgatccagctggtcagtagccggcgaagtgaagaagcagaagcggtgaccttcagtttcggcgaggccaagaagaacagcagctgacatcaccgccacacagaccacagatgtgggcacctacttcTGCGCTGGCATCGGTAGCAGCAACACCGGTAAGCTCATCTTTGGGCAAGGGACAACCTTACAAGTAAAACAGacatccagaaccccgacccgccgtgtaccagctgagggactccaagtcagcgcacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggtccaacaagagcgacttcgcctgcgccacgccttcaacaacagcatcatccccagggaacacctcttccccagcagcgacgtgcctcgacagtgaaactggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaactttcagaacctgctggtgatcgtgctgcggattctgctgCTGAAAGTGGCCGGCTTCAATCTGCTGATACCCTGCGGCTGTGGAGCAGCAGGGCTAAGAGGTCCGGCAGCGAGCCACCAATTTTCCCTGTGTAACAGGCTGGTGACGTGGAAGAAAACCTTGCCCCATGGGTGCGGGGCTGCTCAGGGGCCGTGTGGCCGCTGCACATCGTCTGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCAACCGCACGTTTCAAGAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTCACTGACAACAACGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAAATTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAAGAAATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCATGACCCCAAGCTCCCTTACCATGACTTTATTTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAGTGCAATTATGAAGGAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTTCTGTAGCTCTGATGAGTGAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGATATAACACCAGCAATCCTGACTTGTGTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACCTGGGAGTTGCCATATCTGTGCATCATCATCTTCTACTGTACTCCGGGTTaaccggcagcagaagTAGTGATAAatcgatagatcctaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggatattcttaactatgttgcctctttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctgggtgtgtgtctctttatgaggagttgtggccggtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcaactgtgtttgtgtgacgcaacccccactggttggggcatttgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgcccacggcggaactcatcgccgcctgccttgccccgtgtgtggacaggggctcggtgttgggcaactgacaattccgtggtgttgtcggggaatcatcgtcctttccttggtgctgcctgtgtgtgccaccgtgattctgcgcgggagctccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcccgcggcctgctgccggtctcgcggtcttccggtcttcgcgtcttcgccttcgacagagtcggatctccctttgggcgcctccccgcctgagatcctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagcc

actttttaaagaaaagggggactggaagggttaattcactcccaacgaagacaagatctgcttttgccttgtaggggtctctctggtagaccagatct
gagcctgggagctctctggctaactaggggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccctgagtgcttcaagtagtggtgcccgtctgttgtgact
ctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaatctctagcagtagtagtcatgtcatctattattcagatttataacttgcaaga
aatgaatatcagagagtgagagggccgggttaattaaagaaagggttagatcatcttgaagacgaaagggcctcgtgatacgcctattttataggtta
gtcatgataataatgggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttggtttattttctaaatacattcaa
atgtatccgctcatgagacaataaacctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagattcaacatttccgtgtgcgccttattcc
ctttttgcg
gcattttgccttctgtttttgctcaccagaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactgga
ctc
aacacgggtgaagatccttgagagtttgcggccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccg
tgtgac
gccgggcaagagcaactcggtcgcccatacactattctcagaatgacttgggtgagtagtaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgac
agagaatgatgagtgctgccataacatgagtgataaacactgcggccaacttactctgacaacgatcggaggacgaaggagtaaccgctttt
tgca
aacatgggggatcatgtaactcgcttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtag
caatggca
acaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttccggcaacaataatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccact
ctg
cgctcgcccttccggctggctgggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcatgagcactggggccagatg
gttaagccc
tccgtatcgtagtattctacacgacggggagttaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagatagggtgcctcactgattaag
cattggta
ctgtcagaccaagttagtcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtagaatcctttttgataat
ctcatgacc
aaaatcccttaacgtgagtttctgttccactgagcgtcagaccctgagaaaagatcaaaggatctcttgagatccttttttctgcggt
aatctgtgc
ttgcaacaaaaaaaccacgctaccagcgtgggttgggttgcgggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagc
gcagata
ccaaatactgttctctagttagccgttagtaggcccacttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgctctgtaaatcctgttaccag
tggt
gctgccagtggcgataaagtctgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgagcgggtcggttgaacggggggttctg
tcacacag
cccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgttccgaaggagaaaggcgga
caggtatccg
gtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgaggagcttccaggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcggttctcgccacctg
tacttgag
cgtcgattttgtgatgctcgtcagggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttgcctggcct
tttgc
atgttcttctgcgttatccCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCG
CAGCGAG
TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATATGCAGCAAGCTCATGG
CTGACTAATTTTTT
TTATTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGCCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAAAG
CTCCCCGTGG
CACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACT
TTATGCTTCCG
GCTCGTATGTTGTGTGAATTTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAACAGCTATGACATGATTACGAATTCACAAATAAAGCAT
TTTTTTTCACTGCAT
TCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCAACTGGATAACTCAAGCTAACCAAAATCATCCAA
AACTTCCCACCCATAC
CCTATTACCACTGCCAATTACCTGTGGTTTCATTTACTCTAAACCTGTGATTCTCTGAATTATTTTCATTTAAAGAAATTTGATTTG
TTAAATATGTACT
ACAAACTtagtagt

[0308] 벡터: pNVVD154_TSC-200-A02_TCR-28_MSCV-TCR28-CD8-EF1a-TGFR-DHFR

[0309] GAATTCGTCGACGCTAGCTGGCTTGTGTCCACAACCATTAACCTTAAAGCTTTAAAGCCTTATATATTCTTTTTTCTTATAAACTTAAACCTTA
GAGGCTATTTAAGTTGCTGATTATATTAATTTATTGTTCAACATGAGAGCTTAGTACGTGAACATGAGAGCTTAGTACATTAGCCATGAGAGCTTAGT
ACATTAGCCATGAGGTTTAGTTCATTAACATGAGAGCTTAGTACATTAAACATGAGAGCTTAGTACATACTATCAACAGTTGAAGTGTGATCTGTACA
GTAGAATTGGTAAGAGAGTTGTGTAATAATTTAGTTTCGCACATCTGTTGCTGATTATTGATTTTGGCGAAACATTGATCATATGACAAGATGTGT
ATCTACCTTAACTTAATGATTTTGATAAAAAATCATTAGGTACCAATTACATTGCTTGAATTAACCTTTAACGGTTATAAGGATCTAGATGAGATAGAAAG
ATTTGGTTTTCGGATTTGTGTACATAAGATGCCTAAAATAAAATTTAGATTCAATTTTTTTTAACTTTTTTTAATTGGTGGTAAGAATATCCCTCTA
CCTGTTTGAGAGTAATGAAATTTAGTATGATTTTTCAACAACTAAAAAACAATAAATCTCACATAATAACTTTATTTCATCACACAATTGAATACC
AATAGTTGACAGTACTTACCAGCCTGCAGGTGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGTTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGAAGGCATGGAATAACAT
AACTGAGAATAGAGAAGTTAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGAGCAGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGCTCAGG
GCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCCGCCTCAGCAGTTTCTAGCGAACCATCAGATGTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGC
CTTATTTGAACTAACCAATCAGTTTGTCTTCTGTTTGTGTGCTTCTGCTCCTGAGCTCAATAAAAGAGCCCAACCCCTCACTTGGTGGGCCAG
TCCTCTGATAGACTGTGTCCTGGATACCCGTACGGTACCGCTAGCGCCACCATGGATACCTGGCTCGTGTTGGGCCATCTTAGCCTGCTGAAGGCCG
GACTGACCGAGCCTGAAGTGACCCAGACTCCAAGCCATCAAGTGACTCAGATGGGGCAAGAAGTCAATTCTGCGTTGCGTGCCCATCAGCAACCACTGTACT
TTTATTGGTATCGCCAGATCCTGGGCCAGAAAGTGAATTCCTGGTGTCTCTTACAACAATGAGATCTCCGAGAAGTCCGAGATCTTCGACGACCACTTCT
CCGTGGAAGACCCGACGGCAGCAATTCACACTGAAGATCCGGTCTACCAACTTGAGGACTCCGCTATGATTTTTTGTGCAATCACAGGTGCGGTTTCAT
ATGAGCAATATTTCCGGGCCGGGACAGGCTCAGGTCACAGAAGATCTGAACAAGGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTGAGGCTTCTAAGGCCGAGA
TCGCCCACACAAAAAGCCACCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTTCCCGACCACTGGAAGTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAGAGGTGCACTCCG
GCGTGTCAACGATCCCCAGCCTCTGAAGAACAGCCTGCCCTGAACGACAGCCGCTACTGCCTGAGCTCCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGA
ACCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTTTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACACAAATCGTGTCTG

CCGAAGCCTGGGGAAGAGCCGATTGCGGCATCACCAGCGCCTCCTATCACCAGGGCGTGCTGAGCGCCACAATCCTGTACGAAATCCTGTGTTGGCAAGGCCA
 CCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACTTTGGCAGCGGCAGAGCCAAAAGTCCGGGAGCGGTGCGACAA
 ACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGACCTATGCTGTGATCACCTCCATGCTGGTGTGTTGGATGCAGCTGAGCCAAGTGA
 ACGGCCAGCAAGTGATGCAGATCCCTCAGTACCAGCAGTGCAAGAAGCGAGGACTTCACCACCTACTGCAACAGCAGCACCACACTGAGCAACATCCAGT
 GGTACAAGCAGCGGCCTGGCGGACACCTGTGTTTCTGATCCAGCTGGTCAAGTCCGGCGAAGTGAAGAAGCAGAAGCGGCTGACCTTCCAGTTCGGCGAGG
 CCAAGAAGAAGCAGCAGCCTGCACATCACCGCCACACAGACCACAGATGTGGGCACCTACTTCTGCGCTGGCATCGGTAGCAGCAACACCGGTAAGCTCATCT
 TTGGGCAAGGGACAACCTTACAAGTAAACCAGACATCCAGAACCCCGACCCCGCGGTGTACCAGCTGAGGGACTCCAAGTCCAGCGACAAGAGCGTGTGTC
 TGTTTACGGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGAGTCAAAGCAAGGACAGCGAGCTTACATAACGGATAAGACCGTGTGGACATGCGGAGCATGGACTTCA
 AGAGCAACAGCGCGCTGGCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATCATCCCGAGGACACCTTCTTCCCAGCAGCG
 ACGTGCCTGCGACGTGAAACTGGTGGAGAAGTCTTCGAGACAGACACCAATCTGAACTTTTCAGAACCTGTGTTGCTGCTGCGGATTCTGCTGTGTA
 AAGTGGCCGGCTTCAATCTGCTGATGACCTGCGGCTGTGGAGCAGCAGGGGTAAGAGGTCCGGCAGCGAGCCACCAATTTTCCCTGTGAAACAGGCTG
 GTGACGTGGAAGAAAACCTGGCCCCATGGCGCTGCCCGTACCAGCGCTGCTGCTGCCCCGGCGCTGCTGTTACACGCCGCTCGGCCAGAGCTTCCACCC
 AGGGCACATTCTCCAACGTGTCCACCAATGTGTGCGGAGGCGGGGATCGTCCAGTTCAGAGTGTCCCTCTGGACCGCACCTGGAACCTGGGCGAGACCG
 TGGAGCTGAAATGTAGGTCCTGCTGAGCAACCCGACCTCCGGGTGAGTTGGCTGTCCAGCGCGTGGTGTGCGCGAAGCCCTACGTTCTCTGCTTTACC
 TGAGCCAGAACAGCCCAAGGCGCCGAGGGCTGGACACCCAGAGATTCTCCGGCAAGCGCCTGGGGGACACATTCTGCTTACTTTGAGCGATTTCGCCA
 GAGAGAACGAGGGTACTATTTCTGTTGCGCGCTGAGCAATTCATCATGTATTTCAGCCACTTTGTGCCAGTGTCTCTGCTGCCAAGCTACCAACAC
 CAGCTCCCCGTCCCCGACTCCGGCGCTACCATCGCGAGTCAACCGTTGAGCCTGAGGCTTGTGCGCCGCTGCGGGGGTGGCGTCCACACCA
 GGGGCTCGACTTTGCGTGCACATCTATATTGGGCGCTCTGGCGGTACCTGCGGGGTGCTGCTGCTGCTATTGGTGATTACCTGTACTGCAATCACC
 GCAACCGCGCGGGTCTGTAAGTGCCACGGCTGTGGTCAAGTCCGGTGACAACCGTCTGCTCTCGGCTCGCTACGTGCGCGTAAGCGCAGCGGTTCCG
 GGGCCACCAACTTTTCATTGCTGAAGCAGGCGGTGATGTGAGGAGAATCCAGGGCCCATGCGCCCCAGGCTTTGGCTCCTTCTGCTGCTCAGCTACTG
 TCTTGATGGCAACTCCGTTCTGCAGCAGACTCCCGCTACATCAAGGTGCAGACGAACAAGATGGTGATGCTGTCATGCGAGGCCAAGATCTCTCTTTCAA
 ATATGAGAATTTATTGGCTACGACAGCGCCAGGCCCCCTCCAGCGACAGCCACCACGAGTTCTGGCGCTTTGGGATTCTGCTAAAGGCACCATCCATGGAG
 AGGAGGTGGAACAGGAGAAGATAGTGTCTTCCGCGACGCATCCCGCTTCATCTGAACCTGACCAGCGTGAAGCCGAGGACAGCGGCATCTACTTCTGTA
 TGATCGTTGGCTCCCCGAGCTGACCTTCGGCAAAGGCACCCAGCTGTCGTGGTGGACTTCTGCCACCACAGCCAGCCAAAGAAATCCACCTCA
 AGAAGCGCGTGTGCCGACTGCCCGCCCTGAAACCCAGAAGGGCCCTGTGTCTCCCCATCACCTTGGACTGCTGGTGGCGGGAGTCTGGTGTGCTCG
 TATCTCTGGGTGTGCCATCCACCTGTGCTGCCCGCGCGCGCGCCGCTGAGGTTTATGAAACAGTTTACAAGTGATAAATCGATGGAAGGTGGCAT
 CCTGTGACCCCTCCCCAGTGCTCTCTGCGCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCACCAGCCTGTCTTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGAC
 TAGGTGTCTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGCGCTCGGGGTCTATTGGGAACCA
 AGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTGGCTCACTGCAATCTCCGCTCTGGGTTCAAGCATTTCTCTGCTCAGCCTCCGAGTTGTTGGGATTCAGGCA
 TGCATGACCAGGCTCAGTAATTTTTGTTTTTGGTAGAGACGGGTTTACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCAATCTCAGGTGATCTACCCA
 CCTTGGCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCTTCTGATTACTAGTGGCTCCGGTGCCGTCAGTGGGCAGAGCGC
 ACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGTGGGAGGGGTGGCAATTGAACCGGTGCTAGAGAAGGTGGCGGGGTAACATGGGAAAGTATGCTGTGTAC
 TGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGAACGGGTTTGGCGCCAGAACAGGTA
 AGTGGCGTGTGTGTTCCCGCGGCCCTGGCCCTTTACGGGTTATGGCCCTTGGCTGCCTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCC
 GAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGAGAGTTCGAGGCTTGGCTTAAGGAGCCCTTCGCTCGTGTGATTGAGGCTGGCTGGGCGTGGGGCCGC
 CGCGTGCATCTGGTGGCACCTTCGCGCTGTCTGCTGCTTTGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGG
 CAAGATAGTCTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTGCGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGACGGGGCCGTGCGTCCAGCGCACATGTTG
 GCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGAGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCTGCTGTGTGCTGGCTGCGCGCCGTGTATCGCC
 CCGCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACAGTGTGCTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGG
 CGCTCGGAGAGCGGGCGGGTAGTCAACCCACAAAGGAAAAGGGCCCTTCCGTCTCAGCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGCTCC
 AGGCACCTCGATTAGTTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACT
 GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATCTCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGT
 TTTTTCTTCCATTTCAAGTGTGCTGAACCTAGTCCAGTGTGGTGAATTTCTGAGATATCACGGCTAGCGCCACCATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCTG
 TGGCGCTGCATCGTCTGTGGACGCGTATCGCCAGCAGATCCACCGCACGTTTCAAGTCCGTGAATAACGACATGATGCTACTGACAACAACGGT
 GCAGTCAAGTTCCACAACCTGTGTAATTTTGTGATGTGAGATTTCACCTGTGACAACAGAAATCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACTCCATCTGT
 GAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGGCTGTATGGAGAAAGATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCATGACCCCAAGTCCCTACCATGACTTT
 ATTCTGGAAGATGCTGCTCTCCAAAGTGATATGAAGGAGAAGAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTATGTGTTCTGTAGCTCTGATGAGTGAATGAC
 AACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCTGACTTGTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCTGCCACCACTGGGAGTTGCC
 ATATCTGTATCATCATCTTCTACTGCTACCGGTGAACCGGCAGCAGAAGGCTAGTGGTTAGGCGCAACGAATTTCTTTGTGTAAGCAGGCTGGGGAT
 GTCGAAGAAAATCCGGGTCCAATGGTGGGCTCGCTCAACTGCATCGTAGCAGTCTCCAGAATATGGGCATCGGAAGAACGGTGATTCCCGTGGCCCCCA
 CTTGCAACGAGAGCCGTATTTTCCAAGAATGACTACAACCTCTCCGTGGAGGTAAGCAGAACCTGGTCATCATGGGAAGAAGACCTGGTTCTCTATC

CCTGAAAAAACCGCCCCCTGAAGGGCGCATCAACCTGGTGTGAGCAGGGAACCAAGGAGCCTCCTCAGGGCGCGCATTTTCTGAGCCGCTCATTGGAT
GACGCTCTCAAACGTACCGAACAGCCGAGCTAGCCAACAAGGTGGACATGGTGTGGATCGTCGGAGGCTCCTCCGTGTACAAGGAGGCCATGAATCACCCC
GGCCACTTGAAGCTGTTTCGTCACCCGGATCATGCAGGACTTCGAGTCGGACACGTTCTTCCAGAGATTGACCTGGAGAAGTACAAGCTGCTGCCCGAGTAC
CCGGGAGTCTTAGTGATGTGCAGGAGGAGAAAGGCATCAAGTACAAATTTGAGGTGTACGAGAAGAACGCTAACGGTCCGTCCTGACCAATGCTGGAGTT
CTTCGCCCACCCCACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTTCAAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAG
TTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACAGGTTACCTCAGTCTCCTAGGTACGTTTATATCTATGAAAAACATTCAAAGC
ACAACATCTAGAAGAACTTACCTTTTTTACCACCTCTATTGCAAAGATATGTACCGATTTCTCTCGAAGTACAAAAACCGTAGTTTTCAAATTCACCTCA
AGACTTTGAAAAAAATGAATCTGTCAATGTCAAATAAATCAGAAACAAATGTCATAATGTTACGTTAATGTTGTCAGGTCGAAAAATAAATGCAAAT
AGAAATTTGTTCCTTTTTTATTGGTTTTATTGGTGGGAAAAATATCCCTCTAACTGCAAAAGGGTTAATTATGTTAGAGGTAGAGTCGACAAGCTT

pNVVD154_TSC-200-A02_TCR-28_MSCV-TCR28-CD8-EF1a-TGFR-DHFR 벡터의 맵



키: CD: 분화 클러스터 RNA-OUT: sacB에 의해 인코딩된 박테리아 레반수크라제에 대한 안티센스 RNA. SV: 유인
원 바이러스 TCR: T 세포 수용체, TIR: 말단 역전 반복, QBend: 마우스 항 인간 CD34 항체, dnTGFbRII: 우세
음성 TGF 베타 수용체 II, DHFR: 디히드로폴레이트 환원효소 선택 마커

벡터: pNVVD160_TSC-200-A02_TCR-28_MSCV-TCR28-CD8-EF1a-TGFR-DHFR

GAATTCGTCGACGCTAGCTGGCTTGTGTCCACAACCATTAACCTTAAAGCTTTAAAGCCTTATATATTCTTTTTTCTTATAAACTTAAACCTTA
GAGGCTATTTAAGTTGCTGATTATATTAATTTTATTGTTCAAACATGAGAGCTTAGTACGTGAACATGAGAGCTTAGTACATTAGCCATGAGAGCTTAGT
ACATTAGCCATGAGGGTTTAGTTCATTAACATGAGAGCTTAGTACATTAAACATGAGAGCTTAGTACATACTATCAACAGGTGAAGTGTGATCTGTACA
GTAGAATTGGTAAAGAGAGTTGTGTAATAATTTAGTTTCGCACATCTGTTGTCTGATTATTGATTTTGGCGAAACATTGATCATATGACAAGATGTGT
ATCTACCTTAACTTAATGATTTTGATAAAAAATCATTAGGTACCAATTACATTGCTTGAATTAACCCCTTAACGGTTATAAGGATCTAGATGAGATAGAAAG
ATTTGGTTTTCGGATTTGTGTACATAAGATGCCTAAAATAAAAAATTGAGATTCAATTTTTTTTAACTTTTTTTAATTGGTGGTAAGAATATCCCTCTA
CCTGTTTGAGAGTAATGAAATTTAGTATGATTTTTCAACAACTAAAAAACATAAATCTCACATAATAACTTTATTTCAATCACACAATTGAATACC
AATAGGTTGACAGTACTTACCAGCTGCAGGTGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGTTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGAAGGCATGGAATAATACAT
AACTGAGAATAGAGAAGTTGAGTCAAGGTTAGGAACAGAGAGAGCAGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGG
GCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGCGAACCATCAGATGTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGC

TTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAACTAGTCCAGTGTGGTGAATTCTGCAGATATCACGGCTAGCGCCACCATGGGTCGGGGGTGCTCAGGGGCTG
TGGCCGCTGCACATCGTCTGTGGACGCGTATCGCCAGCAGCATCCACCGCACGTTTCAGAAAGTCGGTGAATAACGACATGATAGTCACTGACAACAACGGT
GCAGTCAAGTTTCCACAACGTGTAAATTTTGTGATGTGAGATTTCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGT
GAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTT
ATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAGGAGAAGAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTCTGTAGTGAATGAC
AACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCTGACTTGTGTAGTCATATTTCAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCC
ATATCTGTATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTGAACCGGCAGCAGAAGGCTAGTGGTTCAGGCGCAACGAATTTCTCTTTGCTGAAGCAGGCTGGGGAT
GTCGAAGAAAAATCCGGGTCCAATGGTGGGCTCGCTCAACTGCATCGTAGCAGTCTCCAGAATATGGGCATCGGGAAGAACGGTGATTTCCTGGCCCCCA
CTTCGCAACGAGAGCCGTTATTTCCAAAGAATGACTACAACCTCCTCCGTGGAGGGTAAGCAGAACCTGGTCATCATGGGAAGAAGACCTGGTTCTCTATC
CCTGAAAAAACCGCCCTGAAGGGCCGCATCAACCTGGTGTGAGCAGGGAATCAAGGAGCCTCCTCAGGCGCGCATTTTCTGAGCCGCTCATTGGAT
GACGCTCTCAAAGTACCGAACAGCCGAGCTAGCCAACAAGGTGGACATGGTGTGGATCGTCGGAGGCTCCTCCGTGTACAAGGAGGCCATGAATCACCCC
GGCCACTTGAAGCTGTTCTGTCACCCGGATCATGCAGGACTTCGAGTCGGACAGTTCCTTTCCAGAGATTGACCTGGAGAAGTACAAGCTGTGCCCAGTAC
CCGGGAGTTCTTAGTGATGTGCAGGAGGAGAAAGGCATCAAGTACAAATTTGAGGTGTACGAGAAGAACGACTAACGGTCCGTCCTGACCAATGCTGGAGTT
CTTCGCCACCCCACTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTACAAATAAAGCATTTTTCCTACTGCATTCTAG
TTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACAGGTTACCTCAGTCTCCTAGGTACGCTTATATCTATGAAAAACATTCAAAGC
ACAACATCTAGAAGAACTTACCTTTTTTACCACCTCTATTGCAAAGATATGTACCGATTTCTCTCGAAGTACAAAAAACCGTAGTTTTCAAATTCACCTCA
AGACTTTGAAAAAAATGAATCTGTCAATGTCAAATAAAATCAGAAACAAATGTCATAATGTTACGTTAATGTGTGTCAGGTCGAAAAATAAAATTGCAAT
AGAAATTTGTCTTTTTTATTGGTTTTTATTGGTGGGAAAAATATCCCTCTAACTGCAAAAGGGTTAATTATGTTAGAGGTAGAGTCGACAAGCTT

[0315] pNVVD160_TSC-200-A02_TCR-28_MSCV-TCR28-CD8-EF1a-TGFR-DHFR 벡터의 맵



[0316]

[0317] 키: CD: 분화 클러스터 RNA-OUT: sacB에 의해 인코딩된 박테리아 레반수크라제에 대한 안티센스 RNA. SV: 유인 원 바이러스 TCR: T 세포 수용체, TIR: 말단 역전 반복, QBend: 마우스 항 인간 CD34 항체, dnTGFbRII: 우세 음성 TGF 베타 수용체 II, DHFR: 디하이드로폴레이트 환원효소 선택 마커

[0318] * 표 3의 벡터에 대한 주석은 다음과 같다: MSCV 프로모터는 굵게 표시되어 있다. 베타 사슬은 굵은 이탤릭체를

사용하여 주석 처리된다. 알파 사슬은 굵은 밑줄이 그어진 텍스트를 사용하여 주석 처리된다. Q 태그는 이탤릭체와 밑줄이 그어진 텍스트를 사용하여 주석 처리된다. CD8-알파는 이탤릭체이다. CD8-베타는 밑줄이 그어져 있다.

[0319] * 표 1-3에는 표 1-4에 열거된 임의의 서열번호의 아미노산 서열 또는 이의 일부와 그 전장에 걸쳐 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 분자뿐만 아니라 펩티드 에피토프가 포함된다. 이러한 폴리펩티드는 본원에 추가로 기재된 바와 같은 전장 펩티드 또는 폴리펩티드의 기능을 가질 수 있다.

[0320] * 표 1-3에는 표 1-4에 열거된 임의의 서열의 핵산 서열 또는 이의 일부와 그 전장에 걸쳐 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 핵산 서열뿐만 아니라 RNA 핵산 분자(예를 들어, 티민이 우레딘으로 대체됨), 인코딩된 단백질의 오르톨로그를 인코딩하는 핵산 분자가 포함된다. 이러한 핵산 분자는 본원에 추가로 기재된 바와 같은 전장 핵산의 기능을 가질 수 있다.

[0321] 일부 구체예에서, 본원에 개시된 결합 단백질은 T 세포 수용체(TCR), TCR의 항원-결합 단편, 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본원에 개시된 결합 단백질은 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함할 수 있고, 이들 각각은 TCR 알파 사슬의 CDR3 및 TCR 베타 사슬의 CDR3, 또는 TCR 알파 사슬 및 TCR 베타 사슬 둘 모두의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 가변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 결합 단백질은 TCR V_α 및 TCR V_β 도메인 둘 모두를 포함하지만, 단지 단일 TCR 불변 도메인(C_α 또는 C_β)을 포함하는 단일 사슬 TCR(scTCR)을 포함한다. 용어 "키메라 항원 수용체"(CAR)은 자연적으로 발생하지 않거나 숙주 세포에서 자연적으로 발생하지 않는 방식으로 함께 연결된 2개 이상의 자연 발생 아미노산 서열을 함유하도록 조작된 융합 단백질을 지칭하며, 이 융합 단백질은 세포의 표면에 존재하는 경우 수용체로서 기능할 수 있다. 본 발명에 포함되는 CAR은 막횡단 도메인 및 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인(임의적으로 공동-자극 도메인(들)을 함유함)에 연결된 항원-결합 도메인(즉, 면역글로불린 또는 면역글로불린-유사 분자, 예컨대, 항체 또는 TCR, 또는 NK 세포로부터의 킬러 면역수용체로부터 유래되거나 수득된 항원 결합 도메인으로부터 수득되거나 유래됨)을 포함하는 세포의 부분을 포함할 수 있다(예를 들어, 문헌[Sadelain 등 (2013) *Cancer Discov.* 3:388, Harris and Kranz (2016) *Trends Pharmacol. Sci.* 37:220, and Stone 등 (2014) *Cancer Immunol. Immunother.* 63:1163] 참조).

[0322] 일부 구체예에서, 1) TCR 알파 사슬 CDR, TCR V_α 도메인 및/또는 TCR 알파 사슬은 표 1에 열거된 TRAV, TRAJ 및 TRAC 유전자의 군으로부터 선택되는 TRAV, TRAJ 및/또는 TRAC 유전자 또는 이의 단편에 의해 인코딩되고/거나 2) TCR 베타 사슬 CDR, TCR V_β 도메인 및/또는 TCR 베타 사슬은 표 1에 열거된 TRBV, TRBJ 및 TRBC 유전자의 군으로부터 선택되는 TRBV, TRBJ 및/또는 TRBC 유전자 또는 이의 단편에 의해 인코딩되고/거나 3) 결합 단백질의 각각의 CDR은 표 1에 열거된 동족 기준 CDR 서열과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환, 삽입, 결실 또는 이들의 조합을 갖는다.

[0323] 일부 구체예에서, 본원에 개시된 결합 단백질(예를 들어, TCR, TCR의 항원-결합 단편, 또는 키메라 항원 수용체(CAR))은 키메라(예를 들어, 하나 초과와 공여자 또는 종돌로부터의 아미노산 잔기 또는 모티프를 포함함), 인간화된(예를 들어, 인간에서 면역원성의 위험을 감소시키도록 변경되거나 치환된 비-인간 유기체로부터의 잔기를 포함함), 또는 인간 결합 단백질이다.

[0324] 조작된 결합 단백질, 예를 들어, TCR, CAR 및 이의 항원-결합 단편을 생산하기 위한 방법은 당 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, Bowerman 등 (2009) *Mol. Immunol.* 5:3000; 미국 특허 번호 6,410,319; 미국 특허 번호 7,446,191; US 특허 공개 번호 2010/065818; US 특허 번호 8,822,647; PCT 공개 번호 WO 2014/031687; 미국 특허 번호 7,514,537; 및 Brentjens 등 (2007) *Clin. Cancer Res.* 73:5426).

[0325] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 결합 단백질은 세포 표면에서 발현된 TCR 또는 이의 항원-결합 단편이고, 여기서 세포 표면-발현된 TCR은 내인성 TCR과 비교하여 CD3 단백질과 더 효율적으로 회합할 수 있다. 본 발명에 포함되는 결합 단백질, 예를 들어, TCR은 또한 T 세포와 같은 세포의 표면에서 발현되는 경우 내인성 TCR과 같은 내인성 결합 단백질과 비교하여 세포 상에서 더 많은 표면 발현을 가질 수 있다. 일부 구체예에서, CAR의 결합 도메인이 항원-특이적 TCR 결합 도메인을 포함하는 CAR이 본원에 제공된다(예를 들어, Walseng 등 (2017) *Scientific Reports* 7:10713).

- [0326] 또한, 출발 결합 단백질로부터의 특성을 변경할 수 있는 변형된 결합 단백질을 조작하기 위해 본원에 개시된 V_{α} 및/또는 V_{β} 서열 중 하나 이상을 갖는 결합 단백질을 출발 물질로서 사용하여 널리 공지된 방법에 따라 제조될 수 있는 변형된 결합 단백질(예를 들어, TCR, TCR의 항원-결합 단편 또는 CAR)이 제공된다. 결합 단백질은 하나 또는 둘 모두의 가변 영역(즉, V_{α} 및/또는 V_{β}), 예를 들어, 하나 이상의 CDR 영역 내에 및/또는 하나 이상의 프레임워크 영역 내에서 하나 이상의 잔기를 변형시킴으로써 조작될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 결합 단백질은 불변 영역(들) 내의 잔기를 변형시킴으로써 조작될 수 있다.
- [0327] 또 다른 유형의 가변 영역 변형은 V_{α} 및/또는 V_{β} CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역 내의 아미노산 잔기를 돌연변이시켜 관심 결합 단백질의 하나 이상의 결합 특성(예를 들어, 친화성)을 개선시키는 것이다. 부위-지정 돌연변이 유발 또는 PCR-매개 돌연변이 유발은 돌연변이(들)를 도입하기 위해 수행될 수 있고, 단백질 결합에 대한 효과, 또는 관심 있는 다른 기능적 특성은 본원에 기재되고 실시예에 제공된 바와 같이 시험관내, 생체외 또는 생체내 검정에서 평가될 수 있다. 일부 구체예에서, 보존적 변형(상기 논의된 바와 같음)이 도입될 수 있다. 돌연변이는 아미노산 치환, 첨가 또는 결실일 수 있다. 일부 구체예에서, 돌연변이는 치환이다. 또한, 전형적으로 CDR 영역 내의 1, 2, 3, 4 또는 5개 이하의 잔기가 변형된다.
- [0328] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 결합 단백질(예를 들어, TCR, TCR의 항원-결합 단편 또는 CAR)은 자연 발생 TCR에 비해 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 결합 단백질의 각각의 CDR은 표 1에 열거된 동족 참조 CDR 서열과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환, 삽입, 결실, 또는 이들의 조합을 갖는다. 아미노산의 보존적 치환은 잘 알려져 있으며, 자연적으로 발생할 수 있거나 결합 단백질이 재조합적으로 생산되는 경우 도입될 수 있다. 아미노산 치환, 결실 및 부가는 당 분야에 공지된 돌연변이 유발 방법을 사용하여 단백질에 도입될 수 있다(예를 들어, 문헌[Sambrook 등 (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 참조]. 올리고뉴클레오티드-지정 부위-특이적(또는 세그먼트 특이적) 돌연변이 유발 절차는 원하는 치환, 결실 또는 삽입에 따라 변경된 특정 코돈을 갖는 변경된 폴리뉴클레오티드를 제공하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 무작위 또는 포화 돌연변이 유발 기술, 예컨대, 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발, 오류 경향이 있는 폴리머라제 연쇄 반응 돌연변이 유발 및 올리고뉴클레오티드-지정 돌연변이 유발은 번역원 폴리펩티드 변이체를 제조하는데 사용될 수 있다(예를 들어, Sambrook 등 상기 참조).
- [0329] 당업자에게 공지된 다양한 기준은 펩티드 또는 폴리펩티드의 특정 위치에서 치환된 아미노산이 보존적(또는 유사)인지 여부를 나타낸다. 예를 들어, 유사한 아미노산 또는 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 아미노산이 하기 카테고리에 포함될 수 있다: 염기성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘); 산성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산); 하전되지 않은 극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 히스티딘); 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판); 베타-분지형 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신), 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판). 분류하기 더 어려운 것으로 간주되는 프롤린은 지방족 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 류신, 발린, 이소류신 및 알라닌)과 특성을 공유한다. 일부 구체예에서, 글루탐산에 대한 글루타민 또는 아스파르트산에 대한 아스파라긴의 치환은 글루타민 및 아스파라긴이 각각 글루탐산 및 아스파라긴산의 아미드 유도체라는 점에서 유사한 치환으로 간주될 수 있다. 당 분야에서 이해되는 바와 같이, 2개의 폴리펩티드 사이의 "유사성"은 폴리펩티드의 아미노산 서열 및 이에 대한 보존된 아미노산 치환기를 제2 폴리펩티드의 서열과 비교함으로써 결정된다(예를 들어, GENEWORKS™, Align, BLAST 알고리즘, 또는 다른 본원에 기술되고 당 분야에서 실시되는 알고리즘).
- [0330] 일부 구체예에서, 인코딩된 결합 단백질(예를 들어, TCR, TCR의 항원-결합 단편 또는 CAR)은 "신호 펩티드"(리더 서열, 리더 펩티드 또는 전이 펩티드로도 공지됨)를 포함할 수 있다. 신호 펩티드는 새로 합성된 폴리펩티드를 세포 내부 또는 외부의 적절한 위치로 표적화한다. 신호 펩티드는 국소화 또는 분비가 완료되는 동안 또는 완료되면 폴리펩티드로부터 제거될 수 있다. 신호 펩티드를 갖는 폴리펩티드는 본원에서 "예비-단백질"로 지칭되고, 이들의 신호 펩티드가 제거된 폴리펩티드는 본원에서 "성숙" 단백질 또는 폴리펩티드로 지칭된다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 결합 단백질(예를 들어, TCR, TCR의 항원-결합 단편 또는 CAR)은 성숙 V_{α} 도메인, 성숙 V_{β} 도메인, 또는 이 둘 모두를 포함한다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 결합 단백질(예를 들어, TCR, TCR의 항원-결합 단편 또는 CAR)은 성숙 TCR β -사슬, 성숙 TCR α -사슬 또는 이 둘 모두를 포함한다.

- [0331] 일부 구체예에서, 결합 단백질은 (a) TCR 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 세포외 성분; (b) 이펙터 도메인 또는 이의 기능적 부분을 포함하는 세포내 성분; 및 (c) 세포외 및 세포내 성분을 연결하는 막횡단 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 일부 구체예에서, 융합 단백질은 MHC 분자(예를 들어, MHC 클래스 I 분자)의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 (예를 들어, 특이적으로 및/또는 선택적으로) 결합할 수 있다. 일부 구체예에서, MHC 분자는 HLA 혈청형 HLA-A*02인 MHC 알파 사슬을 포함한다. 일부 구체예에서, HLA 대립유전자는 HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0205, HLA-A*0206 및 HLA-A*0207 대립유전자로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, HLA 대립유전자는 HLA-A*0201이다.
- [0332] 본원에서 사용되는 바와 같은 "이펙터 도메인" 또는 "면역 이펙터 도메인"은 적절한 신호를 수신할 때 세포에서 면역 반응을 직접 또는 간접적으로 촉진할 수 있는 융합 단백질 또는 수용체의 세포내 부분 또는 도메인이다. 일부 구체예에서, 면역 세포 단백질 또는 이의 일부 또는 면역 세포 단백질 복합체가 표적 분자에 직접적으로 결합하고 면역 세포에서 이펙터 도메인으로부터 신호 전달을 촉발하는 경우 또는 결합되는 경우(예를 들어, CD3 ζ) 이펙터 도메인은 신호를 수용하는 면역 세포 단백질 또는 이의 일부 또는 면역 세포 단백질 복합체로부터 유래된다.
- [0333] 이펙터 도메인은 공동자극 분자에서 발견되는 것과 같은 세포내 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)와 같은 하나 이상의 신호전달 도메인 또는 모티프를 함유할 때 세포 반응을 직접적으로 촉진할 수 있다. 이론으로 국한시키려는 것은 아니지만, ITAM은, T 세포 수용체에 의해 또는 T 세포 이펙터 도메인을 포함하는 융합 단백질에 의해 리간드 결합 후 T 세포 활성화에 유용한 것으로 여겨진다. 일부 구체예에서, 세포내 성분 또는 이의 기능적 부분은 ITAM을 포함한다. 예시적인 면역 이펙터 도메인은 CD3 ε, CD3 δ, CD3 ζ, CD25, CD79A, CD79B, CARD11, DAP10, FcR α, FcR β, FcR γ, Fyn, HVEM, ICOS, Lck, LAG3, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, Wnt, ROR2, Ryk, SLAMF1, SIp76, pT α, TCR α, TCR β, TRIM, Zap70, PTCH2 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 이펙터 도메인은 림프구 수용체 신호전달 도메인(예를 들어, CD3 ζ 또는 이의 기능적 부분 또는 변이체)을 포함한다.
- [0334] 추가 구체예에서, 융합 단백질의 세포내 성분은 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40(CD134), CD2, CD5, ICAM-1(CD54), LFA-1(CD11a/CD18), ICOS(CD278), GITR, CD30, CD40, BAFF-R, HVEM, LIGHT, MKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, CD83과 (예를 들어, 특이적으로 및/또는 선택적으로) 결합하는 리간드로부터 선택된 공동자극 도메인 또는 이의 기능적 부분, 또는 이의 기능적 변이체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구체예에서, 세포내 성분은 CD28 공동자극 도메인 또는 이의 기능적 부분 또는 변이체(이는 임의적으로 천연 CD28 단백질의 위치 186-187에서 LL-GG 돌연변이를 포함할 수 있음(예를 들어, Nguyen 등 (2003) *Blood* 702:4320), 4-1BB 공동자극 도메인 또는 이의 기능적 부분 또는 변이체, 또는 이 둘 둘 모두를 포함한다.
- [0335] 일부 구체예에서, 이펙터 도메인은 CD3 ε 엔도도메인 또는 이의 기능적(예를 들어, 신호전달) 부분, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 추가 구체예에서, 이펙터 도메인은 CD27 엔도도메인 또는 이의 기능적(예를 들어, 신호전달) 부분, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 추가 구체예에서, 이펙터 도메인은 CD28 엔도도메인 또는 이의 기능적(예를 들어, 신호전달) 부분, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 추가 구체예에서, 이펙터 도메인은 4-1BB 엔도도메인 또는 이의 기능적(예를 들어, 신호전달) 부분, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 추가 구체예에서, 이펙터 도메인은 OX40 엔도도메인 또는 이의 기능적(예를 들어, 신호전달) 부분, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 추가 구체예에서, 이펙터 도메인은 CD2 엔도도메인 또는 이의 기능적(예를 들어, 신호전달) 부분, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 추가 구체예에서, 이펙터 도메인은 CD5 엔도도메인 또는 이의 기능적(예를 들어, 신호전달) 부분, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 추가 구체예에서, 이펙터 도메인은 ICAM-1 엔도도메인 또는 이의 기능적(예를 들어, 신호전달) 부분, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 추가 구체예에서, 이펙터 도메인은 LFA-1 엔도도메인 또는 이의 기능적(예를 들어, 신호전달) 부분, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 추가 구체예에서, 이펙터 도메인은 ICOS 엔도도메인 또는 이의 기능적(예를 들어, 신호전달) 부분, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0336] 본 발명에 포함되는 세포외 성분 및 세포내 성분은 막횡단 도메인에 의해 연결된다. 본원에서 사용되는 "막횡단 도메인"은 세포막에 삽입되거나 세포막에 걸쳐 있을 수 있는 막횡단 단백질의 일부이다. 막횡단 도메인은 세포막에서 열역학적으로 안정하고 일반적으로 약 15개 아미노산 내지 약 30개 아미노산의 길이 범위의 3차원 구조를 갖는다. 막횡단 도메인의 구조는 알파 나선, 베타 배럴, 베타 시트, 베타 나선 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 막횡단 도메인은 공지된 막횡단 단백질(예를 들어, CD4 막횡단 도메인, CD8

막횡단 도메인, CD27 막횡단 도메인, CD28 막횡단 도메인, 또는 이들의 임의의 조합)을 포함하거나 이로부터 유래된다.

[0337] 일부 구체예에서, 융합 단백질의 세포의 성분은 결합 도메인과 막횡단 도메인 사이에 배치된 링커를 추가로 포함한다. 결합 및 막횡단 도메인을 연결하는 융합 단백질의 성분을 언급할 때 본원에서 사용되는 바와 같은 "링커"는 약 2개의 아미노산 내지 약 500개의 아미노산을 갖는 아미노산 서열일 수 있으며, 이는 링커에 의해 연결된 2개의 영역, 도메인, 모티프, 단편 또는 모듈 사이의 배좌 운동에 대한 유연성 및 공간을 제공할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 포함되는 링커는 숙주 세포와 표적 세포 사이의 적절한 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하기 위해 융합 단백질을 발현하는 숙주 세포의 표면으로부터 멀리 결합 도메인을 위치시킬 수 있다 (Patel 등 (1999) *Gene Therapy* 6:412-419). 링커 길이는 선택된 표적 분자, 선택된 결합 에피토프, 또는 항원 결합 도메인 크기 및 친화성에 기반하여 항원 인식을 최대화하기 위해 다양할 수 있다(예를 들어, 문헌[Guest 등 (2005) *Immunother.* 28:203-11] 및 PCT 공개 번호 WO 2014/031687 참조). 예시적인 링커는 Gly_xSer_y의 1 내지 약 10개의 반복부를 갖는 글리신-세린 아미노산 사슬을 갖는 것들을 포함하며, 여기서 x 및 y는 각각 독립적으로 0 내지 10의 정수이며, 단, x 및 y는 둘 모두 0이 아니다(예를 들어, (Gly₄Ser)₂, (Gly₃Ser)₂, Gly₂Ser 또는 이들의 조합, 예컨대, ((Gly₃Ser)₂Gly₂Ser)).

[0338] 본 발명에 의해 포함되는 결합 단백질은, 일부 구체예에서, 모이어티에 공유적으로 연결될 수 있다. 일부 구체예에서, 공유적으로 연결된 모이어티는 친화성 태그 또는 표지를 포함한다. 친화성 태그는 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST), 칼모듈린 결합 단백질(CBP), 단백질 C 태그, Myc 태그, HaloTag, HA 태그, Flag 태그, His 태그, 비오틴 태그 및 V5 태그로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 표지는 형광 단백질일 수 있다. 일부 구체예에서, 공유적으로 연결된 모이어티는 염증제, 항염증제, 사이토카인, 독소, 세포독성 분자, 방사성 동위원소 또는 항체, 예컨대, 단일-사슬 Fv로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0339] 결합 단백질은 영상화, 연구, 치료제, 치료요법, 약제, 화학요법, 킬레이트화 요법, 표적화된 약물 전달 및 방사선요법에 사용되는 제제에 컨쥬게이션될 수 있다. 일부 구체예에서, 결합 단백질은 검출 가능한 제제, 예컨대 형광단, 근적외선 염료, 조영제, 나노입자, 금속-함유 나노입자, 금속 킬레이트, X-선 조영제, PET 제제, 금속, 방사성동위원소, 염료, 방사성핵종 킬레이터 또는 영상화에 사용될 수 있는 다른 적합한 물질에 컨쥬게이션되거나 융합될 수 있다. 일부 구체예에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 검출 가능한 모이어티가 결합 단백질에 연결될 수 있다. 방사성동위원소의 비제한적인 예는 알파 방출체, 베타 방출체, 양전자 방출체 및 감마 방출체를 포함한다. 일부 구체예에서, 금속 또는 방사성 동위원소는 악티늄, 아메리슘, 비스무트, 카드뮴, 세슘, 코발트, 윌로프, 가돌리늄, 이리듐, 납, 루테튬, 망간, 팔라듐, 폴로늄, 라듐, 루테튬, 사마륨, 스트론튬, 테크네튬, 탈륨 및 이트륨으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 금속은 악티늄, 비스무트, 납, 라듐, 스트론튬, 사마륨 또는 이트륨이다. 일부 구체예에서, 방사성동위원소는 악티늄-225 또는 납-212이다. 일부 구체예에서, 근적외선 염료는 생물학적 조직 및 유체에 의해 쉽게 켜지지 않는다. 일부 구체예에서, 형광단은 650 nm 내지 4000 nm의 파장에서 전자기 방사선을 방출하는 형광제이고, 이러한 방출은 이러한 제제를 검출하는데 사용된다. 컨쥬게이팅 분자로서 사용될 수 있는 형광 염료의 비제한적인 예는 DyLight-680, DyLight-750, VivoTag-750, DyLight-800, IRDye-800, VivoTag-680, Cy5.5, ZQ800, 또는 인도시아닌 그린(ICG)을 포함한다. 일부 구체예에서, 근적외선 염료는 종종 시아닌 염료(예를 들어, Cy7, Cy5.5 및 Cy5)를 포함한다. 본 발명에 따른 컨쥬게이팅 분자로서 사용하기 위한 형광 염료의 추가의 비제한적인 예는 아크라딘 오렌지 또는 옐로우, Alexa Fluors®(예를 들어, Alexa Fluor® 790, 750, 700, 680, 660, 및 647) 및 임의의 이의 유도체, 7-악티노마이신 D, 8-아닐리노나프탈렌-1-설폰산, ATTO® 염료 및 이의 임의의 유도체, 아우라민-로다민 스테인 및 이의 임의의 유도체, 벤산트론, 비만, 9-10-비스(페닐에티닐)안트라센, 5,12-비스(페닐에티닐)나트라센, 비스벤즈이미드, 브레인보우, 칼세인, 카르바디플루오레세인 및 이들의 임의의 유도체, 1-클로로-9,10-비스(페닐에티닐)안트라센 및 이들의 임의의 유도체, DAPI, DiOC6, DyLight® Fluors® 및 이들의 임의의 유도체, 에피록코론, 에티움 브로마이드, FIAsh-EDT2®, Fluo 염료 및 이들의 임의의 유도체, FluoProbe® 및 이들의 임의의 유도체, 플루오레세인 및 이들의 임의의 유도체, Fura® 및 이들의 임의의 유도체, GelGreen® 및 이들의 임의의 유도체, GelRed® 및 이들의 임의의 유도체, 형광 단백질 및 임의의 이의 유도체, m 이소폼 단백질 및 이의 임의의 유도체, 예를 들어, mCherry, 헤타메틴 염료 및 이의 임의의 유도체, 호에슈트(hoeschst) 스테인, 이미노쿠마린, 인디언 옐로우, 인도(indo)-1 및 이의 임의의 유도체, 라우르단, 루시퍼 옐로우 및 이들의 임의의 유도체, 루시페린 및 이의 임의의 유도체, 루시페라제 및 이의 임의의 유도체, 메르코시아닌 및 이의 임의의 유도체, 나일 염료 및 이의 임의의 유도체, 페릴렌, 플록신, 피코 염료 및 이들의 임의의 유도체, 프로피움 아이오다이드, 피라닌, 로다민 및 이의 임의의 유도체, 리보그린, RoGFP, 루브렌, 스틸벤 및 이의 임의의 유도체,

설포로다민 및 이의 임의의 유도체, SYBR 및 이의 임의의 유도체, 시냅토-pHluorin, 테트라페닐 부타디엔, 테트라소듐 트리스, 텍사스 레드, 타이탄 옐로우, TSQ, 움벨리페론, 비올란트론, 황색 형광 단백질 및 YOYO-1을 포함한다. 다른 적합한 형광 염료는 플루오레세인 및 플루오레세인 염료(예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아닌 또는 FITC, 나프토플루오레세인, 4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레세인, 6-카르복시플루오레세인 또는 FAM 등), 카르보시아닌, 메로시아닌, 스티릴 염료, 옥소놀 염료, 피코에리트린, 에리트로신, 에오신, 로다민 염료(예를 들어, 카르복시테트라메틸-로다민 또는 TAMRA, 카르복시로다민 6G, 카르복시-X-로다민(ROX), 리사민 로다민 B, 로다민 6G, 로다민 그린, 로다민 레드, 테트라메틸로다민(TMR) 등), 쿠마린 및 쿠마린 염료(예를 들어, 메톡시쿠마린, 디알킬아미노쿠마린, 하이드록시쿠마린, 아미노메틸쿠마린(AMCA) 등), Oregon Green™ 염료(예를 들어, Oregon Green™ 488, 500, 514 등), Texas Red®, Texas Red®-X, SPECTRUM RED®, SPECTRUM GREEN®, 시아닌 염료(예를 들어, CY-3, Cy-5, CY-3.5, CY-5.5 등), Alexa Fluor® 염료(예를 들어, Alexa Fluor® 350, 488, 532, 546, 568, 594, 633, 660, 680 등), BODIPY® 염료(예를 들어, BODIPY® FL, R6G, TMR, TR, 530/550, 558/568, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650, 650/665 등), IRD 염료(예를 들어, IRD40™, IRD700™, IRD800™ 등) 등을 포함한다. 추가의 적합한 검출 가능한 제제는 당 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, PCT 공개 번호 PCT/US14/56177). 방사성동위원소의 비제한적인 예는 알파 방출체, 베타 방출체, 양전자 방출체 및 감마 방출체를 포함한다. 일부 구체예에서, 금속 또는 방사성 동위원소는 악티늄, 아메리슘, 비스무트, 카드뮴, 세슘, 코발트, यू로푼, 가돌리늄, 이리듐, 납, 루테튬, 망간, 팔라듐, 폴로늄, 라듐, 루테튬, 사마륨, 스트론튬, 테크네튬, 탈륨 및 이트륨으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 금속은 악티늄, 비스무트, 납, 라듐, 스트론튬, 사마륨 또는 이트륨이다. 일부 구체예에서, 방사성동위원소는 악티늄-225 또는 납-212이다.

[0340] 결합 단백질은 방사선감작제 또는 감광제에 컨쥬게이션될 수 있다. 방사선감작제의 예는 비제한적으로, ABT-263, ABT-199, WEHI-539, 파클리탁셀, 카르보플라틴, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 켐시타빈, 에타나다졸, 미소니다졸, 티라파자민, 및 핵산 염기 유도체(예를 들어, 할로젠화 퓨린 또는 피리미딘, 예를 들어, 5-플루오로데옥시우리딘)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 감광제의 예는 비제한적으로 조명될 때 열을 발생시키는 형광 분자 또는 비드, 나노입자, 포르피린 및 포르피린 유도체(예를 들어, 클로린, 박테리오클로린, 이소박테리오클로린, 프탈로시아닌 및 나프탈로시아닌), 메탈로포르피린, 메탈로프탈로시아닌, 안젤리신, 칼로코게나피릴륨 염료, 클로로필, 쿠마린, 플라빈 및 관련 화합물, 예를 들어, 알록사진 및 리보플라빈, 플러렌, 페오포바이드, 피로페오포바이드, 시아닌(예를 들어, 메로시아닌 540), 페오피틴, 사피린, 텍사피린, 푸르푸린, 포르피센, 페노티아지늄, 메틸렌 블루 유도체, 나프탈리미드, 나일 블루 유도체, 퀴논, 퍼틸렌퀴논(예를 들어, 하이페리신, 하이포크렐린 및 세르코스포린), 소랄렌, 퀴논, 레티노이드, 로다민, 티오펜, 베르딘, 크산텐 염료(예를 들어, 에오신, 에리트로신, 로즈 벵갈), 포르피린의 이량체 및 올리고머 형태, 및 프로드러그 예컨대, 5-아미노레볼린산을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 유리하게는, 이러한 접근법은 치료제(예를 들어, 약물) 및 전자기 에너지(예를 들어, 방사선 또는 광) 둘 모두를 동시에 사용하여 관심 세포(예를 들어, 면역 세포)의 고도로 특이적 표적화를 가능하게 한다. 일부 구체예에서, 결합 단백질은, 예를 들어, 직접적으로 또는 링커를 통해 제제와 융합되거나, 이에 공유 또는 비공유적으로 연결된다.

[0341] 일부 구체예에서, 결합 단백질은 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 결합 단백질은 펩티드 특성, 예컨대 검출성, 안정성, 생체분포, 약동학, 반감기, 표면 전하, 소수성, 컨쥬게이션 부위, pH, 기능 등을 변형시키기 위해 돌연변이될 수 있다. N-메틸화는 본 발명에 포함되는 결합 단백질에서 발생할 수 있는 메틸화의 한 예이다. 일부 구체예에서, 결합 단백질은 포르말דה이드 및 소듐 시아노보로하이드라이드에 의한 환원성 메틸화와 같이 유리 아민 상의 메틸화에 의해 변형될 수 있다.

[0342] 화학적 변형은 폴리머, 폴리에테르, 폴리에틸렌 글리콜, 바이오폴리머, 쯔비터이온성 폴리머, 폴리아미노산, 지방산, 덴드리머, Fc 영역, 단순 포화 탄소 사슬, 예컨대, 팔미테이트 또는 미리스톨레이트, 또는 알부민을 포함할 수 있다. Fc 영역으로의 결합 단백질의 화학적 변형은 융합 Fc-단백질일 수 있다. 폴리아미노산은, 예를 들어, 반복된 단일 아미노산을 갖는 폴리 아미노산 서열(예를 들어, 폴리 글리신), 및 패턴을 따르거나 따르지 않을 수 있는 혼합된 폴리 아미노산 서열을 갖는 폴리 아미노산 서열, 또는 상기의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0343] 일부 구체예에서, 본 발명에 포함되는 결합 단백질은 변형될 수 있다. 일부 구체예에서, 모 결합 단백질의 하나 이상의 생물물리학적 및/또는 생물학적 활성을 유지하는(예를 들어, pMHC 결합 특이성을 유지하는) 기능적 변이체를 생성하기 위해 모 결합 단백질에 대해 실질적으로 또는 유의한 서열 동일성을 갖는 변형. 일부 구체예에서, 돌연변이는 보존적 아미노산 치환이다.

- [0344] 일부 구체예에서, 본 발명에 포함되는 결합 단백질은 하나 이상의 자연 발생 아미노산 대신에 합성 아미노산을 포함할 수 있다. 이러한 합성 아미노산은 당 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 아미노사이클로헥산 카르복실산, 노르류신, α-아미노 n-데칸산, 호모세린, S-아세틸아미노메틸-시스테인, 트랜스-3- 및 트랜스-4-하이드록시프롤린, 4-아미노페닐알라닌, 4-니트로페닐알라닌, 4-클로로페닐알라닌, 4-카르복시페닐알라닌, β-페닐세린 β-하이드록시페닐알라닌, 페닐글리신, α-나프틸알라닌, 사이클로헥실알라닌, 사이클로헥실글리신, 인돌린-2-카르복실산, 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카르복실산, 아미노말론산, 아미노말론산 모노아미드, N'-벤질-N'-메틸-리신, N',N'-디벤질-리신, 6-하이드록시리신, 오르니틴, α-아미노사이클로헥탄 카르복실산, oc-아미노사이클로헥산 카르복실산, α-아미노사이클로헥탄 카르복실산, α-(2-아미노-2-노르보르난)-카르복실산, α, γ-디아미노부티르산, β-디아미노프로피온산, 호모페닐알라닌 및 oc-tert-부틸글리신을 포함한다.
- [0345] 본 발명에 포함되는 결합 단백질은 글리코실화, 아미드화, 카르복실화, 인산화, 에스테르화, N-아실화, 고리화 (예를 들어, 디설파이드 브릿지를 통해)되거나, 산 부가 염으로 전환되고/거나 임의적으로 이량체화 또는 중합되거나, 컨주게이션될 수 있다.
- [0346] 일부 구체예에서, N-말단, C-말단 또는 내부 아미노산과 같은 소수성 모이어티의 부착은 본 발명에 포함되는 펩티드의 반감기를 연장시키기 위해 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 결합 단백질은, 예를 들어, 혈청 반감기에 영향을 미칠 수 있는 번역-후 변형(예를 들어, 메틸화 및/또는 아미드화)을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, (예를 들어, 미리스토일화 및/또는 팔미틸화에 의해) 단순 탄소 사슬은 결합 단백질에 컨주게이션될 수 있다. 일부 구체예에서, 단순 탄소 사슬은 결합 단백질을 컨주게이션되지 않은 물질로부터 용이하게 분리 가능하게 할 수 있다. 예를 들어, 비컨주게이션된 물질로부터 결합 단백질을 분리하기 위해 사용될 수 있는 방법은 용매 추출 및 역상 크로마토그래피를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 친지성 모이어티는 혈청 알부민에 대한 가역적 결합을 통해 반감기를 연장할 수 있다. 컨주게이션된 모이어티는 혈청 알부민에 대한 가역적 결합을 통해 펩티드의 반감기를 연장하는 친지성 모이어티일 수 있다. 일부 구체예에서, 친지성 모이어티는 콜레스테롤 또는 콜레스테린, 콜레스탄, 콜레스타디엔 및 옥시스테롤을 포함하는 콜레스테롤 유도체일 수 있다. 일부 구체예에서, 결합 단백질은 미리스탄(테트라데칸산) 또는 이의 유도체에 컨주게이션될 수 있다. 다른 구체예에서, 결합 단백질은 반감기 변형체에 커플링(예를 들어, 컨주게이션)될 수 있다. 반감기 개질제의 예는 중합체, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 하이드록시에틸 전분, 폴리비닐 알콜, 수용성 중합체, 썬비터이온성 수용성 중합체, 수용성 폴리(아미노산), 프롤린, 알라닌 및 세린의 수용성 중합체, 글리신, 글루탐산 및 세린을 함유하는 수용성 중합체, Fc 영역, 지방산, 팔미트산, 또는 알부민에 결합하는 분자를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 스페이서 또는 링커는 또 다른 분자에 대한 컨주게이션 또는 융합을 촉진하기 위해 뿐만 아니라 이러한 컨주게이션되거나 융합된 분자로부터의 펩티드의 절단을 용이하게 하기 위해 스페이서 또는 링커로서 작용하는 1,2,3,4 또는 그 초과 아미노산 잔기와 같은 결합 단백질에 커플링될 수 있다. 일부 구체예에서, 결합 단백질은, 예를 들어, 결합 단백질의 특성을 변형시키거나 변화를 일으킬 수 있는 다른 모이어티에 컨주게이션될 수 있다.
- [0347] 결합 단백질은 재조합적으로 또는 합성적으로, 예컨대, 고체-상 펩티드 합성 또는 용액-상 펩티드 합성에 의해 생산될 수 있다. 폴리펩티드 합성은 플루오레닐메틸옥시카르보닐(Fmoc) 화학 또는 부틸옥시카르보닐(Boc) 화학을 사용하는 것과 같은 공지된 합성 방법에 의해 수행될 수 있다. 폴리펩티드 단편은 효소적으로 또는 합성으로 함께 연결될 수 있다.
- [0348] 본 발명에 의해 포함된 양태에서, 본원에 기재된 결합 단백질을 생산하는 방법으로서, (i) 상기 결합 단백질의 발현을 허용하기에 적합한 조건 하에 본원에 기재된 결합 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하는 핵산에 의해 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 발현된 결합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 방법이 본원에 제공된다.
- [0349] 예를 들어, 재조합적으로 생산된 결합 단백질을 분리하고 정제하는데 유용한 방법은 결합 단백질을 배양 배지로 분리하는 적합한 숙주 세포/백터 시스템으로부터 상청액을 수득한 후, 상업적으로 이용 가능한 필터를 사용하여 배지를 농축시키는 것을 포함할 수 있다. 농축 후, 농축물은 단일의 적합한 정제 매트릭스 또는 일련의 적합한 매트릭스, 예컨대, 친화성 매트릭스 또는 이온 교환 수지에 적용될 수 있다. 하나 이상의 역상 HPLC 단계를 이용하여 재조합 폴리펩티드를 추가로 정제할 수 있다. 이러한 정제 방법은 또한 면역원을 이의 자연 환경으로부터 분리할 때 사용될 수 있다. 본원에 기재된 하나 이상의 결합 단백질의 대규모 생산을 위한 방법은 회분식 세포 배양을 포함하며, 이는 적절한 배양 조건을 유지하기 위해 모니터링되고 제어된다. 결합 단백질의 정제는 본원에 기술되고 당 분야에 공지된 방법에 따라 수행될 수 있다.
- [0350] 본원에 개시된 임의의 구체예에서, 인코딩된 결합 단백질은 MHC 분자(예를 들어, MHC 클래스 I 분자)의 맥락에

서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체에 결합할 수 있다. 일부 구체예에서, MHC 분자는 HLA 혈청형 HLA-A*02인 MHC 알파 사슬을 포함한다. 일부 구체예에서, HLA 대립유전자는 HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0205, HLA-A*0206 및 HLA-A*0207 대립유전자로 구성된 군으로부터 선택된다.

- [0351] 결합 친화성을 평가하고/하거나 결합 분자가 특정 리간드(예를 들어, 펩티드 항원-MHC 복합체)에 (예를 들어, 특이적으로 및/또는 선택적으로) 결합하는지 여부를 결정하기 위한 다양한 검정이 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 당해분야에 잘 알려진 다수의 결합 검정 중 임의의 것을 사용하여 표적 폴리펩티드의 T 세포 펩티드 에피토프와 같은 표적에 대한 결합 단백질의 결합 친화성을 결정하는 것은 당업자의 수준 내에 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, Biacore™ 기계는 2개의 단백질 사이의 복합체의 결합 상수를 결정하는데 사용될 수 있다. 복합체에 대한 해리 상수(K_D)는 완충제가 칩 위로 통과함에 따라 시간에 대한 굴절률의 변화를 모니터링함으로써 결정될 수 있다. 한 단백질의 또 다른 단백질에 대한 결합을 측정하기 위한 다른 적합한 검정은, 예를 들어, 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA) 및 방사성면역법(RIA)과 같은 면역검정, 또는 형광, UV 흡수, 원형 이색성, 또는 핵자기 공명(NMR)을 통해 단백질의 분광 또는 광학 특성의 변화를 모니터링함에 의한 결합의 결정을 포함한다. 다른 예시적인 검정은 웨스턴 블롯, ELISA, 분석용 초원심분리, 분광법 및 표면 플라즈몬 공명(Biacore™) 분석(예를 들어, 문헌[Scatchard 등 (1949) *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660, Wilson (2002) *Science* 295:2103, Wolff 등 (1993) *Cancer Res.* 53:2560] 참조 및 미국 특허 번호 5,283,173 및 5,468,614), 유세포 분석, 시퀀싱 및 발현된 핵산의 검출을 위한 다른 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 한 예에서, 표적에 대한 겔보기 친화성은 다양한 농도의 테트라머에 대한 결합을, 예를 들어, 표지된 다량체, 예컨대, MHC-항원 테트라머를 사용하는 유동 세포 분석에 의해 평가함으로써 측정된다. 하나의 대표적인 예에서, 결합 단백질의 겔보기 K_D 는 다양한 농도에서 표지된 테트라머의 2-배 희석액을 사용하여 측정한 후, 비선형 회귀에 의해 결합 곡선을 결정하고, 겔보기 K_D 는 반-최대 결합을 산출하는 리간드의 농도로서 결정된다.

[0352] III. 핵산 및 벡터

- [0353] 본 발명에 포함되는 양태에서, 본원에 기재된 결합 단백질(예를 들어, TCR, TCR의 항원-결합 단편, CAR 등), 펩티드 및 이의 단편을 인코딩하는 핵산 분자가 본원에 제공된다.
- [0354] 일부 구체예에서, 핵산 분자는 엄격한 조건 하에 표 1에 열거된 폴리펩티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산에 대해 예컨대, 전장에 걸쳐 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 서열의 상보체와 혼성화된다.
- [0355] 일부 구체예에서, 핵산 분자는 엄격한 조건 하에 표 1에 열거된 폴리펩티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 상보체와 혼성화된다.
- [0356] 일부 구체예에서, 핵산 분자는 표 1에 열거된 폴리펩티드 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다(예를 들어, 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성된다).
- [0357] 일부 구체예에서, 핵산은 표 1에 제시된 바와 같은 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 또는 3개)의 TCR α -사슬 CDR을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다(예를 들어, 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성된다). 일부 구체예에서, 핵산은 표 1에 제시된 TCR V_α 도메인 서열에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과와 동일성인 아미노산 서열을 갖는 TCR V_α 도메인을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다(예를 들어, 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성된다). 일부 구체예에서, 핵산은 표 1에 제시된 TCR α -사슬 서열에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과와 동일성인 아미노산 서열을 갖는 TCR α -사슬을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다(예를 들어, 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성된다).
- [0358] 일부 구체예에서, 핵산은 표 1에 제시된 바와 같은 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 또는 3개)의 TCR β -사슬 CDR을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다(예를 들어, 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성된다). 일부 구체예에서, 핵산은 표 1에 제시된 TCR V_β 도메인 서열에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과와 동일성인 아미노산 서열을 갖는 TCR V_β 도메인을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다(예를 들어, 포함하거나, 필수적

요소로 하여 구성되거나, 구성된다). 일부 구체예에서, 핵산은 표 1에 제시된 TCR β -사슬 서열에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과와 동일성인 아미노산 서열을 갖는 TCR β -사슬을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다(예를 들어, 포함하거나, 필수적 요소로 하여 구성되거나, 구성된다).

[0359] 용어 "핵산"은 "폴리뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드" 및 "핵산 분자"를 포함하고, 일반적으로 DNA 또는 RNA의 중합체를 의미하며, 이는 단일-가닥 또는 이중-가닥의 합성되거나 자연원으로부터 수득(예를 들어, 분리 및/또는 정제)될 수 있으며, 이는 천연, 비-천연 또는 변경된 뉴클레오티드를 함유할 수 있으며, 천연, 비-천연 또는 변경된 뉴클레오티드간 연결, 예컨대, 비변경된 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 간에 발견된 포스포디에스테르 대신에 포스포로아미데이트 연결 또는 포스포로티오에이트 연결을 함유할 수 있다. 구체예에서, 핵산은 상보적 DNA(cDNA)를 포함한다.

[0360] 일부 구체예에서, 본 발명에 포함되는 핵산은 재조합체이다. 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "재조합"은 (i) 천연 또는 합성 핵산 세그먼트를 생 세포에서 복제될 수 있는 핵산 분자에 연결함으로써 생 세포 외부에서 작제된 분자, 또는 (ii) 상기 (i)에 기재된 것들의 복제로부터 발생한 분자를 지칭한다. 본원의 목적을 위해, 복제는 시험관내/생체의 복제 또는 생체내 복제일 수 있다.

[0361] 핵산은 당 분야에 공지된 절차를 사용하여 화학적 합성 및/또는 효소적 리게이션 반응에 기반하여 작제될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Green and Sambrook 등 상기]을 참조한다. 예를 들어, 핵산은 자연 발생 뉴클레오티드 또는 분자의 생물학적 안정성을 증가시키거나 혼성화시 형성된 듀플렉스의 물리적 안정성을 증가시키도록 설계된 다양하게 변형된 뉴클레오티드(예를 들어, 포스포로티오에이트 유도체 및 아크리딘 치환된 뉴클레오티드)를 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 핵산을 생성하기 위해 사용될 수 있는 변형된 뉴클레오티드의 예는 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-아이오도우라실, 하이포크산틴, 크산틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시하이드록시메틸)우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디하이드로우라실, 베타-D-갈락토실케오신, 이노신, N⁶-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N⁶-치환된 아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우리딘, 베타-D-만노실케오신, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N⁶-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산(v), 와이부톡소신, 슈도우라실, 퀘오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우리딘, 2-티오우리딘, 4-티오우리딘, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로필)우라실, 및 2,6-디아미노푸린을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 대안적으로, 본 발명에 포함되는 하나 이상의 핵산은 Integrated DNA Technologies(Coralville, IA)와 같은 회사로부터 구입할 수 있다.

[0362] 일 구체예에서, 핵산은 코돈-최적화된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 이론 또는 메커니즘에 구속됨이 없이, 뉴클레오티드 서열의 코돈 최적화는 mRNA 전사체의 번역 효율을 증가시키는 것으로 여겨진다. 뉴클레오티드 서열의 코돈 최적화는 동일한 아미노산을 인코딩하지만 세포 내에서 보다 용이하게 이용 가능한 tRNA에 의해 번역될 수 있는 천연 코돈을 또 다른 코돈으로 치환하여 번역 효율을 증가시키는 것을 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 서열의 최적화는 또한 번역을 방해하는 이차 mRNA 구조를 감소시켜 번역 효율을 증가시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 뉴클레오티드 서열은 숙주 세포(예를 들어, T 세포와 같은 면역 세포)에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다.

[0363] 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 핵산의 뉴클레오티드 서열 또는 엄격한 조건 하에 본원에 기재된 임의의 핵산의 뉴클레오티드 서열에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다.

[0364] 엄격한 조건하에서 혼성화하는 뉴클레오티드 서열은 높은 엄격성 조건하에서 혼성화될 수 있다. "높은 엄격성 조건"은 뉴클레오티드 서열이 비특이적 혼성화보다 검출 가능하게 더 강한 양으로 표적 서열(본원에 기재된 임의의 핵산의 뉴클레오티드 서열)에 특이적으로 혼성화되는 것을 의미한다. 높은 엄격성 조건은 정확한 상보적 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 구별하거나, 뉴클레오티드 서열과 일치하는 소수의 작은 영역(예를 들어, 3-10 개 염기)을 갖는 무작위 서열로부터 단지 소수의 산재된 미스매치를 함유하는 조건을 포함한다. 이러한 작은 상보성 영역은 14-17개 이상의 염기의 전장 상보체보다 더 쉽게 용융되며, 높은 엄격성 혼성화로 인해 이들을 쉽게 구별할 수 있다. 비교적 높은 엄격성 조건은, 예를 들어, 약 50-70°C의 온도에서 약 0.02-0.1 M NaCl 또는 등가물에 의해 제공되는 것과 같은 저염 및/또는 고온 조건을 포함할 것이다. 이러한 높은 엄격성 조건은 뉴클

레오티드 서열과 주형 또는 표적 가닥 사이의 미스매치가 존재한다면, 거의 허용되지 않으며, 본 발명의 임의의 TCR의 발현을 검출하는데 특히 적합하다. 조건은 증가하는 양의 포름아미드의 첨가에 의해 더욱 엄격해질 수 있는 것으로 일반적으로 이해된다.

- [0365] 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 핵산에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다.
- [0366] 전형적으로, 상기 핵산은 플라스미드, 코스미드, 에피솜, 인공 염색체, 파지 또는 바이러스 벡터와 같은 적합한 벡터에 포함될 수 있는 DNA 또는 RNA 분자이다.
- [0367] 용어 "벡터", "클로닝 벡터" 및 "발현 벡터"는 DNA 또는 RNA 서열(예를 들어, 외래 유전자)이 숙주 세포 내로 도입되어 숙주를 형질전환시키고 도입된 서열의 발현(예를 들어, 전사 및 번역)을 촉진시킬 수 있는 비히클을 의미한다. 따라서, 본 발명에 의해 포함되는 추가의 목적은 본 발명에 의해 포함되는 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0368] 이러한 벡터는 대상체에 투여시 상기 폴리펩티드의 발현을 유발하거나 지시하기 위해 프로모터, 인핸서, 종결인자 등과 같은 조절 요소를 포함할 수 있다. 동물 세포용 발현 벡터에 사용되는 프로모터 및 인핸서의 예는 SV40의 초기 프로모터 및 인핸서(Mizukami T. 등 1987), 몰로니(Moloney) 마우스 백혈병 바이러스의 LTR 프로모터 및 인핸서(Kuwana Y 등 1987), 면역글로불린 H 사슬의 프로모터(Mason J O 등 1985) 및 인핸서(Gillies S D 등 1983) 등을 포함한다.
- [0369] 동물 세포에 대한 임의의 발현 벡터가 사용될 수 있다. 적합한 벡터의 예는 pAGE107(Miyaji H 등 1990), pAGE103(Mizukami T 등 1987), pHSG274(Brady G 등 1984), pKCR(O'Hare K 등 1981), pSG1 베타 d2-4-(Miyaji H 등 1990) 등을 포함한다. 플라스미드의 다른 대표적인 예는 복제 기점을 포함하는 복제 플라스미드, 또는 통합 플라스미드, 예를 들어, pUC, pcDNA, pBR 등을 포함한다. 바이러스 벡터의 대표적인 예는 아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 바이러스 및 AAV 벡터를 포함한다. 이러한 재조합 바이러스는 당업계에 공지된 기술에 의해, 예컨대 패키징 세포를 형질감염시키거나 헬퍼 플라스미드 또는 바이러스로의 일시적인 형질감염에 의해 생산될 수 있다. 바이러스 패키징 세포의 전형적인 예는 PA317 세포, PsiCRIP 세포, GPenv-양성 세포, 293 세포 등을 포함한다. 이러한 복제-결합 재조합 바이러스를 생산하기 위한 상세한 프로토콜은 당 분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, PCT 공개 WO 95/14785, PCT 공개 WO 96/22378, 미국 특허 번호 5,882,877, 미국 특허 번호 6,013,516, 미국 특허 번호 4,861,719, 미국 특허 번호 5,278,056 및 PCT 공개 WO 94/19478에서 찾을 수 있다.
- [0370] 일부 구체예에서, 발현 벡터는 나노플라스미드이다. 본원에 사용된 용어 "나노플라스미드"는 원하는 카고 삽입물을 갖는 더 작은 플라스미드를 제공하는 감소된 박테리아 서열을 갖는 원형 DNA 서열을 지칭한다. 벡터의 크기 감소는 형질감염 시 제한된 DNA-유발 독성과 잠재적으로 세포 내 지속 시간 연장, 잠재적으로 세포 내 지속 시간 연장, 잠재적으로 형질감염 후 생존가능성 향상, 및 잠재적으로 더 높은 전위 효율과 연관되어 있다. 일부 구체예에서, 나노플라스미드는 항생제 내성 마커-유리 나노플라스미드이다. 일부 구체예에서, 나노플라스미드는 선택 마커 및/또는 넌센스 억제자 마커를 포함한다. 백본 크기가 작기 때문에, 예를 들어 <500 bp 백본이므로 이러한 나노플라스미드는 원하는 카고 삽입물의 크기를 최대화한다. 원하는 카고 삽입물(예를 들어, 진핵생물 이식유전자)은 표적 세포 안으로 전달될 수 있는 임의의 크기, 예를 들어 최대 50kb, 45kb, 40kb, 35kb, 30kb, 25kb, 20kb, 18kb, 15kb, 12kb, 10kb, 5.0kb, 4.5kb, 4.0kb, 3.5kb, 3.0kb, 2.8kb, 2.5kb, 2.2kb, 2kb, 1.8kb, 1.5kb, 1.2kb, 1kb 또는 8-12kb와 같은 것을 포함하여 그 사이의 임의의 범위일 수 있다. 이는 또한 조작된 세포의 계통에서 카고의 무작위 통합과 연관된 카고의 조정가능한 통합 효율로 높은 이식유전자 발현을 제공하고 이식유전자 침묵을 감소시킨다.
- [0371] 일부 구체예에서, 나노플라스미드는 표 3에 제공된 벡터에 표시된 요소(예를 들어, R6K 및 RNA-OUT)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 나노플라스미드는 최소화된 박테리아 ColE1 또는 R6K 복제 원점(이러한 나노플라스미드가 박테리아 숙주 균주에서 복제가가능하도록 제공), 선택 마커(예를 들어, 박테리아 RNA-선택가능 마커), 및 진핵생물의 유전자 영역을 포함한다. RNA 선택가능 마커는 벡터를 선택할 수 있도록 염색체에서 발현된 표적 유전자를 조절하는 벡터-태생 발현된 비-번역된 RNA이다. 이는 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 6,977,174에 기술된 바와 같이 넌센스 억제가능 선택가능한 염색체 표적을 조절하는 플라스미드 태생 넌센스 억제 tRNA일 수 있다. 이는 또한 플라스미드-태생 안티센스 억제자 RNA, RNA-IN 조절 표적을 억제하는 RNA-OUT 유전자, RNAII 조절 표적을 억제하는 pMB1 플라스미드 기원 인코딩된 RNAI, RNA II 조절 표적을 억제하는 IncB 플

라스미드 pMU720 기원 인코딩된 RNAI, Hok 조절 표적을 억제하는 플라스미드 RI의 ParB 유전자와 Sok, flmA 조절 표적을 억제하는 F 플라스미드의 Flm 유전자와 FlmB, 예를 들어 문헌 [Wagner 등 (2002) *Adv. Genet.* 46:361 및 Franch and Gerdes (2000) *Current Opin. Microbiol.* 3:159]에 기술된 것과 같은 천연 안티센스 억제인자 RNA, 또는 문헌 [Park 등 (2013) *Nature Biotechnology* 31:170-174]에 기술된 것과 같은 SgrS, MicC 또는 MicF 스캐폴드 같은 작은 합성 소형 RNA와 같은 조작된 억제자 RNA일 수 있다.

[0372] 항생제 유리 RNA-OUT 선택 시스템에 의해 생성된 예시적인 나노플라스미드 및 이러한 나노플라스미드를 제조하는 방법은 예를 들어 PCT 공개 번호 WO 2008153733, 미국 특허 번호 9,737,620, 미국 특허 공개 번호 2010/0303859, 및 미국 특허 번호 9,109,012에 기술되어 있으며, 이는 본원에 그 전체 내용이 참조로 포함된다. 추가의 예시적인 나노플라스미드는 예를 들어 PCT 출원 번호 PCT/US2013/000259, PCT/US2013/00067 및 PCT/US2013/00068 및 미국 특허 공개 번호 2015/0275221에 기술되어 있으며, 이는 본원에 그 전체 내용이 참조로 포함된다.

[0373] 나노플라스미드는 상업적으로 이용가능하다. 예를 들어 Aldevron의 자회사인 Nature Technology Corporation은 RNA 선택가능 마커를 R6K, ColE2 또는 ColE2-관련 복제 기점과 조합한 나노플라스미드 벡터를 제공한다. 이들 나노플라스미드 벡터는 예를 들어 NTC9385C, NTC9685C, NTC9385R, NTC9685R 벡터뿐만 아니라 PCT 출원 번호 PCT/US 13/00068에 기술된 것과 같은 이의 변형; NTC9385R-BE, NTC9385Ra-01 및 NTC9385Ra-02 벡터, 예컨대 미국 특허 번호 10,144,935에 기술된 것; 및 NTC9385C2, NTC9385C2a, NTC9385R2, NTC9385R2a, NTC9385R2b, NTC9385Ra, NTC9385RaF 및 NTC9385RbF 복제성 미니서클 벡터 예컨대 미국 특허 번호 2021/0189407에 기술된 것을 포함하며, 이들 각각은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0374] 일부 구체예에서, 조성물은 본원에 기재된 결합 단백질 또는 폴리펩티드 또는 이의 단편을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임에 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 일부 구체예에서, 핵산은 오픈 리딩 프레임의 발현에 필요한 조절 요소를 포함한다. 이러한 요소는, 예를 들어, 프로모터, 개시 코돈, 정지 코돈 및 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 또한, 인헨서가 포함될 수 있다. 이러한 요소는 결합 단백질, 폴리펩티드 또는 이의 단편을 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0375] 일부 구체예에서, 벡터는 CD8 α , CD8 β , 우성 음성 TGF β 수용체(예를 들어, DN-TGF β RII), 선택가능 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하며, 임의적으로 선택가능 단백질 마커는 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR)이다. 특정 구체예에서, CD8 α , CD8 β , DN-TGF β R 및/또는 선택성 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열은 태그(예를 들어, CD34 농축 태그)를 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된다. 특정 구체예에서, TCR α , TCR β , CD8 α , CD8 β , DN-TGF β R 및/또는 선택가능 단백질 마커를 인코딩하는 핵산 서열과 같은 본원에 기술된 핵산 서열은 내부 리보솜 진입 부위 또는 P2A, E2A, F2A 또는 T2A 등과 같은 자가-절단 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열과 상호연결된다.

[0376] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 발현 벡터는 서열번호 27에 제시된 임의의 핵산에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과와 동일성인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0377] 프로모터의 예는 Simian 바이러스 40(SV40), 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 예를 들어, HIV 장말단 반복(LTR) 프로모터, 모로니 바이러스, 사이토메갈로바이러스(CMV), 예를 들어, CMV 즉시 초기 프로모터, 엡스타인 바르 바이러스(Epstein Barr Virus: EBV), 라우스 육종 바이러스(Rous Sarcoma Virus: RSV) 뿐만 아니라 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴, 및 인간 메탈로티오네인과 같은 인간 유전자로부터의 프로모터를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 폴리아데닐화 신호의 예는 SV40 폴리아데닐화 신호 및 LTR 폴리아데닐화 신호를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0378] 발현에 필요한 조절 요소 이외에, 다른 요소가 또한 핵산 분자에 포함될 수 있다. 이러한 추가 요소는 인헨서를 포함한다. 인헨서는 본원에 기재된 프로모터를 포함한다. 일부 구체예에서, 인헨서/프로모터는, 예를 들어, 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 및 CMV, RSV 및 EBV로부터의 것들과 같은 바이러스 인헨서를 포함한다.

[0379] 일부 구체예에서, 핵산은 하기에 추가로 기재된 바와 같이 담체 또는 전달 벡터에 작동가능하게 혼입될 수 있다. 유용한 전달 벡터는 생분해성 마이크로캡슐, 면역-자극 복합체(ISCOM) 또는 리포솜, 및 바이러스 또는 박테리아와 같은 유전자 조작된 약독화된 생 담체를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0380] 일부 구체예에서, 벡터는 바이러스 벡터, 예컨대, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스, 아데노바

이러스, 아데노-관련 바이러스, 백시니아 바이러스, 마클로바이러스, 계두, AV-폭스, 변형된 백시니아 양카라 (MVA) 및 다른 재조합 바이러스이다. 예를 들어, 렌티바이러스 벡터는 T 세포를 감염시키기 위해 사용될 수 있다.

[0381] 일부 구체예에서, 재조합 발현 벡터는 폴리뉴클레오티드를 적절한 숙주 세포, 예를 들어, T 세포 또는 항원-제시 세포, 즉, 이의 세포 표면에 펩티드/MHC 복합체를 표시하며, CD8이 결합되어 있는 세포(예를 들어, 수지상 세포)에 전달할 수 있다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 면역 세포 예컨대 인간 면역계 세포이다. 예를 들어, 면역계 세포는 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, $CD4/CD8$ 이중 음성 T 세포, gd T 세포, 자연 살해 세포, 수지상 세포 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. T 세포가 숙주인 일부 구체예에서, T 세포는 나이브, 중심 기억 T 세포, 이펙터 기억 T 세포 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 따라서, 재조합 발현 벡터는 또한, 예를 들어, B 림프구, T 림프구 또는 수지상 세포 특이적 TRE와 같은 림프 조직-특이적 전사 조절 요소(TRE)를 포함할 수 있다. 림프 조직 특이적 TRE는 당 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Thompson 등 (1992) *Mol. Cell. Biol.* 72:1043, Todd 등 (1993) *J. Exp. Med.* 777:1663, and Penix. 등 (1993) *J. Exp. Med.* 775:1483] 참조).

[0382] 일부 구체예에서, 재조합 발현 벡터는 TCR α 사슬, TCR β 사슬 및/또는 링커 펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 재조합 발현 벡터는 이들 사이에 위치한 링커를 갖는 결합 단백질의 전장 TCR 알파 및 TCR 베타 사슬을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 여기서 베타 사슬을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 알파 사슬을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 5'에 위치한다. 일부 구체예에서, 뉴클레오티드 서열은 사이에 위치한 링커와 함께 전장 TCR 알파 및 TCR 베타 사슬을 인코딩하고, 여기서 TCR 베타 사슬을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 TCR 알파 사슬을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 3'에 위치한다. 일부 구체예에서, 전장 TCR 알파 및/또는 TCR 베타 사슬은 이의 단편으로 대체된다.

[0383] 하기에 추가로 기재된 바와 같이, 본 발명에 포함되는 또 다른 양태는 본 발명에 따른 핵산 및/또는 벡터에 의해 형질감염, 감염 또는 형질전환된 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 벡터 또는 핵산 및/또는 단백질의 혼입 뿐만 아니라 임의의 자손 세포를 수용할 수 있는 임의의 개별 세포 또는 세포 배양물을 포함할 수 있다. 상기 용어는 또한 유전적으로 또는 표현형적으로 동일하거나 상이한 숙주 세포의 자손을 포함한다. 적합한 숙주 세포는 벡터에 의존적일 수 있고, 포유동물 세포, 동물 세포, 인간 세포, 원숭이 세포, 곤충 세포, 효모 세포 및 박테리아 세포를 포함할 수 있다. 이러한 세포는 바이러스 벡터, 갈습 포스페이트 침전을 통한 형질전환, DEAE-덱스트란, 전기천공, 미세주입 또는 다른 방법의 사용에 의해 벡터 또는 다른 물질을 혼입시키도록 유도될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Sambrook 등 (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2d ed.*(Cold Spring Harbor Laboratory)] 참조). 용어 "형질전환"은 숙주 세포에 "이중"(즉, 외부 또는 세포외) 유전자, DNA 또는 RNA 서열을 도입하여, 숙주 세포가 도입된 유전자 또는 서열을 발현시켜, 요망되는 물질 전형적으로, 도입된 유전자 또는 서열에 의해 코딩되는 단백질을 생성할 것임을 의미한다. 도입된 DNA 또는 RNA를 수용하고 발현하는 숙주 세포는 "형질전환"되었다.

[0384] 예를 들어, 일부 구체예에서, 조작된 면역 세포(예를 들어, T 세포)는 트랜스포존/트랜스포사제-매개 유전자 전달에 의해 조작되어 특정 MHC(예를 들어, 클래스 I HLA)에 제시된 주어진 표적 항원에 특이적인 재조합 T 세포 수용체(TCR)의 알파 및 베타 사슬과 같은 요소에 대한 유전적 카고 코딩을 발현하도록 조작된 범 T 세포($CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 둘 모두)를 포함할 수 있다. 추가 요소는 a) $CD4^+$ T 세포의 제함을 가능하게 하는 $CD8\alpha$ 및 $CD8\beta$ 공동-수용체; b) 시험관내 및 생체내에서 조작된 세포의 추적 가능하게 하기 위해 $CD8\alpha$ 의 아미노-말단에 융합된 CD34-유래 QBEND/10 에피토프 태그; c) 종양-매개 면역 억제를 극복하기 위한 우성-음성 유원 II TGF β 수용체(DN-TGF β RII); 및 d) 제조 공정 동안 조작된 세포의 농축을 촉진하기 위한 돌연변이 형태의 디하이드로 폴레이트 환원효소(DHFRdm)와 같은 선택 마커로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 요소와 같은 벡터로 발현될 수 있다. 외인성 TCR의 α 및 β 사슬과 $CD8$ 의 α 및 β 사슬은 뮤어라인 줄기 세포 바이러스(MSCV) 프로모터와 같은 단일 프로모터의 제어 하에 단일 mRNA 분자에 의해 인코딩될 수 있다. P2A 부위와 같은 자가-절단 펩티드 요소에서의 번역-후 처리는 벡터의 각 요소에 상응하는 개별적인 4개의 폴리펩티드를 생성하는 것과 같은 독립적인 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 유사하게, DN-TGF β RII 및 DHFRdm은 인간 신장 인자 1 α (EF1 α) 프로모터와 같은 단일 프로모터에 의해 구동되는 단일 mRNA 분자에 의해 인코딩될 수 있다. P2A 부위와 같은 자가-절단 펩티드 요소에서의 번역-후 처리로 인해 벡터의 각 개별 요소에 상응하는 독립적인 폴리펩티드가 생성될 수 있다.

[0385] 본 발명에 포함되는 핵산은 적합한 발현 시스템에서 본 발명에 포함되는 재조합 폴리펩티드를 생산하는데 사용될 수 있다. 용어 "발현 시스템"은, 예를 들어, 벡터에 의해 운반되고 숙주 세포에 도입된 외래 DNA에 의해 코

딩된 단백질의 발현을 위한 적합한 조건하의 숙주 세포 및 양립가능한 벡터를 의미한다.

[0386] 일반적인 발현 시스템은 E. 콜라이 숙주 세포 및 플라스미드 벡터, 곤충 숙주 세포 및 바콜로바이러스 벡터, 및 포유동물 숙주 세포 및 벡터를 포함한다. 숙주 세포의 다른 예는 비제한적으로 원핵 세포(예를 들어, 박테리아) 및 진핵 세포(예를 들어, 효모 세포, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포 등)를 포함한다. 특정 예는 E. 콜라이, 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 또는 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 효모, 포유동물 세포주(예를 들어, Vero 세포, CHO 세포, 3T3 세포, COS 세포 등) 뿐만 아니라 일차 또는 확립된 포유동물 세포 배양물(예를 들어, 림프모세포, 섬유모세포, 배아 세포, 상피 세포, 신경계 세포, 지방세포 등으로부터 생산됨)을 포함한다. 예는 또한 마우스 SP2/0-Ag14 세포(ATCC CRL1581), 마우스 P3X63-Ag8.653 세포(ATCC CRL1580), 디하이드로폴레이트 리덕타제 유전자(이하 "DHFR 유전자"로 지칭됨)에 결합이 있는 CHO 세포(Urlaub G 등 (1980), 래트 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 세포(ATCC CRL 1662, 이하 "YB2/0 세포"로 지칭됨) 등을 포함한다. 일부 구체예에서, YB2/0 세포는 키메라 또는 인간화 결합 단백질의 ADCC 활성이 이 세포에서 발현될 때 향상되기 때문에 사용된다.

[0387] 본 발명은 또한 본 발명에 포함되는 결합 단백질, 펩티드 및 이의 단편을 발현하는 재조합 숙주 세포를 생산하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 (i) 상기 기술된 바와 같은 재조합 핵산 또는 벡터를 시험관내 또는 생체외에서 적격 숙주 세포에 도입하는 단계, (ii) 수득된 재조합 숙주 세포를 시험관내 또는 생체외에서 배양하는 단계, (iii) 임의적으로, 상기 결합 단백질, 펩티드 및 이의 단편을 발현하는 세포를 선택하는 단계로 구성된 단계들을 포함한다. 이러한 재조합 숙주 세포는 본 발명에 포함되는 진단, 예후, 및/또는 치료 방법에 사용될 수 있다.

[0388] 또 다른 양태에서, 본 발명은 선택적 혼성화 조건 하에 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 분리된 핵산을 제공한다. 따라서, 이러한 구체예의 폴리뉴클레오티드는 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산을 분리, 검출 및/또는 정량하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 포함되는 폴리뉴클레오티드는 기탁된 라이브러리에서 부분 또는 전장 클론을 확인, 분리 또는 증폭하는데 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 인간 또는 포유동물 핵산 라이브러리로부터 분리된 게놈 또는 cDNA이거나 달리 상보적인 게놈 또는 cDNA 서열이다. 일부 구체예에서, cDNA 라이브러리는 적어도 약 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예컨대 적어도 약 80%-100% 전장 서열을 포함한다. cDNA 라이브러리는 희귀 서열의 표현을 증가시키기 위해 표준화될 수 있다. 낮거나 중간 정도의 엄격성 혼성화 조건은 전형적으로 상보적인 서열에 비해 감소된 서열 동일성을 갖는 서열과 함께, 그러나 배타적이지 않게 사용된다. 중간 및 높은 엄격성 조건은 임의적으로 더 큰 동일성의 서열에 사용될 수 있다. 낮은 엄격성 조건은 약 70%의 서열 동일성을 갖는 서열의 선택적 혼성화를 가능하게 하고, 이중상동성 또는 유사상동 서열을 확인하는데 사용될 수 있다. 임의적으로, 본 발명에 포함되는 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩되는 결합 단백질의 적어도 일부를 인코딩할 것이다. 본 발명에 포함되는 폴리뉴클레오티드는 본 발명에 포함되는 결합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 대한 선택적 혼성화에 사용될 수 있는 핵산 서열을 포함한다(예를 들어, 상기 Ausubel 및 상기 Colligan 참조).

[0389] IV. 숙주 세포

[0390] 본 발명에 포함되는 양태에서, 본원에 기재된 결합 단백질(예를 들어, TCR, TCR의 항원-결합 단편, CAR, 또는 TCR 및 이펙터 도메인을 포함하는 융합 단백질)을 발현하는 숙주 세포가 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 본원에 기재된 핵산 또는 벡터를 포함한다.

[0391] 일부 구체예에서, 결합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 입양 전이 요법에 사용하기 위해 숙주 세포(예를 들어, T 세포)를 형질전환, 형질감염 또는 형질도입하는데 사용된다. 핵산 시퀀싱 및 특정 TCR 시퀀싱의 발전이 기술되었으며(예를 들어, Robins 등 (2009) *Blood* 114:4099; Robins 등 (2010) *Sci. Translat. Med.* 2:47ra64, Robins 등 (2011) *J. Imm. Meth.*, and Warren 등 (2011) *Genome Res.* 21:790)에 기재되어 있으며, 본 발명에 포함되는 구체예를 실시하는 과정에서 사용될 수 있다. 유사하게, 요망되는 핵산으로 T 세포를 형질감염시키거나 형질도입시키는 방법은 요망되는 항원-특이성의 T 세포를 사용하여 입양 전달 절차를 갖는 것으로 당 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, US 특허 공개 번호 US 2004/0087025호) (예를 들어, Schmitt 등 (2009) *Hum. Gen.* 20:1240, Dossett 등 (2009) *Mol. Ther.* 77:742, Till 등 (2008) *Blood* 772:2261, Wang 등 (2007) *Hum. Gene Ther.* 18:112, Kuball 등 (2007) *Blood* 709:2331, 미국 특허 공개 2011/0243972, 미국 특허 공개 2011/0189141, 및 Leen 등, (2007) *Ann. Rev. Immunol.* 25:243).

- [0392] 임의의 적합한 면역 세포는, 예를 들어, T 세포, NK 세포 또는 NK-T 세포를 포함하는 본 발명에 포함되는 이중성 폴리뉴클레오티드를 포함하도록 변형될 수 있다. 일부 구체예에서, 세포는 일차 세포 또는 세포주의 세포일 수 있다. 일부 구체예에서, 변형된 면역 세포는 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, 또는 둘 모두를 포함한다. 본원의 목적을 위해, T 세포는 임의의 T 세포, 예를 들어, 배양된 T 세포, 예를 들어, 일차 T 세포, 또는 배양된 T 세포주, 예를 들어, Jurkat, SupT1 등으로부터의 T 세포, 또는 포유동물로부터 수득된 T 세포일 수 있다. 포유동물로부터 수득되는 경우, T 세포는 혈액, 골수, 림프절, 흉선 또는 다른 조직 또는 유체를 포함하나 이에 제한되지 않는 수많은 공급원으로부터 수득될 수 있다. T 세포는 또한 농축되거나 정제될 수 있다. 일부 구체예에서, T 세포는 인간 T 세포이다. 일부 구체예에서, T 세포는 인간으로부터 분리된 T 세포이다. T 세포는 임의의 유형의 T 세포일 수 있고, 세포독성 림프구, 세포독성 림프구 전구체 세포, 세포독성 림프구 간세포, 세포독성 림프구 줄기 세포, $CD4^+/CD8^+$ 이중 양성 T 세포, $CD4^+$ 헬퍼 T 세포, 예를 들어, Th1 및 Th2 세포, $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포(예를 들어, 세포독성 T 세포), 종양 침윤 림프구(TIL), 기억 T 세포(예를 들어, 중심 기억 T 세포 및 이펙터 기억 T 세포), 나이브 T 세포 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 개발 단계일 수 있다.
- [0393] 임의의 적절한 방법을 사용하여 세포, 예를 들어, T 세포를 형질감염 또는 형질도입하거나, 본원에 기재된 방법에 포함되는 뉴클레오티드 서열 또는 조성물을 투여하는데 사용할 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 전달하기 위한 방법은, 예를 들어, 양이온성 중합체, 지질-유사 분자, 및 예를 들어, 생체내-jetPEI®와 같은 특정 상업적 제품의 사용을 포함한다. 다른 방법은 생체의 형질도입, 주사, 전기천공, DEAE-텍스트란, 초음파처리 로딩, 리포좀-매개 형질감염, 수용체-매개된 형질도입, 미세발사체 충격, 트랜스포존-매개 전이 등을 포함한다. 숙주 세포를 형질감염 또는 형질도입하는 추가의 방법은 본원에 추가로 상세히 기재된 벡터를 사용한다.
- [0394] 본원에 기재된 바와 같은 변형된 면역 세포는 T 세포 결합, 활성화 또는 유도의 결정을 포함하며, 또한 항원-특이적인 T 세포 반응의 결정을 포함하는 T 세포 활성을 검정하기 위한 방법론을 사용하여 기능적으로 특성규명될 수 있다. 예는 T 세포 증식, T 세포 사이토카인 방출, 항원-특이적 T 세포 자극, MHC 제한된 T 세포 자극, CTL 활성화(예를 들어, 미리-로딩된 표적 세포로부터 ^{51}Cr 방출을 검출함으로써), T 세포 표현형 마커 발현의 변화 및 T-세포 기능의 다른 측정의 결정을 포함한다.
- [0395] 이들 및 유사한 검정을 수행하기 위한 절차는, 예를 들어, 문헌[Lefkovits (Immunology Methods Manual: Hie Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998)] 뿐만 아니라 [Current Protocols in Immunology, Weir, (1986) Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific, Boston, MA; Mishell and Shigii (eds.) (1979) Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman Publishing, San Francisco, CA; Green and Reed (1998) *Science* 281:1309] 및 그 안에 인용된 참고문헌에서 찾아볼 수 있다.
- [0396] 일부 구체예에서, TCR 또는 이의 항원-결합 부분과 같은 결합 단백질에 대한 겔보기 친화성은 다양한 농도의 MHC 펩티드에 대한 결합을 평가함으로써 측정될 수 있다. "MHC-펩티드 멀티머 염색"은 항원-특이적 T 세포를 검출하는데 사용되는 검정을 지칭하며, 이는 일부 구체예에서, MHC 분자의 테트라머를 특징으로 하며, 각각은 동족 (예를 들어, 동일하거나 관련된)인 적어도 하나의 항원(예를 들어, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드)인 아미노산 서열을 갖는 동일한 펩티드를 포함하며, 여기서 복합체는 동족 항원을 인식하는 결합 단백질, 예컨대, TCR 또는 이의 항원-결합 부분에 결합할 수 있다. 각각의 MHC 분자는 비오티ن 분자로 태깅될 수 있다. 비오티닐화된 MHC/펩티드는 형광 표지될 수 있는 스트렙타비딘의 첨가에 의해 멀티머화(예를 들어, 테트라머화)될 수 있다.
- [0397] 멀티머는 형광 표지를 통한 유세포 분석에 의해 검출될 수 있다. 일부 구체예에서, pMHC 멀티머 검정은 본 발명에 포함되는 TCR 또는 이의 항원-결합 부분과 같은 향상된 친화성 결합 단백질을 검출하거나 선택하는데 사용된다. 일부 예에서, 결합 단백질, 예컨대 TCR 또는 이의 항원-결합 부분의 겔보기 K_D 는 다양한 농도에서 표지된 멀티머의 2-배 희석액을 사용하여 측정된 후, 비선형 회귀에 의해 결합 곡선을 결정되고, 겔보기 K_D 는 반-최대 결합을 산출하는 리간드의 농도로서 결정된다.
- [0398] 사이토카인의 수준은 본원에 기재된 방법, 예를 들어, ELISA, ELISPOT, 세포내 사이토카인 염색, 및 유세포 분석 및 이들의 조합(예를 들어, 세포내 사이토카인 염색 및 유세포 분석)을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0399] 면역 반응의 항원-특이적 유도 또는 자극으로 인한 면역 세포 증식 및 클론 확장은 림프구, 예컨대 말초 혈액 세포의 샘플에서 순환 림프구 또는 림프절로부터의 세포를 분리하고, 항원으로 세포를 자극하고, 예를 들어, 삼중수소화 티미딘 또는 비-방사성 검정, 예를 들어, MTT 검정 등의 혼입에 의한 사이토카인 생산, 세포 증식 및/또는 세포 생존을 측정함으로써 결정될 수 있다. Th1 면역 반응과 Th2 면역 반응 사이의 균형에 대한 본원에 기

재된 면역원의 효과는, 예를 들어, Th1 사이토카인, 예컨대, IFN- γ , IL-12, IL-2 및 TNF- β , 및 유형 2 사이토카인, 예컨대 IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 및 IL-13의 수준을 결정함으로써 조사될 수 있다.

[0400] 본 발명에 의해 포함되는 숙주 세포는 본원에 기재된 바와 같은 결합 단백질을 인코딩하는 단일 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있거나, 결합 단백질은 하나 초과 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩될 수 있다. 다시 말해서, 결합 단백질의 성분 또는 부분은 2개 이상의 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩될 수 있고, 이는 단일 핵산 분자에 함유될 수 있거나 2개 이상의 핵산 분자에 함유될 수 있다.

[0401] 더욱이, 하기 및 작업 실시예에서 추가로 기술되는 바와 같이, 본 발명에 포함되는 숙주 세포는 결합 단백질 또는 이의 성분으로서 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 다른 폴리뉴클레오티드 상에서 본원에 기술된 결합 단백질 외에 유용한 보조 단백질을 인코딩 및/또는 발현할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포는 CD8 α , CD8 β , DN-TGF β R (예를 들어, DN-TGF β RII) 및/또는 선택가능 단백질 마커를 인코딩 및/또는 발현할 수 있으며, 임의적으로 선택가능 단백질 마커는 DHFR이다.

[0402] 일부 구체예에서, 본 발명에 포함되는 결합 단백질의 2개 이상의 성분 또는 부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 단일 오픈 리딩 프레임에서 작동적으로 회합된 2개 이상의 코딩 서열을 포함한다. 이러한 배열은 유리하게는, 예를 들어, TCR의 알파- 및 베타-사슬의 동시 발현과 같은 요망되는 유전자 생성물의 조정된 발현을 허용하여, 이들이 약 1:1 비율로 생산되도록 할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명에 포함되는 결합 단백질, 예를 들어, TCR(예를 들어, 알파- 및 베타-사슬) 또는 CAR의 2개 이상의 치환기 유전자 생성물은 별도의 분자로서 발현되고 번역 후 회합된다. 추가 구체예에서, 본 발명에 포함되는 결합 단백질의 2개 이상의 치환기 유전자 생성물은 절단 가능한 또는 제거 가능한 세그먼트에 의해 분리된 부분을 갖는 단일 펩티드로서 발현된다. 예를 들어, 단일 폴리뉴클레오티드 또는 벡터에 의해 인코딩된 분리 가능한 폴리펩티드의 발현에 유용한 자가-절단 펩티드는 당 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 돼지 테스코바이러스-1 2 A(P2A) 펩티드, 토세아시그나 바이러스 2A(T2A) 펩티드, 말 비염 A 바이러스(ERAV) 2A(E2A) 펩티드, 및 구제역 vims 2A(F2A) 펩티드를 포함한다.

[0403] 일부 구체예에서, 본 발명에 포함되는 결합 단백질은 하나 이상의 접합 아미노산을 포함한다. "접합 아미노산" 또는 "접합 아미노산 잔기"는 폴리펩티드의 2개의 인접한 모티프, 영역 또는 도메인 사이, 예를 들어, 결합 도메인과 인접한 불변 도메인 사이 또는 TCR 사슬과 인접한 자가-절단 펩티드 사이의 하나 이상(예를 들어, 2 내지 약 10개)의 아미노산 잔기를 지칭한다. 접합 아미노산은 융합 단백질을 인코딩하는 작제물의 설계로부터(예를 들어, 융합 단백질을 인코딩하는 핵산 분자의 작제 동안 제한 효소 부위의 사용으로부터 생성된 아미노산 잔기), 또는 예를 들어, 본 발명에 의해 포함되는 인코딩된 결합 단백질의 하나 이상의 도메인에 인접한 자가-절단 펩티드의 절단으로부터(예를 들어, TCR α -사슬과 TCR β -사슬 사이에 배치된 P2A 펩티드, 이의 자가-절단은 α -사슬, TCR β -사슬, 또는 둘 모두에 하나 이상의 접합 아미노산을 남길 수 있음) 발생할 수 있다.

[0404] 본 발명에 포함되는 조작된 면역 세포는, 예를 들어, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애, 또는 과증식성 장애의 재발에 대한 요법으로서 투여될 수 있다. 일부 상황에서, 세포 면역요법과 관련된 활성을 감소 또는 중지시키는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 본 발명에 의해 포함되는 조작된 면역 세포는 결합 단백질 및 안전 스위치 단백질과 같은 부속 단백질을 인코딩하는 이중성 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 이는 동족 약물 또는 다른 화합물을 사용하여 표적화되어 바람직한 경우 이러한 세포의 활성을 선택적으로 조절(예를 들어, 감소 또는 제거)할 수 있다. 이와 관련하여 사용되는 안전성 스위치 단백질은 예를 들어, 세포의 N-말단 리간드 결합 도메인 및 세포내 수용체 티로신 키나제 활성이 없지만 천연 아미노산 서열, 타입 I 막횡단 세포 표면 국소화, 및 약학적 등급 항-EGFR 모노클로날 항체에 대한 형태적으로 손상되지 않은 결합 에피토프를 유지하는 절두된 EGF 수용체 폴리펩티드(huEGFRt), 세톡시맵 (Erbix) tEGF 수용체 (tEGFr; Wang 등 (2011) *Blood* 118:1255-1263), 카스파제 폴리펩티드(예를 들어, iCasp9; Straathof 등 (2005) *Blood* 105:4247-4254, Di Stasi 등 (2011) *N. Engl. J. Med.* 365:1673-1683, Zhou and Brenner (2016) *Hematol. pii:S0301-472X:30513-30516*), RQR8 (Philip 등 (2014) *Blood* 124:1277-1287), 및 인간 c-myc 단백질 태그 (Kieback 등 (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:623-628)를 포함한다.

[0405] 치료 세포에 유용한 다른 부속 성분은 세포가 확인, 분류, 분리, 농축 또는 추적될 수 있게 하는 태그 또는 선택 마커(예를 들어, CD34 농축 태그)를 포함한다. 예를 들어, 원하는 특징(예를 들어, 항원-특이적 TCR 및 안전성 스위치 단백질)을 갖는 표시된 면역 세포는 샘플에서 표지되지 않은 세포로부터 분류되고, 원하는 순도의 치료 제품에 포함시키기 위해 보다 효율적으로 활성화되고 확장될 수 있다.

[0406] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "선택 마커"는 선택 마커를 포함하는 폴리뉴클레오티드로 형질도입된 면역 세포의 검출 및 양성 선택을 허용하는 세포에 식별 가능한 변화를 부여하는 핵산 작제물을 포함한다. 예를

들어, RQR은 CD20의 주요 세포의 루프 및 2개의 최소 CD34 결합 부위를 포함하는 선택 마커이다. 일부 구체예에서, RQR-인코딩 폴리뉴클레오티드는 16개 아미노산 CD34 최소 에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본원의 예에서 제공된 특정 구체예와 같은 일부 구체예에서, CD34 최소 에피토프는 CD8 줄기 도메인(Q8)의 아미노 말단 위치에 혼입된다. 추가 구체예에서, CD34 최소 결합 부위 서열은 CD20에 대한 표적 에피토프와 조합되어 T 세포(RQR8)에 대한 콤팩트 마커/자살 유전자를 형성할 수 있다(Philip 등 2014). 이러한 작제물은 조작된 T 세포를 발현하는 전이유전자의 선택적 결실을 허용하는 임상적으로 허용되는 약학적 항체, 리트시막을 사용하며, 자성 비드(Miltenyi)에 결합된 예를 들어, CD34-특이적 항체와의 작제물을 발현하는 면역 세포의 선택을 허용한다(예를 들어, Philip 등 (2014) *Blood* 124:1277-1287, 미국 특허 공개 2015-0093401, 및 미국 특허 공개 2018-0051089).

[0407] 추가의 예시적인 선택 마커는 T 세포 상에서 정상적으로 발현되지 않는 여러 절두된 유형 I 막횡단 단백질을 포함한다: 절두된 저-친화성 신경 성장 인자, 절두된 CD19 및 절두된 CD34(예를 들어, Di Stasi 등 (2011) *N. Engl. J. Med.* 365:1673-1683, Mavilio 등 (1994) *Blood* 83:1988-1997, 및 Fehse 등 (2000) *Mol. Ther.* 7:448-456). CD19 및 CD34의 특허 매력적인 특징은 임상-등급 분류를 위해 이들 마커를 표적화할 수 있는 기성품 Miltenyi CliniMAC™ 선택 시스템의 이용가능성이다. 그러나, CD19 및 CD34는 벡터 패키징 능력 및 통합 벡터의 전사 효율에 부담을 줄 수 있는 비교적 큰 표면 단백질이다. 세포외, 비-신호전달 도메인 또는 다양한 단백질(예를 들어, CD19, CD34, LNGFR 등)을 함유하는 표면 마커가 또한 사용될 수 있다. 임의의 선택 마커가 사용될 수 있고 우수 제조 관행을 위해 허용되어야 한다. 일부 구체예에서, 선택 마커는 관심 유전자 생성물(예를 들어, 본 발명에 포함되는 결합 단백질, 예컨대, TCR 또는 CAR, 또는 이의 항원-결합 단편)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드로 발현된다. 선택 마커의 추가 예는, 예를 들어, 리포터, 예를 들어, GFP, EGFP, β -gal 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT)를 포함한다. 일부 구체예에서, 선택 마커, 예를 들어, CD34는 세포에 의해 발현되고, CD34는 본원에 기재된 방법에 사용하기 위해 형질도입된 관심 세포를 선택, 농축 또는 분리하는데(예를 들어, 면역자기 선택에 의해) 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은 CD34 마커는 항-CD34 항체, 또는, 예를 들어, scFv, TCR 또는 CD34에 결합하는 다른 항원 인식 모이어티와 구별된다.

[0408] 일부 구체예에서, 선택 마커는 RQR 폴리펩티드, 절두된 저-친화성 신경 성장 인자(tNGFR), 절두된 CD19(tCD19), 절두된 CD34(tCD34), 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0409] 배경으로, 면역요법 세포 생성물에 $CD4^+$ T 세포의 포함은 항원-유도된 IL-2 분비를 제공하고 전이된 세포독성 $CD8^+$ T 세포의 지속성 및 기능을 증가시킬 수 있다(예를 들어, Kennedy 등 (2008) *Immunol. Rev.* 222 :129 및 Nakanishi 등 *Nature* (2009) 52:510). 일부 구체예에서, $CD4^+$ T 세포에서 클래스 I-제한된 TCR은 클래스 I HLA 펩티드 복합체에 대한 TCR의 민감성을 향상시키기 위해 CD8 공동-수용체의 전달을 필요로 할 수 있다. CD4 공동-수용체는 CD8과 구조가 상이하며, CD8 공동-수용체를 효과적으로 대체할 수 없다(예를 들어, Stone & Kranz (2013) *Front. Immunol.* 4:244 and Cole 등 (2012) *Immunology* 737:139). 따라서, 본 발명에 포함되는 조성물 및 방법에 사용하기 위한 또 다른 부속 단백질은 CD8 공동-수용체 또는 이의 성분을 포함한다. 본 발명에 포함되는 결합 단백질을 인코딩하는 이중성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조작된 면역 세포는, 일부 구체예에서, CD8 공동-수용체 단백질, 또는 이의 베타-사슬 또는 알파-사슬 성분을 인코딩하는 이중성 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함할 수 있다.

[0410] 숙주 세포는 결합 단백질, 안전성 스위치 단백질, 선택 마커 및 CD8 공동-수용체 단백질을 인코딩하는 단일 폴리뉴클레오티드를 함유하도록 효율적으로 형질도입될 수 있고, 효율적으로 발현될 수 있다.

[0411] 일 구체예에서, 본 발명에 의해 포함되는 숙주 세포는 변형된 T 세포가 공동-자극 분자를 발현하도록 공동-자극 분자를 인코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 공동-자극 도메인은 CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BB, 4-1BBL, PD1 및 PD1L로부터 선택된다.

[0412] 임의의 전술한 구체예에서, 본원에 기재된 결합 단백질을 발현하는 숙주 세포는 보편적인 면역 세포일 수 있다. "보편적인 면역 세포"는 PD-1, LAG-3, CTLA4, TIM3, TIGIT, HLA 분자, TCR 분자, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 폴리펩티드 생성물을 인코딩하는 하나 이상의 내인성 유전자의 발현을 감소시키거나 제거하도록 변형된 면역 세포를 포함한다. 이론에 국한시키려는 것은 아니지만, 특정 내인적으로 발현된 면역 세포 단백질은 변형된 면역 세포(예를 들어, PD-1, LAG-3, CTLA4, TIGIT)의 면역 활성을 하향조절할 수 있거나, 본 발명에 포함된 이중성으로 발현된 결합 단백질(예를 들어, 비-HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원에 결합하며, MHC 분자의 맥락에서 아미노산 서열 YMLDLQPET를 포함하는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드와 같은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 표적 세포

에의 변형된 면역 세포 결합을 방해하는 내인성 TCR)의 결합 활성을 방해할 수 있다. 또한, 공여자 면역 세포에서 발현된 내인성 단백질(예를 들어, HLA 대립유전자와 같은 면역 세포 단백질)은 동종이계 숙주에 의해 외래인 것으로 인식될 수 있으며, 이는 동종이계 숙주에 의해 변형된 공여자 면역 세포의 제거 또는 억제를 초래할 수 있다.

[0413] 따라서, 이러한 내인성 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성을 감소시키거나 제거하는 것은 자가 또는 동종이계 숙주 환경에서 변형된 면역 세포의 활성, 내성 또는 지속성을 개선할 수 있고, (예를 들어, HLA 유형에 관계없이 모든 수신체에게) 세포의 보편적인 투여를 허용한다. 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 세포는 동계이며, 이는 이들이 이식을 가능하게 하도록 유전적으로 동일하거나 충분히 동일하고 면역학적으로 양립가능함을 의미한다. 일부 구체예에서, 보편적인 면역 세포는 공여자 세포(예를 들어, 동종이계) 또는 자가 세포이다. 일부 구체예에서, 본 발명에 의해 포함되는 변형된 면역 세포(예를 들어, 보편적인 면역 세포)는 PD-1, LAG-3, CTLA4, TIM3, TIGIT, HLA 성분(예를 들어, $\alpha 1$ 마크로글로불린, $\alpha 2$ 마크로글로불린, $\alpha 3$ 마크로글로불린, $\beta 1$ 마이크로글로불린, 또는 $\beta 2$ 마이크로글로불린)을 인코딩하는 유전자, 또는 TCR 성분을 인코딩하는 유전자(예를 들어, TCR 가변 영역 또는 TCR 불변 영역을 인코딩하는 유전자) 중 하나 이상의 염색체 유전자 녹아웃을 포함한다(예를 들어, 문헌[Torikai 등 (2016) *Nature Sci. Rep.* 6:21757; Torikai 등 (2012) *Blood* 179:5697; and Torikai 등 (2013) *Blood* 722 :1341] 참조, 또한 본 발명에 따라 유용한 대표적인 예시적인 유전자 편집 기술, 조성물 및 입양 세포 요법을 제공함).

[0414] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "염색체 유전자 녹아웃"은 숙주 세포에 의한 기능적으로 활성인 내인성 폴리펩티드 생성물의 생산을 방지(예를 들어, 감소, 지연, 억제 또는 폐지)하는 숙주 세포에서 유전자 변경 또는 도입된 억제제를 지칭한다. 염색체 유전자 녹아웃을 초래하는 변경은, 예를 들어, 도입된 넌센스 돌연변이(조기 정지 코돈의 형성 포함), 미스센스 돌연변이, 유전자 결실 및 가닥 파손 뿐만 아니라 숙주 세포에서 내인성 유전자 발현을 억제하는 억제 핵산 분자의 이중성 발현을 포함할 수 있다.

[0415] 일부 구체예에서, 염색체 유전자 녹아웃 또는 유전자 녹인은 숙주 세포의 염색체 편집에 의해 만들어질 수 있다. 염색체 편집은, 예를 들어, 엔도뉴클레아제를 사용하여 수행될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은 "엔도뉴클레아제"는 폴리뉴클레오티드 사슬 내의 포스포디에스테르 결합의 절단을 촉매할 수 있는 효소를 지칭한다. 일부 구체예에서, 엔도뉴클레아제는 표적화된 유전자를 절단함으로써 표적화된 유전자를 불활성화시키거나 "녹아웃"시킬 수 있다. 엔도뉴클레아제는 자연 발생, 재조합, 유전자 변형된 또는 융합 엔도뉴클레아제일 수 있다. 엔도뉴클레아제에 의해 야기된 핵산 가닥 파손은 통상적으로 상동 재조합 또는 비-상동 말단 연결(NHEJ)의 별개의 메커니즘을 통해 복구된다. 상동성 재조합 동안, 공여자 핵산 분자는 공여자 유전자 "녹-인", 표적 유전자 "녹-아웃", 및 임의적으로 공여자 유전자 녹인 또는 표적 유전자 녹아웃 이벤트를 통해 표적 유전자를 불활성화시키는데 사용될 수 있다. NHEJ는 종종 절단 부위에서 DNA 서열의 변화, 예를 들어, 적어도 하나의 뉴클레오티드의 치환, 결실 또는 첨가를 초래하는 오류-유발 복구 과정이다. NHEJ는 표적 유전자를 "녹-아웃"시키기 위해 사용될 수 있다. 엔도뉴클레아제의 예는 징크 핑거 뉴클레아제, TALE-뉴클레아제, CRISPR-Cas 뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 및 megaTAL을 포함한다.

[0416] 본원에서 사용되는 바와 같은 "아연 핑거 뉴클레아제"(ZFN)는 FokI 엔도뉴클레아제와 같은 비특이적 DNA 절단 도메인에 융합된 아연 핑거 DNA-결합 도메인을 포함하는 융합 단백질을 지칭한다. 약 30개 아미노산의 각각의 아연 핑거 모티프는 약 3개의 염기쌍의 DNA에 결합하고, 특정 잔기의 아미노산은 삼중항 서열 특이성을 변경하기 위해 변화될 수 있다(예를 들어, Desjarlais 등 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:2256-2260 및 Wolfe 등 (1999) *J. Mol. Biol.* 255:1917-1934). 다수의 아연 핑거 모티프는 약 9 내지 약 18개의 염기쌍 범위의 길이를 갖는 영역과 같은 요망되는 DNA 서열에 대한 결합 특이성을 생성하기 위해 나란히 연결될 수 있다. 배경으로, ZFN은 게놈에서 부위-특이적 DNA 이중 가닥 파손(DSB)의 형성을 촉매화함으로써 게놈 편집을 매개하고, DSB의 부위에서 게놈에 상동성인 측접 서열을 포함하는 전이유전자의 표적화된 통합은 상동성 지시 수복에 의해 촉진된다. 대안적으로, ZFN에 의해 생성된 DSB는 절단 부위에서 뉴클레오티드의 삽입 또는 결실을 초래하는 오류-유발 세포 수복 경로인 비-상동성 말단 연결(NHEJ)에 의한 수복을 통해 표적 유전자의 녹아웃을 초래할 수 있다. 일부 구체예에서, 유전자 녹아웃은 ZFN 분자를 사용하여 만들어진 삽입, 결실, 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0417] 본원에서 사용되는 바와 같은 "전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제"(TALEN)는 TALE DNA-결합 도메인 및 DNA 절단 도메인, 예를 들어, FokI 엔도뉴클레아제를 포함하는 융합 단백질을 지칭한다. "TALE DNA 결합 도메인" 또는 "TALE"는 하나 이상의 TALE 반복 도메인/단위로 구성되며, 각각은 일반적으로 분기되는 12번째 및 13번째 아미노산을 갖는 고도로 보존된 33-35개의 아미노산 서열을 갖는다. TALE 반복 도메인은 표적 DNA 서열에 대한 TALE

의 결합에 관여한다. 반복 가변 이관기(RVD)로 지칭되는 분기형 아미노산 잔기는 특정 뉴클레오티드 인식과 상관관계가 있다. 이러한 TALE의 DNA 인식을 위한 천연(표준) 코드는, TALE의 위치 12 및 13에서 HD(히스틴-아스파르트산) 서열이 시토신(C)에 대한 TALE 결합을 유도하고, NG(아스파라긴-글리신)은 T 뉴클레오티드에 결합하고, NI(아스파라긴-이소류신)은 A에 결합하고, NN(아스파라긴-아스파라긴)은 G 또는 A 뉴클레오티드에 결합하고, NG(아스파라긴-글리신)은 T 뉴클레오티드에 결합하도록 결정되었다. 비정형(비정형) RVD는 또한 당 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 비정형 RVD는 전문이 본원에 참조로서 포함되는 US 특허 공개 번호 2011/0301073). TALEN은 T 세포의 게놈에서 부위-특이적 이중-가닥 파손(DSB)을 지시하는데 사용될 수 있다. 비-상동성 말단 연결(NHEJ)은 어닐링을 위한 서열 중첩이 거의 또는 전혀 없는 이중-가닥 파손의 양쪽으로부터 DNA를 결합시켜, 유전자 발현을 녹아웃시키는 오류를 도입한다. 대안적으로, 상동성 지시 복구는 상동성 측접 서열이 전이유전자에 존재하는 경우 DSB의 부위에 전이유전자를 도입할 수 있다. 일부 구체예에서, 유전자 녹아웃은 TALEN 분자를 사용하여 만들어진 삽입, 결실, 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0418] 본원에서 사용되는 바와 같은 "클러스터링된 규칙적으로 이격된 짧은 회문 반복부/Cas"(CRISPR/Cas) 뉴클레아제 시스템은 염기쌍 상보성을 통해 게놈(프로토스페이서로 공지됨) 내의 표적 부위를 인식하고, 짧은 보존된 프로토스페이서 관련 모티프(PAM)가 상보적 표적 서열의 3' 바로 다음에 오는 경우 DNA를 절단하기 위해 CRISPR RNA(crRNA)-가이드된 Cas 뉴클레아제를 사용하는 시스템을 지칭한다. CRISPR/Cas 시스템은 Cas 뉴클레아제의 서열 및 구조에 기초하여 3개의 유형(즉, 유형 I, 유형 II, 및 유형 III)으로 분류된다. 유형 I 및 III의 crRNA-유도된 감시 복합체는 다수의 Cas 서브유닛을 필요로한다. 가장 많이 연구된 유형 II 시스템은 적어도 3개의 성분: RNA-가이드된 Cas9 뉴클레아제, crRNA, 및 트랜스-작용 crRNA(tracrRNA)를 포함한다. tracrRNA는 듀플렉스 형성 영역을 포함한다. crRNA 및 tracrRNA는 Cas9 뉴클레아제와 상호작용할 수 있고, PAM으로부터의 상류의 표적 DNA 상의 프로토스페이서 및 crRNA 상의 스페이서 사이의 Watson-Crick 염기-쌍형성을 통해 표적 DNA 상의 특이적 부위로 Cas9/crRNA:tracrRNA 복합체를 안내할 수 있는 듀플렉스를 형성한다. Cas9 뉴클레아제는 crRNA 스페이서에 의해 정의된 영역 내에서 이중-가닥 파손을 절단한다. NHEJ에 의한 수복은 표적화된 유전자좌의 발현을 방해하는 삽입 및/또는 결실을 초래한다. 대안적으로, 상동성 측접 서열을 갖는 전이유전자는 상동성 지시 수복을 통해 DSB의 부위에 도입될 수 있다. crRNA 및 tracrRNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA 또는 gRNA)로 조작될 수 있다(예를 들어, Jinek 등 (2012) *Science* 337:816-821). 또한, 표적 부위에 상보적인 가이드 RNA의 영역은 요망되는 서열을 표적화하기 위해 변경되고 프로그래밍될 수 있다(Xie 등 (2014) *PLOS One* 9:e100448, 미국 특허 공개 번호 US 2014/0068797, 미국 특허 공개 번호 US 2014/0186843, 미국 특허 번호 8,697,359, 및 PCT 공개 번호 WO 2015/071474). 일부 구체예에서, 유전자 녹아웃은 삽입, 결실, 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하며, CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템을 사용하여 이루어진다.

[0419] 면역 세포 단백질을 인코딩하는 내인성 유전자를 녹아웃하기 위한 예시적인 gRNA 서열 및 이를 사용한 방법은 문헌 [Ren 등 (2017) *Clin. Cancer Res.* 23:2255-2266]에 기재된 것들을 포함하며, 이는 대표적이고 예시적인 gRNA, CAS9 DNA, 벡터 및 유전자 녹아웃 기술을 제공한다.

[0420] 본원에 사용된 바와 같은 "호밍 엔도뉴클레아제"라고도 하는 "메가뉴클레아제"는 큰 인식 부위(약 12 내지 약 40개 염기쌍의 이중 가닥 DNA 서열)를 특징으로 하는 엔도데옥시리보뉴클레아제를 지칭한다. 메가뉴클레아제는 서열 및 구조 모티프에 따라 5가지 패밀리로 나눌 수 있다: LAGLIDADG, GIY-YIG, HNH, His-Cys box, 및 PD-(D/E)XK. 예시적인 메가뉴클레아제는 I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, RI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII 및 I-TevIII을 포함하며, 이들의 인식 서열은 잘 공지되어 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 5,420,032 및 6,833,252, Belfort 등 (1997) *Nucl. Acids Res.* 25:3379-3388, Dujon 등 (1989) *Gene* 52:115-118, Perler 등 (1994) *Nucl. Acids Res.* 22:1125-1127, Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228, Gimble 등 (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180, and Argast 등 (1998) *J. Mol. Biol.* 280: 345-353).

[0421] 일부 구체예에서, 자연 발생 메가뉴클레아제는 관심 표적, 예컨대 면역 체크포인트, HLA-인코딩 유전자 또는 TCR 요소-인코딩 유전자의 부위-특이적 게놈 변형을 촉진하는데 사용될 수 있다.

[0422] 다른 구체예에서, 표적 유전자에 대한 신규한 결합 특이성을 갖는 조작된 메가뉴클레아제는 부위-특이적 게놈 변형을 위해 사용된다(예를 들어, 문헌[Porteus 등 (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:967-73, Sussman 등 (2004) *J. Mol. Biol.* 342:31-41, Epinat 등 (2003) *Nucl. Acids Res.* 31:2952-2962, Chevalier 등 (2002) *Mol. Cell* 10:895-905, Ashworth 등 (2006) *Nature* 441:656-659, Paques 등 (2007) *Curr. Gene Ther.* 7:49-66] 및 US 특허 공개 번호 US 2007/0117128, US 2006/0206949, US 2006/0153826, US 2006/0078552, 및 US 2004/0002092 참조). 추가 구체예에서, 염색체 유전자 녹아웃은 megaTAL로서 공지된 융합 단백질을 제조하기 위해 TALEN의 모듈

식 DNA 결합 도메인으로 변형된 호밍 엔도뉴클레아제를 사용하여 생성된다. MegaTAL은 하나 이상의 표적 유전자를 녹아아웃시킬 뿐만 아니라 관심 폴리펩티드를 인코딩하는 외인성 공여자 주형과 조합하여 사용될 때 이중성 또는 외인성 폴리뉴클레오티드를 도입(녹인)시키기 위해 이용될 수 있다.

- [0423] 일부 구체예에서, 염색체 유전자 녹아아웃은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원에 (예를 들어, 특이적으로 및/또는 선택적으로) 결합하는 항원-특이적 수용체를 인코딩하는 이중성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포(예를 들어, 면역 세포)에 도입되는 억제 핵산 분자를 포함하며, 여기서 억제 핵산 분자는 표적-특이적 억제제를 인코딩하며, 인코딩된 표적-특이적 억제제는 숙주 면역 세포에서 (즉, 면역 키포인트, HLA 성분, 또는 TCR 성분, 또는 이의 임의의 조합의) 내인성 유전자 발현을 억제한다.
- [0424] 염색체 유전자 녹아아웃은 녹아아웃 절차 또는 제제의 사용 후 숙주 면역 세포의 DNA 시퀀싱에 의해 직접 확인될 수 있다.
- [0425] 염색체 유전자 녹아아웃은 또한 녹아아웃 후 유전자 발현의 부재(예를 들어, 유전자에 의해 인코딩되는 mRNA 또는 폴리펩티드 생성물의 부재)로부터 추론될 수 있다.
- [0426] 일부 구체예에서, 본 발명에 의해 포함되는 숙주 세포는 MHC 분자의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체를 포함하는 표적 세포 중 50% 이상을 특이적으로 및/또는 선택적으로 사멸할 수 있다.
- [0427] 일부 구체예에서, 변형된 면역 세포는 MHC 분자의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드를 포함하는 펩티드-MHC(pMHC) 복합체를 포함하는 표적 세포와 접촉될 경우 사이토카인을 생산할 수 있다.
- [0428] 일부 구체예에서, 사이토카인은 IFN- γ 또는 IL2를 포함한다. 일부 구체예에서, 사이토카인은 TNF- α 를 포함한다.
- [0429] 일부 구체예에서, 숙주 세포는 백만 전사체 당 약 1,000개 전사체(TPM) 이하, 950 TPM, 900 TPM, 850 TPM, 800 TPM, 750 TPM, 700 TPM, 650 TPM, 600 TPM, 550 TPM, 500 TPM, 450 TPM, 400 TPM, 350 TPM, 300 TPM, 250 TPM, 200 TPM, 150 TPM, 100 TPM, 95 TPM, 90 TPM, 85 TPM, 80 TPM, 75 TPM, 70 TPM, 65 TPM, 60 TPM, 55 TPM, 50 TPM, 45 TPM, 40 TPM, 35 TPM, 34 TPM, 33 TPM, 32 TPM, 31 TPM, 30 TPM, 29 TPM, 28 TPM, 27 TPM, 26 TPM, 25 TPM, 24 TPM, 23 TPM, 22 TPM, 21 TPM, 20 TPM, 19 TPM, 18 TPM, 17 TPM, 16 TPM, 15 TPM, 14 TPM, 13 TPM, 12 TPM, 11 TPM, 10 TPM, 9 TPM, 8 TPM, 7 TPM, 6 TPM, 5 TPM, 4 TPM, 3 TPM, 2 TPM, 및 1 TPM, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예컨대, 약 1,000 TPM 이하 내지 약 35 TPM 이하 수준의 HPV16 E7₁₁₋₁₉의 발현을 갖는 표적 세포와 접촉시킬 경우 더 높은 수준의 사이토카인 또는 세포독성 분자를 생산할 수 있다. 일부 구체예에서, 낮은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현 수준은 약 1 TPM 내지 약 35 TPM, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예를 들어, 1-32 TPM을 의미하는 "이형접합성 발현"으로 지칭된다. 예를 들어, 숙주 세포는 적어도 1.2배, 1.5배, 1.8배, 2.0배, 2.2배, 2.5배, 2.8배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 5.5배, 6배, 6.5배, 7배, 7.5배, 8배, 8.5배, 9배, 9.5배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 1000배 이상, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예를 들어, 1.2배 내지 2배 더 높은 수준의 사이토카인 또는 세포독성 분자를 생산할 수 있다.
- [0430] 일부 구체예에서, 숙주 세포는 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 표적 세포(예를 들어, HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 과증식성 세포)를 특이적으로 및/또는 선택적으로 사멸시킬 수 있다. 특정 구체예에서, 표적 세포는 (i) 아미노산 서열 YMLDLQPET를 포함하거나 이로 구성된 폴리펩티드; 및 (ii) 매칭된 MHC 분자를 발현한다.
- [0431] 일부 구체예에서, 숙주 세포는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하지 않고/거나 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항의 결합 단백질에 의해 인식되지 않고/거나 혈청형 HLA-A*02가 아니고/거나 HLA-A*02 대립유전자, 예를 들어, HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:05, HLA-A*02:06, 또는 HLA-A*02:07 대립유전자를 발현하지 않는다. 예를 들어, 환자는 HPV16 E7₁₁₋₁₉-음성 또는 HLA-A*02:01-음성인 건강한 공여자로부터 숙주 세포를 받을 수 있다. 공여자(또는 조작된 자가 세포)로부터 분리된 조혈 줄기 세포와 같은 줄기 세포는 이식 물질의 공급원으로서 사용될 수 있다. 병행하여, 동일한 공여자로부터 분리된 T 세포는, 예를 들어, 본원에 기재된 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 결합 단백질을 발현시킴으로써 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 인식하도록 유전자 조작될 수 있다. 공여자 줄기 세포는 재구성된

면역 시스템과 같은 세포 집단을 환자에게 이식하는데 사용될 수 있고, 숙주 세포는 고도로 특이적인 항종양 효과를 유도할 목적으로 환자에게 주입될 수 있다. 조작된 공여자 T 세포는, 예를 들어, HPV16 E7₁₁₋₁₉-양성인 잔여 백혈병 세포와 같은 암 세포를 포함하는 환자의 모든 천연 혈액 세포와 같은 HPV16 E7₁₁₋₁₉-발현 세포를 인식하고 제거하여 재발을 방지하고 완전한 치료를 촉진하도록 설계될 수 있다. 환자의 새로운 건강한 혈액 세포는 공여자로부터 유래되고, 따라서 HPV16 E7₁₁₋₁₉-음성, HLA-A*02:01-양성, 및/또는 HLA-A*02:01-음성이며, 본원에 기재된 조작된 세포는 최소한의 독성 부작용을 가질 수 있다. 이러한 환자-매칭된 숙주 세포 및 치료 방법은 하기에 추가로 기재된 치료 방법에 따라 사용될 수 있다.

[0432] 일부 구체예에서, 사멸은 사멸 검정에 의해 결정된다. 일부 구체예에서, 사멸 검정은 숙주 세포와 표적 세포를 20:1 내지 0.625:1, 예를 들어, 15:1 내지 1.25:1, 10:1 내지 1.5:1, 8:1 내지 3:1, 6:1 내지 5:1, 20:1 내지 5:1, 10:1 내지 2.5:1 등의 비로 공동 배양함으로써 수행된다. 일부 구체예에서, 표적 세포는 1 µg/mL 내지 50 pg/mL의 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드, 예를 들어, 1 µg/mL 내지 10 ng/mL, 500 ng/mL 내지 0.5 ng/mL, 10 ng/mL 내지 10 pg/mL, 250 ng/mL 내지 1 ng/mL, 50 ng/mL 내지 5 ng/mL, 20 ng/mL 내지 10 ng/mL 등으로 펄싱된다.

[0433] 일부 구체예에서, 숙주 세포는 백만 전사체 당 약 1,000 전사체(TPM) 이하, 950 TPM, 900 TPM, 850 TPM, 800 TPM, 750 TPM, 700 TPM, 650 TPM, 600 TPM, 550 TPM, 500 TPM, 450 TPM, 400 TPM, 350 TPM, 300 TPM, 250 TPM, 200 TPM, 150 TPM, 100 TPM, 95 TPM, 90 TPM, 85 TPM, 80 TPM, 75 TPM, 70 TPM, 65 TPM, 60 TPM, 55 TPM, 50 TPM, 45 TPM, 40 TPM, 35 TPM, 34 TPM, 33 TPM, 32 TPM, 31 TPM, 30 TPM, 29 TPM, 28 TPM, 27 TPM, 26 TPM, 25 TPM, 24 TPM, 23 TPM, 22 TPM, 21 TPM, 20 TPM, 19 TPM, 18 TPM, 17 TPM, 16 TPM, 15 TPM, 14 TPM, 13 TPM, 12 TPM, 11 TPM, 10 TPM, 9 TPM, 8 TPM, 7 TPM, 6 TPM, 5 TPM, 4 TPM, 3 TPM, 2 TPM, 및 1 TPM, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예컨대, 약 1,000 TPM 이하 내지 약 35 TPM 이하의 HPV16 E7₁₁₋₁₉의 수준을 갖는 표적 세포와 접촉시킬 경우 더 높은 수의 표적 세포를 사멸시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 낮은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현 수준은 약 1 TPM 내지 약 35 TPM, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예를 들어, 1-32 TPM을 의미하는 "이형집합성 발현"으로 지칭된다. 예를 들어, 숙주 세포는 적어도 1.2배, 1.5배, 1.8배, 2.0배, 2.2배, 2.5배, 2.8배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 5.5배, 6배, 6.5배, 7배, 7.5배, 8배, 8.5배, 9배, 9.5배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 1000배 이상, 또는 이들 사이의 임의의 포괄적 범위, 예를 들어, 1.2배 내지 2배 더 높은 수의 표적 세포를 사멸시킬 수 있다.

[0434] 본 발명은 본원에 기재된 적어도 하나의 숙주 세포를 포함하는 세포의 집단을 추가로 제공한다. 세포의 집단은 적어도 하나의 다른 세포, 예를 들어, 숙주 세포(예를 들어, T 세포) 외에 기재된 임의의 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 포함하는 이중 집단일 수 있으며, 이는 재조합 발현 벡터, 또는 T 세포 이외의 세포, 예를 들어, B 세포, 대식세포, 호중구, 적혈구, 간세포, 내피 세포, 상피 세포, 근육 세포, 뇌 세포 등을 포함하지 않는다. 대안적으로, 세포의 집단은 실질적으로 균질한 집단일 수 있으며, 여기서 집단은 주로 재조합 발현 벡터를 포함하는 (예를 들어, 이들로 필수적 요소로 하여 포함하는) 숙주 세포를 주로 포함한다. 집단은 또한 세포의 클론 집단일 수 있고, 여기서 집단의 모든 세포는 재조합 발현 벡터를 포함하는 단일 숙주 세포의 클론이며, 따라서 집단의 모든 세포는 재조합 발현 벡터를 포함한다. 본 발명에 포함되는 일 구체예에서, 세포의 집단은 본원에 기재된 바와 같은 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 포함하는 클론 집단이다.

[0435] 본 발명에 포함되는 구체예에서, 집단에서 세포의 수는 빠르게 확장될 수 있다. T 세포의 수의 확장은 당 분야에 널리 공지된 임의의 다수의 방법에 의해 달성될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 8,034,334 및 8,383,099, 미국 특허 공개 번호 2012/0244133, Dudley 등 (2003) *J. Immunother.* 26:332-242, 및 Riddell 등 (1990) *J. Immunol. Methods* 128:189-201). 예를 들어, T 세포의 수의 확장은 T 세포를 OKT3 항체, IL-2, 및 피더 PBMC(예를 들어, 조사된 동종이계 PBMC)와 함께 배양함으로써 수행될 수 있다.

[0436] V. 약학적 조성물

[0437] 본 발명에 포함되는 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 조성물(예를 들어, 결합 단백질, 핵산, 세포 등) 및 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물은 본원에 제공된다.

[0438] 용어 "약학적으로 허용되는"은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제나 합병증 없이 합리적인 이익/위험 비율에 상응하게 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한

제제, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭한다.

[0439] 본 발명에 포함되는 제제 및 다른 조성물은 상기 화합물을 함유하는 예를 들어, (1) 경구 투여, 예를 들어, 드렌치(drenches)(수성 또는 비수성 용액 또는 현탁액), 정제, 볼루스, 분말, 과립, 페이스트; (2) 예를 들어, 멸균 용액 또는 현탁액으로서, 예를 들어, 피하, 근육내 또는 정맥내 주사에 의한 비경구 투여; (3) 국소 적용, 예를 들어, 피부에 적용되는 크림, 연고 또는 스프레이; (4) 질내 또는 직장내, 예를 들어, 패서리, 크림 또는 포말로서; 또는 (5) 에어로졸, 예를 들어, 수성 에어로졸, 리포솜 제제 또는 고체 입자와 같은 다양한 투여 경로에 적합한 것을 포함하는, 고체 또는 액체 형태의 투여를 위해 특정하게 제형화될 수 있다. 비제한적으로, 정제, 캡슐, 액체 시럽, 연질 젤, 좌제 및 관장제와 같은, 본원에 기재된 제제 또는 조성물에 대한 임의의 적절한 폼 팩터가 고려된다.

[0440] 본 발명에 포함되는 약학적 조성물은 개별 투여 형태, 예컨대, 캡슐, 사체 또는 정제, 또는 액체 또는 에어로졸 스프레이로서 제공될 수 있으며, 이들 각각은 미리 결정된 양의 활성 성분을 분말 또는 과립, 용액, 또는 수성 또는 비수성 액체 중 현탁액, 수중유 에멀전, 유중수 액체 에멀전, 재구성용 분말, 경구 소비용 분말, 병(병 내의 분말 또는 액체 포함), 경구 용해 필름, 로젠지, 페이스트, 튜브, 검, 및 팩으로서 함유한다. 이러한 투여 형태는 임의의 약학적 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0441] 적합한 부형제는 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤 등 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 구체예에서, 본원에 개시된 바와 같은 숙주 세포, 결합 단백질 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물은 적합한 주입 매질을 추가로 포함한다. 적합한 주입 매질은 임의의 등장성 매질 제형일 수 있고, 전형적으로 생리 식염수, Normosol™-R(Abbott) 또는 Plasma-Lyte™ A(Baxter), 물 중 5% 텍스트로스, 링거 락테이트가 이용될 수 있다. 주입 배지는 인간 혈청 알부민 또는 다른 인간 혈청 성분으로 보충될 수 있다. 유효량의 숙주 세포 또는 조성물을 포함하는 단위 용량이 또한 고려된다.

[0442] 또한 유효량의 숙주 세포 또는 숙주 세포를 포함하는 조성물을 포함하는 단위 용량이 본원에 제공된다. 본원에 기재된 바와 같이, 숙주 세포는 면역 세포, T 세포(CD4⁺ T 세포 및/또는 CD8⁺ T 세포), 세포독성 림프구(예를 들어, 세포독성 T 세포 및/또는 자연 살해(NK) 세포) 등을 포함한다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 단위 용량은 단독으로 또는 다른 세포와 조합하여, 예를 들어, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 다른 세포를 포함하는 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95%의 조작된 세포를 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 구체예에서, 원하는 세포는 감소된 양으로 존재하거나 실질적으로 존재하지 않으며, 예를 들어, 조성물 중에 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 또는 약 1% 미만의 세포 집단이다.

[0443] 조성물 또는 단위 용량에서 세포의 양은 적어도 하나의 세포(예를 들어, 적어도 하나의 조작된 CD8⁺ T 세포, 조작된 CD4⁺ T 세포, 및/또는 NK 세포)이거나 보다 전형적으로 10²개 초과 세포이고, 예를 들어, 최대 10⁶개, 최대 10⁷개, 최대 10⁸개 세포, 최대 10⁹개 세포, 또는 10¹⁰개 초과 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 약 10⁶ 내지 약 10¹⁰개 세포/m²의 범위, 예를 들어, 약 10⁵ 내지 약 10⁹개 세포/m²의 범위로 투여된다. 세포의 수는 조성물이 의도되는 궁극적인 용도 뿐만 아니라 이에 포함된 세포의 유형에 의존적일 것이다. 예를 들어, 특정 항원에 특이적인 결합 단백질을 함유하도록 변형된 세포는 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 초과에 이러한 세포를 함유하는 세포 집단을 포함할 것이다. 본원에 제공된 용도를 위해, 세포는 일반적으로 1 리터 이하, 500 ml 이하, 250 ml 이하, 또는 100 ml 이하의 부피이다. 구체예에서, 원하는 세포의 밀도는 전형적으로 10⁴개 초과 세포/ml이고, 일반적으로 10⁷개 초과 세포/ml, 일반적으로 10⁸개 이상 세포/ml이다. 세포는 단일 주입으로 또는 일정 범위의 시간에 걸쳐 다중 주입으로 투여될 수 있다. 임상적으로 관련된 수의 면역 세포는 누적적으로 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰, 또는 10¹¹개 세포와 같거나 초과하는 다중 주입으로 배분될 수 있다. 일부 구체예에서, 조작된 면역 세포의 단위 용량은 동종이계 공여자로부터의 조혈 줄기 세포와 (예를 들어, 동시에 또는 동시에) 공동-투여될 수 있다.

[0444] 약학적 조성물은 의료 분야의 숙련가에 의해 결정되는 바와 같이 치료(또는 예방)될 질환 또는 병태에 적합한 방식으로 투여될 수 있다. 조성물의 적절한 용량 및 적절한 투여 기간 및 빈도는 환자의 건강 상태, 환자의 크기(즉, 체중, 질량, 또는 신체 면적), 환자의 상태의 유형 및 중증도, 활성 성분의 특정 형태, 및 투여 방법과

같은 인자에 의해 결정될 것이다. 일반적으로, 적절한 용량 및 치료 요법은 치료적 및/또는 예방적 이점(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이, 보다 빈번한 완전 또는 부분 관해, 더 긴 무질병 및/또는 전체 생존, 또는 증상 중증도의 감소와 같은 개선된 임상 결과를 포함함)을 제공하기에 충분한 양의 조성물(들)을 제공한다.

[0445] 약학적 조성물의 유효량은 본원에 기재된 바와 같은 요망되는 임상 결과 또는 유익한 치료를 달성하기에 필요한 투여량 및 기간 동안의 충분한 양을 지칭한다. 유효량은 하나 이상의 투여로 전달될 수 있다. 투여가 질병 또는 질병-상태를 갖는 것으로 이미 공지되거나 확인된 대상체에 대한 것이라면, 용어 "치료학적 유효량"은 치료와 관련하여 사용될 수 있는 반면, "예방학적 유효량"은 유효량을 예방 과정으로서 질병 또는 질병-상태(예를 들어, 재발)에 걸리기 쉬우거나 발병할 위험이 있는 대상체에게 투여하는 것을 기술하는데 사용될 수 있다.

[0446] 본원에 기재된 약학적 조성물은 단위-용량 또는 다중-용량 용기, 예컨대, 밀봉된 앰플 또는 바이알로 제공될 수 있다. 이러한 용기는 환자에게 주입될 때까지 제형의 안정성을 보존하기 위해 동결될 수 있다. 일부 구체예에서, 단위 용량은 약 10^7 개 세포/ m^3 내지 약 10^{11} 개 세포/ m^3 의 용량으로 본원에 기재된 바와 같은 숙주 세포를 포함한다. 예를 들어, 비경구 또는 정맥내 투여 또는 제형을 포함하는 다양한 치료 요법에서 본원에 기재된 특정 조성물을 사용하기 위한 적합한 투여량 및 치료 요법의 개발.

[0447] 대상 조성물이 비경구적으로 투여되는 경우, 조성물은 또한 멸균 수성 또는 유지성 용액 또는 현탁액을 포함할 수 있다. 적합한 비독성 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매는 물, 링거 용액, 등장성 염 용액, 1,3-부탄디올, 에탄올, 프로필렌 글리콜 또는 물과의 혼합물의 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 수용액 또는 현탁액은 하나 이상의 완충제, 예컨대, 소듐 아세테이트, 소듐 시트레이트, 소듐 보레이트 또는 소듐 타르트레이트를 추가로 포함할 수 있다. 물론, 임의의 투여 단위 제형을 제조하는데 사용되는 임의의 물질은 사용되는 양으로 약학적으로 순수하고 실질적으로 무독성이어야 한다. 또한, 활성 화합물은 서방형 제조물 및 제형에 혼합될 수 있다. 본원에서 사용되는 투여량 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 분리된 유닛을 지칭한다; 각각의 유닛은 적절한 약학적 담체와 관련하여 원하는 효과를 생성하도록 계산된 미리 결정된 양의 조작된 면역 세포 또는 활성 화합물을 함유할 수 있다.

[0448] 일부 구체예에서, 기재된 약학적 조성물은 대상체에게 투여될 때, HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 관심 세포에 대한 면역 반응을 유발할 수 있다. 이러한 약학적 조성물은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발의 예방적 및/또는 치료적 치료를 위한 백신으로서 유용할 수 있다.

[0449] 일부 구체예에서, 약학적 조성물은 생리학적으로 허용되는 애주번트를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 사용되는 애주번트는 약학적 조성물의 증가된 면역원성을 제공한다. 이러한 추가의 면역 반응 자극 화합물 또는 애주번트는 (i) 펩티드의 재구성 및 상기 정의된 바와 같은 오일-기반 애주번트로의 임의의 유화 후에 본 발명에 따른 약학적 조성물에 혼합될 수 있거나, (ii) 상기 정의된 본 발명에 포함되는 재구성 조성물의 일부일 수 있거나, (iii) 재구성된 펩티드(들)에 물리적으로 연결될 수 있거나, (iv) 치료될 대상체, 포유동물 또는 인간에게 별도로 투여될 수 있다. 애주번트는 항원의 느린 방출을 제공하는 것일 수 있거나(예를 들어, 애주번트는 리포솜일 수 있음), 이는 그 자체로 면역원성이어서 항원과 상승작용적으로 기능하는 애주번트일 수 있다. 예를 들어, 애주번트는 항원 흡수를 촉진하거나, 면역계 세포를 투여 부위로 동원하거나, 반응 림프 세포의 면역 활성화를 촉진하는 공지된 애주번트 또는 다른 물질일 수 있다. 애주번트는 면역조절 분자(예를 들어, 사이토카인), 오일 및 물 에멀전, 알루미늄 하이드록사이드, 글루칸, 텍스투란 셀페이트, 철 옥사이드, 소듐 알기네이트, 박토-애주번트, 합성 중합체, 예컨대 폴리 아미노산 및 아미노산의 공중합체, 사포닌, 파라핀 오일 및 푸라밀 디펩티드를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 애주번트는 애주번트 65, α -GalCer, 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 하이드록사이드, 칼슘 포스페이트, β -글루칸 펩티드, CpG DNA, GM-CSF, GPI-0100, IFA, IFN- γ , IL-17, 지질 A, 리포폴리사카라이드, 리포반트(Lipovant), Montanide™, N-아세틸-무라밀-L-알라닌-D-이소글루타민, pam3CSK4, 쉘 A, 트레할로스 디마이크로레이트 또는 자이모산이다.

[0450] 일부 구체예에서, 애주번트는 면역조절 분자이다. 예를 들어, 면역조절 분자는 재조합 단백질 사이토카인, 케모카인 또는 면역반응을 향상시키도록 설계된 사이토카인, 케모카인 또는 면역자극제를 인코딩하는 면역자극제 또는 핵산일 수 있다.

[0451] 면역조절 사이토카인의 예는 인터페론(예를 들어, IFN α , IFN β 및 IFN γ), 인터루킨(예를 들어, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17 및 IL-20), 종양 괴사 인자(예를 들어, TNF α 및 TNF β), 에리트로포이에틴(EPO), FLT-3 리간드, gIp10, TCA-3, MCP-1, MIF, MIP-1.알파, MIP-1 β , Rantes, 대식세포 집락 자극 인자(M-CSF), 과립구 집락 자극 인자(G-CSF), 및 과립구-대식세포 집락 자극 인자

(GM-CSF), 뿐만 아니라 상기 중 임의의 것의 기능적 단편을 포함한다.

[0452] 일부 구체예에서, 케모카인 수용체, 즉, CXCR, CC, C 또는 CXCR3 케모카인 수용체에 결합하는 면역조절 케모카인이 또한 본원에 제공된 조성물에 포함될 수 있다. 케모카인의 예는 비제한적으로, Mip1 α , Mip-1 β , Mip-3 α (Larc), Mip-3 β , Rantes, Hcc-1, Mpif-1, Mpif-2, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, 에오타신, Tarc, ELC, I309, IL-8, GCP-2 Gro- α , Gro- β , Gro- γ , Nap-2, Ena-78, GCP-2, Ip-10, Mig, I-Tac, Sdf-1, 및 Bca-1(Blc), 뿐만 아니라 상기 중 임의의 것의 기능적 단편을 포함한다.

[0453] 일부 구체예에서, 조성물은 본원에 기술된 결합 단백질(예를 들어, TCR, TCR의 항원-결합 단편, CAR, 또는 TCR 및 이펙터 도메인을 포함하는 융합 단백질), TCR α 및/또는 TCR β 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 본원에 기술된 바와 같은 결합 단백질, TCR α 및/또는 TCR β 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산, 예컨대, 결합 단백질, TCR α 및/또는 TCR β 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 분자를 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 결합 단백질, TCR α 및/또는 TCR β 폴리펩티드를 인코딩하는 오픈 리딩 프레임에 포함하는 발현 벡터를 포함한다.

[0454] 세포(예를 들어, T 세포, NK 세포 등)에 의해 흡수될 때, DNA 분자는 염색체의 분자로서 세포에 존재할 수 있고/있거나 염색체에 통합될 수 있다. DNA는 별도의 유전자 물질로 남을 수 있는 플라스미드의 형태로 세포에 도입될 수 있다. 대안적으로, 염색체에 통합될 수 있는 선형 DNA는 세포에 도입될 수 있다. 임의적으로, DNA를 세포에 도입할 때, 염색체로의 DNA 통합을 촉진하는 시약이 첨가될 수 있다.

[0455] VI. 용도 및 방법

[0456] 본원에 기재된 조성물은 다양한 진단, 예후 및 치료 적용에 사용될 수 있다. 진단 방법, 예후 방법, 치료 방법 또는 이들의 조합과 같은 본원에 기재된 임의의 방법에서, 방법의 모든 단계는 단일 행위자에 의해 또는 대안적으로 한 명 초과의 행위자에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 진단은 치료적 치료를 제공하는 행위자에 의해 직접 수행될 수 있다. 대안적으로, 치료제를 제공하는 사람은 진단 검정의 수행을 요청할 수 있다. 진단의 및/또는 치료적 중재자는 진단 검정 결과를 해석하여 치료 전략을 결정할 수 있다. 유사하게, 이러한 대안적인 공정은 예후 검정과 같은 다른 검정에 적용될 수 있다.

[0457] 본 발명에 포함되는 일부 용도 및 방법에서, 대상체 또는 대상체 샘플이 이용된다. 일부 구체예에서, 대상체는 동물이다. 동물은 어느 한 성별일 수 있고 임의의 발달 단계에 있을 수 있다. 일부 구체예에서, 동물은 포유동물과 같은 척추동물이다. 일부 구체예에서, 대상체는 비-인간 포유동물이다. 일부 구체예에서, 대상체는 개, 고양이, 소, 돼지, 말, 양 또는 염소와 같은 가축이다. 일부 구체예에서, 대상체는 개 또는 고양이와 같은 반려동물이다. 일부 구체예에서, 대상체는 소, 돼지, 말, 양 또는 염소와 같은 가축이다. 일부 구체예에서, 대상체는 동물원 동물이다. 일부 구체예에서, 대상체는 연구 동물, 예컨대, 설치류(예를 들어, 마우스 또는 래트), 개, 돼지, 또는 비-인간 영장류이다. 일부 구체예에서, 동물은 유전적으로 조작된 동물이다. 일부 구체예에서, 동물은 유전자전이 동물(예를 들어, 유전자전이 마우스 및 유전자전이 돼지)이다. 일부 구체예에서, 대상체는 어류 또는 파충류이다.

[0458] 일부 구체예에서, 대상체는 마우스와 같은 설치류이다. 이러한 일부 구체예에서, 마우스는 유전자전이 마우스, 예를 들어, 인간 MHC(즉, HLA) 분자를 발현하는 마우스이다(예를 들어, Nicholson 등 (2012) *Adv. Hematol.* 2012:404081). 일부 구체예에서, 대상체는 인간 TCR을 발현하는 유전자전이 마우스 또는 항원-음성 마우스이다(예를 들어, Li 등 (2010) *Nat. Med.* 16:1029-1034 and Obenaus 등 (2015) *Nat. Biotechnol.* 33:402-407). 일부 구체예에서, 대상체는 인간 HLA 분자 및 인간 TCR을 발현하는 유전자전이 마우스이다. 일부 구체예에서, 예를 들어, 대상체가 유전자전이 HLA 마우스인 경우, 확인된 TCR은, 예를 들어, 키메라 또는 인간화되도록 변형된다. 일부 구체예에서, TCR 스캐폴드는, 예를 들어, 공지된 결합 단백질 인간화 방법과 유사하게 변형된다.

[0459] 일부 구체예에서, 대상체는 인간이다. 일부 구체예에서, 대상체는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애(예를 들어, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발)의 동물 모델이다. 예를 들어, 동물 모델은 인간-유래 암의 동소 이종이식 동물 모델일 수 있다.

[0460] 일부 구체예에서, 대상체는 인간, 예컨대 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애를 갖는 인간이다.

[0461] 본원에 기재된 방법은 이를 필요로 하는 대상체를 치료하는데 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은 "이를 필요로 하는 대상체"는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애의 재발, 및/또는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애에 걸리기 쉬운 임의의 대상체를 포함한다. 본원에 기

재된 바와 같이, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발일 수 있다.

[0462] 본 발명에 포함되는 방법의 일부 구체예에서, 대상체는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애에 대한 치료 예컨대, 화학요법, 방사선 요법, 표적화된 요법 및/또는 면역요법을 받지 않았다. 일부 구체예에서, 대상체는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애에 대한 치료, 예컨대, 화학요법, 방사선 요법, 표적화된 요법 및/또는 면역요법을 받았다.

[0463] 일부 구체예에서, 대상체는 암성 또는 전암성 조직을 제거하기 위한 수술을 받았다. 일부 구체예에서, 암성 조직은 제거되지 않았으며, 예를 들어, 암성 조직은 신체의 수술 불가능한 영역, 예를 들어, 생명에 필수적인 조직, 또는 외과적 절차가 환자에게 상당한 해를 끼칠 위험이 있는 영역에 위치할 수 있다.

[0464] 일부 구체예에서, 대상체 또는 이의 세포는 관련 요법, 예를 들어, 표준 치료 요법, 면역 체크포인트 억제제 요법 등에 내성이다. 예를 들어, 본 발명에 포함되는 하나 이상의 바이오마커를 조절하는 것은 면역 체크포인트 억제제 요법에 대한 내성을 극복할 수 있다.

[0465] 일부 구체예에서, 대상체는 원치 않는 부재하는, 존재하는 또는 비정상적인 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 갖는 것으로 확인된 것과 같이, 본원에 기재된 조성물 및 방법에 따른 조절을 필요로 한다.

[0466] a. 진단 방법

[0467] 본 발명에 포함되는 양태에서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 및/또는 HPV16 E7₁₁₋₁₉를 발현하는 관심 세포의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 진단 방법으로서, 본원에 기술된 적어도 하나의 결합 단백질 또는 적어도 하나의 숙주 세포의 사용에 의해 샘플 중 상기 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 방법은 (예를 들어, 대상체로부터의) 샘플을 수득하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 적어도 하나의 결합 단백질 또는 적어도 하나의 숙주 세포는 MHC 분자의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 에피토프와 복합체를 형성하고, 복합체는 형광 활성화된 세포 분류(FACS), 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사면역 검정(RIA), 면역화학, 웨스턴 블롯 또는 세포내 유동 검정의 형태로 검출된다.

[0468] 본 발명에 의해 포함되는 양태에서, 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발의 수준을 검출하기 위한 진단 방법으로서, a) 대상체로부터 수득된 샘플을 본원에 기재된 적어도 하나의 결합 단백질, 적어도 하나의 숙주 세포 또는 숙주 세포의 집단과 접촉시키는 단계; 및 b) 반응성의 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 대조군 수준과 비교하여 더 높은 수준의 반응성은 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발 수준을 나타내는, 진단 방법이 본원에 제공된다.

[0469] 일부 구체예에서, 반응성의 수준은 T 세포 활성화 또는 이펙터 기능, 예를 들어, 비제한적으로 T 세포 증식, 사멸, 또는 사이토카인 방출에 의해 표시된다. 대조군 수준은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발에 노출되지 않은 건강한 대상체의 참조 넘버 또는 수준일 수 있다.

[0470] 생물학적 샘플은 본원에 기재된 바와 같은 펩티드 항원(예를 들어, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원)에 대한 면역 반응의 존재 및 수준을 결정하기 위해 대상체로부터 수득될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은 "생물학적 샘플"은 혈액 샘플(이로부터 혈청 또는 혈장이 제조될 수 있음), 생검 표본, 체액(예를 들어, 혈액, 분리된 PBMC, 분리된 T 세포, 폐 세정액, 복수, 점막 세정액, 활액, 체액 등), 골수, 림프절, 조직 외식편, 장기 배양물 또는 대상체 또는 생물학적 공급원으로부터의 임의의 다른 조직 또는 세포 제조물일 수 있다. 생물학적 샘플은 또한 임의의 약학적 조성물을 수용하기 전에 대상체로부터 수득될 수 있으며, 이 생물학적 샘플은 기준선 데이터를 확립하기 위한 대조군으로서 유용하다.

[0471] 항원-특이적 T 세포 반응은 전형적으로 구조적으로 별개의 또는 관련이 없는 대조군 항원에 대신 노출되는 동일한 공급원 집단으로부터의 T 세포 및 적절한 맥락에서 동족 항원(예를 들어, 면역적합성 항원-제시 세포에 의해 제시되는 경우, T 세포를 프라이밍 또는 활성화시키는데 사용되는 항원)에 노출되는 T 세포 사이에 만들어질 수 있는 본원에 기술된 임의의 T 세포 기능성 파라미터에 따른 관찰된 T 세포 반응(예를 들어, 증식, 사이토카인 방출, CTL 활성화, 변경된 세포 표면 마커 표현형 등)의 비교에 의해 결정된다. 대조군 항원에 대한 반응보다 통계

적으로 유의하게 더 큰 동족 항원에 대한 반응은 항원-특이성을 의미한다.

- [0472] 면역 반응, 예컨대, 세포독성 T 림프구(CTL) 면역 반응의 수준은 본원에 기술되고 당 분야에서 통상적으로 실시되는 수많은 면역학적 방법 중 임의의 하나에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, CTL 면역 반응의 수준은, 예를 들어, T 세포에 의해 발현된 본원에 기재된 결합 단백질 중 어느 하나의 투여 전 및 후에 결정될 수 있다. CTL 활성을 결정하기 위한 세포독성 검정은 당 분야에서 통상적으로 실시되는 여러 기술 및 방법 중 임의의 하나를 사용하여 수행될 수 있다(예를 들어, [Henkart 등, "Cytotoxic T-Lymphocytes" in Fundamental Immunology, Paul (ed.) (2003 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), 1127-50], 및 여기에 인용된 참고문헌).
- [0473] 본 발명은 부분적으로 생물학적 샘플이 HPV16 E7₁₁₋₁₉과 같은 관심 표적의 발현과 같이 관심 출력과 연관되어 있는지 여부를 정확하게 분류하기 위한 방법, 시스템 및 코드를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 통계적 알고리즘 및/또는 경험적 데이터를 사용하여 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애에 대한 요법에 반응하거나 반응하지 않는 것으로 관련 또는 위험 (예를 들어, 대상체로부터의) 샘플을 분류하는 데 유용하다.
- [0474] HPV16 E7₁₁₋₁₉의 양 또는 활성을 검출하고, 따라서 샘플이 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애에 대한 요법에 반응할 가능성이 있는지 여부를 분류하는데 유용한 예시적인 방법은 생물학적 샘플을 제제, 예컨대 생물학적 샘플에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉의 양 또는 활성을 검출할 수 있는 본원에 기재된 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 면역원성 펩티드 또는 결합제와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은, 예를 들어, 시험 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 적어도 하나의 제제가 사용되며, 여기서 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 이러한 제제는 조합하여(예를 들어, 샌드위치 ELISA에서) 또는 연속적으로 사용될 수 있다. 특정 예에서, 통계 알고리즘은 단일 학습 통계 분류기 시스템이다. 예를 들어, 단일 학습 통계적 분류기 시스템은 예측 또는 확률 값 및 바이오마커의 존재 또는 수준에 기초하여 샘플을 분류하는데 사용될 수 있다. 단일 학습 통계적 분류기 시스템의 사용은 전형적으로 적어도 약 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 민감도, 특이성, 양성 예측 값, 음성 예측 값 및/또는 전체 정확도로 샘플을 분류한다.
- [0475] 다른 적합한 통계적 알고리즘은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 학습 통계적 분류기 시스템은 복잡한 데이터 세트(예를 들어, 관심 마커의 패널)에 적응하고 이러한 데이터 세트에 기초하여 결정을 내릴 수 있는 기계 학습 알고리즘 기술을 포함한다. 일부 구체예에서, 분류 트리(예를 들어, 랜덤 포레스트)와 같은 단일 학습 통계적 분류기 시스템이 사용된다. 다른 구체예에서, 바람직하게는 나란히 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 학습 통계적 분류기 시스템의 조합이 사용된다. 학습 통계적 분류기 시스템의 예는 비제한적으로, 귀납적 학습(예를 들어, 결정/분류 트리, 예컨대, 랜덤 포레스트, 분류 및 회귀 트리(C&RT), 부스팅 트리 등), 아마도 대략적으로 정확한(PAC) 학습, 연결주의 학습(예를 들어, 신경망(NN), 인공 신경망(ANN), 신경 퍼지 네트워크(NFN), 네트워크 구조, 다층 퍼셉트론과 같은 퍼셉트론, 다층 피드-포워드 네트워크, 신경망의 응용 네트워크, 믿음 네트워크에서의 베이저안 학습 등), 강화 학습(예를 들어, 나이브 학습, 적응 동적 학습, 및 시간차 학습과 같은 공지된 환경에서의 수동 학습, 미지의 환경에서의 수동 학습, 미지의 환경에서의 능동적 학습, 학습 작용-가치 함수, 강화 학습의 적용 등), 및 유전 알고리즘 및 진화 프로그래밍을 포함한다. 다른 학습 통계적 분류기 시스템은 지원 벡터 머신(예를 들어, 커널 방법), 다변수 적응 회귀 스플라인(MARS), 레벤버그-마르크워드트(Levenberg-Marquardt) 알고리즘, 가우스-뉴턴(Gauss-Newton) 알고리즘, 가우시안의 혼합물, 경사 하강 알고리즘, 및 학습 벡터 양자화(LVQ)를 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명에 포함되는 방법은 샘플 분류 결과를 임상의, 예를 들어, 종양 전문의에게 보내는 것을 추가로 포함한다.
- [0476] 일부 구체예에서, 대상체의 진단(예를 들어, 관심 TCR에 의한 TCR-HLA 복합체 결합과의 호환성을 결정하기 위한 HLA 유형지정 및/또는 이형접합성의 상실(LOH) 포함)에 이어서 진단에 기초하여 정의된 치료의 치료학적 유효량을 개체에게 투여한다.
- [0477] 일부 구체예에서, 상기 방법은 대조군 생물학적 샘플(예를 들어, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애가 없는 대상체, 관해 상태인 대상체, 치료에 민감한 장애의 대상체, 장애가 진행 중인 대상체, 또는 다른 관심 대상체로부터의 생물학적 샘플)을 수득하는 것을 추가로 포함한다.
- [0478] 본원에 기재된 분석 방법의 일부 구체예에서, (예를 들어, 대상체로부터의 샘플에서) HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현은 미리 결정된 대조군(표준) 샘플과 비교된다. 대상체로부터의 샘플은 전형적으로 암 세포 또는 조직과 같은 병에 걸린

조직으로부터의 것이다. 대조군 샘플은 동일한 대상체로부터 또는 상이한 대상체로부터 유래될 수 있다. 대조군 샘플은 전형적으로 정상 비-질환 샘플이다. 그러나, 질병의 병기결정을 위해 또는 치료의 효능을 평가하기 위한 것과 같은 일부 구체예에서, 대조군 샘플은 질병에 걸린 조직으로부터 유래될 수 있다. 대조군 샘플은 여러 상이한 대상체로부터의 샘플의 조합일 수 있다. 일부 구체예에서, 대상체로부터의 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현 측정(들)은 소정의 수준과 비교된다. 이러한 소정의 수준은 전형적으로 정상 샘플로부터 수득된다. 본원에 기재된 바와 같이, "소정의" 발현은 단지 예로서, 치료를 위해 선택될 수 있는 대상체를 평가하고/거나 암에 대한 반응을 평가하고/거나 조합 암 요법에 대한 반응을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 소정의 바이오마커 양 및/또는 활성 측정(들)은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애가 있거나 없는 환자의 집단에서 결정될 수 있다. 소정의 바이오마커 양 및/또는 활성 측정(들)은 모든 환자에게 동일하게 적용 가능한 단일 숫자일 수 있거나, 소정의 바이오마커 양 및/또는 활성 측정(들)은 환자의 특정 하위 집단에 따라 달라질 수 있다. 대상체의 연령, 체중, 신장 및 다른 인자는 개체의 소정의 바이오마커 양 및/또는 활성 측정(들)에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 소정의 바이오마커 양 및/또는 활성은 각 대상체에 대해 개별적으로 결정될 수 있다. 일 구체예에서, 본원에 기재된 방법에서 결정되고/거나 비교되는 양은 절대 측정치를 기반으로 한다.

[0479] 또 다른 구체예에서, 본원에 기재된 방법에서 결정되고/거나 비교되는 양은 상대적 측정, 예를 들어, 비율(예를 들어, 바이오마커 복사체 수, 수준 및/또는 치료 전 대 치료 후의 활성, 스파이크 또는 인공 대조군에 비해 이러한 바이오마커 측정, 하우스키핑 유전자의 발현에 비해 이러한 바이오마커의 측정, 등)을 기반으로 한다. 예를 들어, 상대적 분석은 치료 후 바이오마커 측정과 비교하여 치료 전 바이오마커 측정의 비율에 기반할 수 있다. 치료 전 바이오마커 측정은 요법의 개시 전 임의의 시점에 이루어질 수 있다. 치료 후 바이오마커 측정은 요법 개시 후 임의의 시점에 이루어질 수 있다. 일부 구체예에서, 치료 후 바이오마커 측정은 지속적인 모니터링을 위해 치료 개시 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20주 이상 및 심지어 무기한으로 더 오랫동안 이루어진다. 치료는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애를 단독으로 또는 다른 제제, 예컨대, 항암제, 예를 들어, 화학요법 또는 면역 체크포인트 억제제와 조합하여 치료하기 위한 요법을 포함할 수 있다.

[0480] 소정의 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현은 임의의 적합한 표준일 수 있다. 예를 들어, 소정의 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현은 대상체 선택이 평가되는 동일하거나 상이한 대상체로부터 수득될 수 있다. 일 구체예에서, 소정의 바이오마커 양 및/또는 활성 측정(들)은 동일한 환자의 이전 평가로부터 얻어질 수 있다. 이러한 방식으로, 환자의 선택의 진행은 시간 경과에 따라 모니터링될 수 있다. 또한, 대조군은 대상체가 인간인 경우, 또 다른 인간 또는 다수의 인간, 예를 들어, 인간의 선택된 그룹의 평가로부터 수득될 수 있다. 이러한 방식으로, 선택이 평가되고 있는 인간의 선택 정도는 적합한 다른 인간, 예를 들어, 관심 인간과 유사한 상황에 있는 다른 인간, 예를 들어, 유사한 또는 동일한 병태(들)의 인간 및/또는 동일한 민족 그룹과 비교될 수 있다.

[0481] 일부 구체예에서, 소정의 수준으로부터 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현의 변화는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 또는 5.0배 이상 또는 그 사이의 포괄적 범위이다. 이러한 컷-오프 값은 측정이 치료 후 바이오마커 측정과 비교하여 치료 전 바이오마커 측정의 비율에 기반하는 것과 같이 상대적 변화에 기반할 때 동일하게 적용된다.

[0482] 일부 구체예에서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현은, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 폴리펩티드 또는 이의 제제를 검출하거나 정량함으로써, 예컨대, 본원에 기재된 조성물을 사용함으로써 검출 및/또는 정량될 수 있다. 폴리펩티드는 당업자에게 널리 공지된 임의의 다수의 수단, 예를 들어, 면역확산, 면역전기영동, 방사면역검정(RIA), 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA), 면역형광 검정, 웨스턴 블롯팅, 결합제-리간드 검정, 면역조직화학 기술, 응집, 보체 검정, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 박층 크로마토그래피(TLC), 과산화 크로마토그래피 등에 의해 검출되고 정량화될 수 있다(예를 들어, Basic and Clinical Immunology, Sites and Terr, eds., Appleton and Lange, Norwalk, Conn. pp 217-262, 1991).

[0483] b. 치료 방법

[0484] 본 발명에 포함되는 양태에서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발을 예방 및/또는 치료하고/거나, 예컨대 HPV16 같은 HPV 균주로의 감염에 의해 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 과증식성 세포와 같은 관심 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 단계를 포함하는, 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 방법은 본원에 기재된 적어도 하나의 결합 단백질을 발현하는 세포를 포함하는

조성물의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 본 발명에 포함되는 방법은 또한 본원에 기재된 것과 같은 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 많은 상이한 장애에 대한 요법에 대한 반응성을 결정 하는데 사용될 수 있다.

[0485]

일부 구체예에서, MAGEA1 발현을 특징으로 하는 장애는 암이다. 용어 "암" 또는 "종양" 또는 "과증식성"은 조절 되지 않는 증식, 불멸성, 침습성 또는 전이 가능성, 빠른 성장 및 특정한 특징적인 형태학적 특징과 같은 암-유 발 세포의 전형적인 특징을 보유하는 세포의 존재를 지칭한다. 일부 구체예에서, 이러한 세포는 PD-1, PD-L1, PD-L2 및/또는 CTLA-4와 같은 면역 체크포인트 단백질의 발현 및 활성화로 인해 부분적으로 또는 전체적으로 이러한 특징을 나타낸다.

[0486]

암세포는 종종 종양의 형태로 되지만, 이러한 세포는 동물 내에서 단독으로 존재할 수 있거나, 백혈병 같은 혈액암에서와 같은 비-종양성 암세포일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "암"은 악성 암뿐만 아니라 전암성 암도 포함한다. 암에는 다양한 암, 방광암(가속성 및 전이성 방광암 포함), 유방암, 결장암(결장직장암 포함), 신장암, 간암, 폐암(소형 및 비-소형 세포 폐암 및 폐선암), 난소암, 전립선암, 고환암, 비뇨생식기암, 림프계암, 직장암, 후두암, 췌장암(외분비 췌장 암종 포함), 식도암, 위암, 담낭암, 자궁경부암, 갑상선암, 피부암(편평 세포 암종 포함)을 포함한 암종; 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 모상 세포 림프종, 조직구 림프종, 및 버킷 림프종을 포함하는 림프 계통의 조혈 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군, 골수성 백혈병 및 전골수구성 백혈병을 포함하는 골수 계통의 조혈 종양; 성상세포종, 신경모세포종, 신경아교종 및 신경초종을 포함하는 중추 및 말초 신경계의 종양; 섬유육종, 횡문근육종 및 골육종을 포함하는 중간엽 기원의 종양; 흑색종, 색소성 건피증, 각화극 세포종, 정상피종, 갑상선 여포암 및 기형암종을 포함한 기타 종양; 흑색종, 절제 불가능한 III기 또는 IV기 악성 흑색종, 편평세포암종, 소-세포 폐암, 비-소세포 폐암, 신경교종, 위장암, 신장암, 난소암, 간암, 결장직장암, 자궁내막암, 신장암, 전립선암, 갑상선암, 신경모세포종, 췌장암, 다형성 교모세포종, 자궁경부암, 위장암, 방광암, 간암, 유방암, 대장암, 두경부암, 위암, 생식세포종양, 골암, 골종양, 성인 뼈의 악성 섬유성 조직구종; 소아기, 뼈의 악성 섬유성 조직구종, 육종, 소아 육종, 부비동 자연 살해자, 신생물, 형질 세포 신생물; 골수이형성 증후군; 신경모세포종; 고환 생식세포 종양, 안구내 흑색종, 골수이형성증후군; 골수이형성/골수증식성 질환, 윤향막 육종, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 필라델피아 염색체 양성 급성 림프구성 백혈병(Ph+ ALL), 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 비만세포증 및 비만세포증과 연관된 모든 증상 및 그의 전이가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 부가하여, 질환은 기타 암에 부가하여 색소성 두드러기, 비만성 피부 비만세포증과 같은 비만세포증, 인간의 고립성 비만세포종뿐만 아니라 개 비만세포종 및 수포성, 적혈구 및 혈관확장성 비만세포증과 같은 일부 희귀 아형, 골수 증식성 또는 골수이형성 증후군과 같은 연관된 혈액 질환을 동반한 비만세포증 또는 급성 백혈병, 비만세포증과 연관된 골수 증식성 질환, 비만 세포 백혈병을 포함한다. 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는 다른 암도 장애의 범위 내에 포함된다: 방광암종, 요로상피 암종, 유방암, 결장암, 신장암종, 간암, 폐암, 난소암종, 췌장암종, 위장암, 자궁경부암, 갑상선, 고환암, 특히 고환 정상피종 및 피부암을 포함한 암종; 편평 세포 암종 포함; 위장 간질 종양("GIST"); 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 모상 세포 림프종 및 버킷 림프종을 포함하는 림프 계통의 조혈 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병 및 전골수구성 백혈병을 포함하는 골수 계통의 조혈 종양; 섬유육종 및 횡문근육종을 포함하는 중간엽 기원의 종양; 흑색종, 정상피종, 사분암종, 신경모세포종 및 신경교종을 포함하는 기타 종양; 성상세포종, 신경모세포종, 신경아교종 및 신경초종을 포함하는 중추 및 말초 신경계의 종양; 섬유육종, 횡문근육종, 및 골육종을 포함한 중간엽 기원의 종양; 및 흑색종, 색소성 건피증, 각화극세포종, 정상피종, 갑상선 여포암, 기형암종, 화학요법 불응성 비-고정종성 생식-세포 종양, 및 카포시 육종을 포함한 기타 종양 및 이의 임의의 전이. 본 발명에 포함되는 방법에 적용할 수 있는 암 유형의 다른 비제한적 예는 인간 육종 및 암종, 예를 들어 섬유육종, 점액 육종, 지방육종, 연골육종, 골형성 육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤향막종, 중피종, 유잉종양, 평활근육종, 횡문근육종, 편평세포암종, 기저세포암종, 선암종, 땀샘암종, 피지선암종, 유두암종, 유두선암종, 낭선암종, 수질암종, 기관지성 암종, 신세포 암종, 간종양, 담관암종, 융모막암종, 정상피종, 배아암종, 율름스종양, 골암, 뇌종양, 폐암종(폐선암종 포함), 소세포폐암종, 방광암종, 상피암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희돌기교종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 망막모세포종; 백혈병, 예를 들어 급성 림프구성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병(골수모세포, 전골수구성, 골수단구성, 단핵구 및 적백혈병); 만성 백혈병(만성 골수성(과립구) 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병); 및 진성적혈구증가증, 림프종(호지킨병 및 비-호지킨병), 다발성 골수종, 발텐스트롬 마크로 글로불린혈증 및 증쇄병을 포함한다. 일부 구체예에서, 암은 본질적으로 상피암이고, 방광암, 유방암, 자궁경부

암, 결장암, 부인과암, 신장암, 후두암, 폐암, 구강암, 두경부암, 난소암, 췌장암, 전립선암 또는 피부암을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 구체예에서, 상피암은 비-소세포 폐암, 비유두상 신장 세포 암종, 자궁경부 암종, 난소 암종(예를 들어, 장액성 난소 암종) 또는 유방암종이다. 상피암은 장액, 자궁내막, 점액, 투명 세포, 브레너 또는 미분화된 암을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 다른 방식으로 특징화될 수 있다. 일부 구체예에서, 암은 (진행된) 비-소세포폐암, 흑색종, 두경부 편평 세포암, (진행된) 요로상피 방광암, (진행된) 신장암(RCC), 미세부수체 불안정성-높은 암, 고전적 호지킨 림프종, (진행된) 위암, (진행된) 자궁경부암, 원발성 종격동 B-세포 림프종, (진행된) 간세포 암종, 유방 침윤성 암종, 방광 요로상피 암종 및 (진행된) 메르켈 세포 암종으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0487] 또한, 본원에 기재된 조성물은 또한 요망되는 활성을 추가로 조절하기 위해 조합 요법으로 투여될 수 있다. 추가 제제는 화학요법제, 호르몬, 항혈관형성제, 방사성 표지된 화합물, 또는 수술, 냉동요법, 및/또는 방사선요법을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 선행하는 치료 방법은 통상적인 요법의 다른 형태(예를 들어, 당업자에게 잘 알려진 암에 대한 표준 치유 치료)와 함께, 통상적인 요법 전 또는 이후에 연속적으로 시행될 수 있다. 예를 들어, 이러한 조절제는 치료적 유효량의 화학요법제와 함께 투여될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 이러한 조절제는 화학요법제의 활성 및 효능을 향상시키기 위해 화학요법과 함께 투여된다. 의사용 탁상 편람(PDR)은 다양한 암의 치료에 사용된 화학요법제의 투여량을 개시한다. 치료적으로 효과적인 이러한 전술한 화학요법 약물의 투여 요법 및 투여량은 치료되는 특정 흑색종, 질병의 정도 및 당업자에게 친숙한 다른 인자에 의존할 것이고, 의사에 의해 결정될 수 있다.

[0488] 단독으로 또는 다른 요법, 예를 들어, 암 요법과 조합하여 본원에 기재된 하나 이상의 조성물을 사용하는 요법은 HPV16 E7₁₁₋₁₉-발현 세포를 접촉시키기 위해 사용될 수 있고/있거나 치료에 대한 가능한 반응자로서 지시된 대상체와 같은 요망되는 대상체에게 투여될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 이러한 요법은 일단 대상체가 요법(예를 들어, 본원에 기재된 진단 또는 예후 방법에 따라 평가됨)에 대한 반응자가 아닌 것으로 표시되면 피할 수 있으며, 대안적인 치료 요법, 예컨대 표적화된 및/또는 비표적화된 암 요법이 권장 및/또는 투여될 수 있다.

[0489] 용어 "표적화된 요법"은 선택된 생체분자와 선택적으로 상호작용하여 암을 치료하는 제제의 투여를 지칭한다. 예를 들어, 면역 체크포인트 억제제의 억제에 관한 표적 요법은 본 발명에 포함되는 방법과 조합하여 유용하다.

[0490] 용어 "면역요법" 또는 "면역요법들"은 일반적으로 유익한 방식으로 면역 반응을 조절하기 위한 임의의 전략을 지칭하며, 면역 반응을 유도, 향상, 억제 또는 달리 변형시키는 것 뿐만 아니라 암과 같은 질병과 싸우기 위해 대상체의 면역 시스템의 특정 부분을 사용하는 임의의 치료를 포함하는 방법에 의해 질병에 걸렸거나 질병에 걸리거나 재발할 위험이 있는 대상체를 치료하는 것을 포함한다. 대상체 자신의 면역 시스템은 이러한 목적을 위한 하나 이상의 제제의 투여와 함께 또는 투여 없이 자극(또는 억제)된다. 면역 반응을 유도하거나 증폭시키도록 설계된 면역요법은 "활성화 면역요법"으로 지칭된다. 면역 반응을 감소시키거나 억제하도록 설계된 면역요법은 "억제 면역요법"으로 지칭된다. 일부 구체예에서, 면역요법은 암 세포와 같은 관심 세포에 특이적이다. 일부 구체예에서, 면역요법은 "비표적화"될 수 있으며, 이는 면역계 세포와 선택적으로 상호작용하지 않지만 면역계 기능을 조절하는 제제의 투여를 지칭한다. 비표적화 요법의 대표적인 예는 화학요법, 유전자 요법 및 방사선 요법을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0491] 일부 형태의 면역요법은, 예를 들어, 암 백신 및/또는 감작된 항원 제시 세포의 사용을 포함할 수 있는 표적화된 요법이다. 예를 들어, 종양용해 바이러스는 정상 세포를 손상시키지 않으면서 암 세포를 감염시키고 용해시킬 수 있어 이들이 암 요법에 잠재적으로 유용하게 할 수 있는 바이러스이다. 종양용해 바이러스의 복제는 종양 세포 파괴를 촉진하고 또한 종양 부위에서 용량 증폭을 일으킨다. 이들은 또한 항암 유전자에 대한 벡터로서 작용하여 이들이 종양 부위에 특이적으로 전달되도록 할 수 있다. 면역요법은 암 항원 또는 질병 항원에 대해 지시된 사전-형성된 항체의 투여(예를 들어, 화학요법제 또는 독소, 종양 항원에 임의적으로 연결된 모노클로날 항체의 투여)에 의해 달성된 숙주의 단기 보호를 위한 수동 면역을 포함할 수 있다. 면역요법은 또한 암 세포주의 세포독성 림프구-인식 에피토프를 사용하는 데 초점을 맞출 수 있다. 대안적으로, 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 리보자임, RNA 간섭 분자, 삼중 나선 폴리뉴클레오타이드 등은 종양 또는 암의 개시, 진행 및/또는 병리와 관련된 생체분자를 선택적으로 조절하는데 사용될 수 있다. 유사하게, 면역요법은 세포-기반 요법의 형태를 취할 수 있다. 예를 들어, 입양 세포 면역요법은 생성된 후 암 환자에 다시 전이되는 환자의 암에 대한 자연 또는 유전자 조작된 반응성을 갖는 면역 세포, 예컨대 T 세포를 사용하는 면역요법의 한 유형이다. 다수의 활성화된 종양-특이적 T 세포의 주사는 암의 완전하고 지속적인 퇴행을 유도할 수 있다.

[0492] 면역요법은 암 항원 또는 질병 항원에 대해 지시된 사전-형성된 항체의 투여(예를 들어, 화학요법제 또는 독소,

종양 항원에 임의적으로 연결된 모노클로날 항체의 투여)에 의해 달성된 숙주의 단기 보호를 위한 수동 면역을 포함할 수 있다. 면역요법은 또한 암 세포주의 세포독성 림프구-인식 에피토프를 사용하는 데 초점을 맞출 수 있다. 대안적으로, 안티센스 폴리뉴클레오티드, 리보자임, RNA 간섭 분자, 삼중 나선 폴리뉴클레오티드 등은 종양 또는 암의 개시, 진행 및/또는 병리와 관련된 생체분자를 선택적으로 조절하는데 사용될 수 있다.

[0493] 일부 구체예에서, 면역치료제는 면역-자극 분자의 효능제; 면역-억제 분자의 길항제; 케모카인의 길항제; T 세포 활성화를 자극하는 사이토카인의 효능제; T 세포 활성화를 억제하는 사이토카인을 길항하거나 억제하는 제제; 및/또는 B7 패밀리의 막 결합 단백질에 결합하는 제제이다. 일부 구체예에서, 면역치료제는 면역-억제 분자의 길항제이다. 일부 구체예에서, 면역치료제는 사이토카인, 케모카인 및 성장 인자, 예를 들어, 종양 관련 사이토카인, 케모카인, 성장 인자 및 IL-10, TGF- β 및 VEGF를 포함하는 다른 가용성 인자의 억제 효과를 중화시키는 중화 항체일 수 있다.

[0494] 일부 구체예에서, 면역요법은 하나 이상의 면역 체크포인트의 억제제를 포함한다. 용어 "면역 체크포인트"는 항암 면역 반응을 조절함으로써, 예컨대, 항-종양 면역 반응을 하향-조절 또는 억제함으로써 면역 반응을 미세 조정하는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 세포 표면 상의 분자 군을 지칭한다. 면역 체크포인트 단백질은 당 분야에 잘 알려져 있으며, 비제한적으로 CTLA-4, PD-1, VISTA, B7-H2, B7-H3, PD-L1, B7-H4, B7-H6, ICOS, HVEM, PD-L2, CD200R, CD160, gp49B, PIR-B, KIRLG-1, KIR 패밀리의 수용체, TIM-1, TIM-3, TIM-4, LAG-3(CD223), IDO, GITR, 4-1BB, OX-40, BTLA, SIRP알파(CD47), CD48, 2B4(CD244), B7.1, B7.2, ILT-2, ILT-4, TIGIT, HHLA2, 부티로필린, 및 A2aR(예를 들어, WO 2012/ 177624 참조)를 포함한다. 상기 용어는 생물학적으로 활성 단백질 단편뿐만 아니라 전장 면역 체크포인트 단백질을 인코딩하는 핵산을 추가로 포함한다.

[0495] 일부 면역 체크포인트는 면역 시스템의 기능(예를 들어, 면역 반응)을 억제, 하향-조절 또는 저지하는 분자(예를 들어, 단백질)를 포함하는 "면역-억제 면역 체크포인트"이다. 예를 들어, CD274 또는 B7-H1로도 알려진 PD-L1(프로그램된 사멸-리간드 1)은 면역 시스템을 억제하기 위해 T 세포의 증식을 감소시키는 억제 신호를 전달하는 단백질이다. CD152로도 알려진 CTLA-4(세포독성 T-림프구-관련 단백질 4)는 면역 반응을 하향조절하기 위해 면역 체크포인트("오프" 스위치)로 작용하는 항원-제시 세포의 표면 상의 단백질 수용체이다. HAVCR2로도 알려진 TIM-3(T-세포 면역글로불린 및 뮤신-도메인 함유-3)은 대식세포 활성화를 조절하기 위한 면역 체크포인트로서 작용하는 세포 표면 단백질이다. VISTA(T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제제)는 T 세포 이펙터 기능을 억제하고 말초 관용을 유지하기 위해 면역 체크포인트로서 기능하는 타입 I 막횡단 단백질이다. LAG-3(림프구-활성화 유전자 3)은 T 세포의 증식, 활성화 및 항상성을 부정적으로 조절하는 면역 체크포인트 수용체이다. BTLA(B-및 T-림프구 감쇠기)는 종양 괴사 단백질 수용체(TNF-R)와의 상호작용을 통해 T 세포 억제를 나타내는 단백질이다. KIR(킬러-세포 면역글로불린-유사 수용체)은 NK 세포, 및 NK 세포의 세포독성 활성을 억제하는 소수의 T 세포 상에서 발현되는 단백질 패밀리아이다. 일부 구체예에서, 면역치료제는 T 세포 및 NK 세포를 억제하는 면역 체크포인트 단백질인 아르기나제(ARG) 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO)의 활성을 차단할 수 있는 억제제와 같은 면역억제 효소에 특이적인 제제일 수 있으며, 이는 면역억제성 종양 미세환경에서 아미노산 아르기닌 및 트립토판의 이화작용을 변화시킨다. 억제제는 비제한적으로, ARG 및 산화질소 신타제(NOS)를 동시에 차단하는 ARG-발현 M2 대식세포, 니트로아스피린 또는 실테나필(Viagra®)을 표적화하는 N-하이드록시-L-Arg(NOHA); 및 IDO 억제제, 예컨대, 1-메틸-트립토판을 포함할 수 있다. 상기 용어는 생물학적으로 활성 단백질 단편뿐만 아니라 전장 면역 체크포인트 단백질을 인코딩하는 핵산 및 이의 생물학적 활성 단백질 단편을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 용어는 본원에 제공된 상동성 설명에 따른 임의의 단편을 추가로 포함한다.

[0496] 대조적으로, 다른 면역 체크포인트는 면역 시스템의 기능(예를 들어, 면역 반응)을 활성화, 자극 또는 촉진하는 분자(예를 들어, 단백질)를 포함하는 "면역-자극"이다. 일부 구체예에서, 면역-자극 분자는 CD28, CD80(B7.1), CD86(B7.2), 4-1BB(CD137), 4-1BBL(CD137L), CD27, CD70, CD40, CD40L, CD122, CD226, CD30, CD30L, OX40, OX40L, HVEM, BTLA, GITR 및 이의 리간드 GITRL, LIGHT, LT β R, LT α β , ICOS(CD278), ICOSL(B7-H2), 및 NKG2D이다. CD40(분화 클러스터 40)은 이들의 활성화에 필요한 항원 제시 세포에서 발견되는 공동자극 단백질이다. 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리의 구성원 4(TNFRSF4) 또는 CD134로도 알려진 OX40은 T-세포 사멸을 방지하고 후속하여 사이토카인 생산을 증가시킴으로써 활성화 후 면역 반응의 유지에 관여한다. CD137은 활성화된 T 세포를 공동-자극하여 증식 및 T 세포 생존을 향상시키는 종양 괴사 인자 수용체(TNF-R) 패밀리의 구성원이다. CD122는 미성숙 T 세포의 조절, 이펙터 또는 기억 T 세포로의 분화를 촉진하는 인터루킨-2 수용체(IL-2) 단백질의 서브유닛이다. CD27은 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리의 구성원이며, 공동-자극 면역 체크포인트 분자로서 작용한다. CD28(분화 클러스터 28)은 T 세포 활성화 및 생존에 필요한 공동-자극 신호를 제공하는 T 세포 상에서 발현되는 단백질이다. TNFRSF18 및 AITR로도 알려진 GITR(글루코코르티코이드-유도된 TNFR-관련 단백질)은

조절 T 세포에 의해 유지되는 우세한 면역학적 자가-관용에서 핵심적인 역할을 하는 단백질이다. CD278로도 알려진 ICOS(유도성 T-세포 공동-자극제)는 활성화된 T 세포에서 발현되고 T 세포 신호전달 및 면역 반응에서 역할을 하는 CD28-슈퍼패밀리 공동자극 분자이다.

[0497]

면역 체크포인트 및 이들의 서열은 당 분야에 널리 공지되어 있으며, 대표적인 구체예가 하기에 추가로 기재된다. 면역 체크포인트는 일반적으로 억제 수용체 및 천연 결합 파트너(예를 들어, 리간드)의 쌍에 관한 것이다. 예를 들어, PD-1 폴리펩티드는 억제 신호를 면역 세포에 전달하여 면역 세포 이펙터 기능을 억제할 수 있거나 예를 들어, 가용성 단량체 형태로 존재하는 경우 면역 세포의 (예를 들어, 경쟁적 억제에 의한) 공동자극을 촉진할 수 있는 억제 수용체이다. 바람직한 PD-1 패밀리를 구성원은 PD-1과 서열 동일성을 공유하고, 하나 이상의 B7 패밀리를 구성원, 예를 들어, B7-1, B7-2, PD-1 리간드, 및/또는 항원 제시 세포 상의 다른 폴리펩티드에 결합한다. 용어 "PD-1 활성"은, 예를 들어, 항원 제시 세포 상의 천연 PD-1 리간드를 결합시킴으로써 활성화된 면역 세포에서 억제 신호를 조절하는 PD-1 폴리펩티드의 능력을 포함한다. 면역 세포에서 억제 신호의 조절은 면역 세포의 증식 및/또는 면역 세포에 의한 사이토카인 분비의 조절을 초래한다. 따라서, 용어 "PD-1 활성"은 PD-1 폴리펩티드가 이의 천연 리간드(들)에 결합하는 능력, 면역 세포 억제 신호를 조절하는 능력, 및 면역 반응을 조절하는 능력을 포함한다. 용어 "PD-1 리간드"는 PD-1 수용체의 결합 파트너를 지칭하며, PD-L1(Freeman 등 (2000) J. Exp. Med. 192:1027-1034) 및 PD-L2(Latchman 등 (2001) Nat. Immunol. 2:261) 둘 모두를 포함한다. 용어 "PD-1 리간드 활성"은 PD-1 리간드 폴리펩티드가 이의 천연 수용체(들)(예를 들어, PD-1 또는 B7-1)에 결합하는 능력, 면역 세포 억제 신호를 조절하는 능력, 및 면역 반응을 조절하는 능력을 포함한다.

[0498]

본원에서 사용되는 용어 "면역 체크포인트 요법"은 이들의 핵산 및/또는 단백질을 억제하는 것과 같은 면역-억제 면역 체크포인트를 억제하는 제제의 사용을 지칭한다. 하나 이상의 이러한 면역 체크포인트의 억제는 억제 신호전달을 차단하거나 달리 중화시켜 암을 보다 효과적으로 치료하기 위해 면역 반응을 상향조절할 수 있다. 면역 체크포인트를 억제하는데 유용한 예시적인 제제는 면역 체크포인트 단백질, 또는 이의 단편에 결합 및/또는 불활성화 또는 억제할 수 있는 항체, 소분자, 펩티드, 펩티드모방체, 천연 리간드, 및 천연 리간드의 유도체; 뿐만 아니라 면역 체크포인트 핵산, 또는 이의 단편의 발현 및/또는 활성을 하향조절할 수 있는 RNA 간섭, 안티센스, 핵산 앵타머 등을 포함한다. 면역 반응을 상향조절하기 위한 예시적인 제제는 단백질과 이의 천연 수용체(들) 사이의 상호작용을 차단하는 하나 이상의 면역 체크포인트 단백질에 대한 항체; 하나 이상의 면역 체크포인트 단백질(예를 들어, 음성 음성 폴리펩티드)의 비-활성화 형태; 하나 이상의 면역 체크포인트 단백질과 이의 천연 수용체(들) 사이의 상호작용을 차단하는 소분자 또는 펩티드; 천연 수용체(들)에 결합하는 융합 단백질(예를 들어, 항체 또는 면역글로불린의 Fc 부분에 융합된 면역 체크포인트 억제 단백질의 세포외 부분); 면역 체크포인트 핵산 전사 또는 번역을 차단하는 핵산 분자; 등을 포함한다. 이러한 제제는 억제 신호전달을 방지하고 면역 반응을 상향조절하기 위해 하나 이상의 면역 체크포인트와 이의 천연 수용체(들)(예를 들어, 항체) 사이의 상호작용을 직접 차단할 수 있다. 대안적으로, 제제는 억제 신호전달을 방지하고 면역 반응을 상향조절하기 위해 하나 이상의 면역 체크포인트 단백질과 이의 천연 수용체(들) 사이의 상호작용을 간접적으로 차단할 수 있다. 예를 들어, 안정화된 세포외 도메인과 같은 면역 체크포인트 단백질 리간드의 가용성 버전은 이의 수용체에 결합하여 적절한 리간드에 결합하는 수용체의 유효 농도를 간접적으로 감소시킬 수 있다. 일 구체예에서, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체 및/또는 항-PD-L2 항체는 단독으로 또는 조합하여 면역 체크포인트를 억제하는데 사용된다. PD-1 경로를 차단하는데 사용되는 치료제는 길항 항체 및 가용성 PD-L1 리간드를 포함한다. PD-1 및 PD-L1/2 억제 경로에 대한 길항제는 PD-1 또는 PD-L1/2에 대한 길항 항체(예를 들어, 17D8, 2D3, 4H1, 5C4(또한 니볼루맵 또는 BMS-936558로서 공지됨), 미국 특허 번호 8,008,449에 개시된 4A11, 7D3 및 5F4; AMP-224, 피달리주맵(CT-011), 펌브롤리주맵 및 미국 특허 번호 8,779,105; 8,552,154; 8,217,149; 8,168,757; 8,008,449; 7,488,802; 7,943,743; 7,635,757; 및 6,808,710에 기재된 항체)를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 유사하게는, 추가의 대표적인 체크포인트 억제제는 억제 조절인자 CTLA-4(항-세포독성 T-림프구 항원 4 항-세포독성 T-림프구 항원 4)에 대한 항체, 예를 들어, 이필리무맵, 트레멜리무맵(완전히 인간화된), 항-CD28 항체, 항-CTLA-4 애드벡틴, 항-CTLA-4 도메인 항체, 단일 사슬 항-CTLA-4 항체 단편, 중쇄 항-CTLA-4 단편, 경쇄 항-CTLA-4 단편, 및 다른 항체, 예를 들어, 미국 특허 번호 8,748,815; 8,529,902; 8,318,916; 8,017,114; 7,744,875; 7,605,238; 7,465,446; 7,109,003; 7,132,281; 6,984,720; 6,682,736; 6,207,156; 및 5,977,318, 뿐만 아니라 EP 특허 번호 1212422, 미국 특허 공개 번호 2002/0039581 및 2002/086014, 및 문헌 [Hurwitz 등 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:10067-10071]에 기재된 것들일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0499]

PD-1, PD-L1, PD-L2 및 CTLA-4에 대해 예시된 면역 체크포인트 활성, 리간드, 차단 등의 대표적인 정의는 일반

적으로 다른 번역 체크포인트에 적용된다.

[0500]

용어 "비표적화된 요법"은 암을 치료하기 위해 선택된 생체분자와 선택적으로 상호작용하지 않는 제제의 투여를 지칭한다. 비표적화 요법의 대표적인 예는 화학요법, 유전자 요법 및 방사선 요법을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0501]

일 구체예에서, 화학요법이 사용된다. 화학요법은 화학요법제의 투여를 포함한다. 이러한 화학요법제는 비제한적으로 하기 화합물의 군으로부터 선택된 것들일 수 있다: 백금 화합물, 세포독성 항생제, 항대사산물, 항-유사분열제, 알킬화제, 비소 화합물, DNA 토포이소머라제 억제제, 타산, 뉴클레오사이드 유사체, 식물 알칼로이드 및 독소; 및 이의 합성 유도체. 예시적인 제제는 비제한적으로, 알킬화제: 질소 머스타드(예를 들어, 사이클로포스파미드, 이포스파미드, 트로포스파미드, 클로람부실, 에스트라무스틴 및 펠팔란), 니트로소우레아(예를 들어, 카르무스틴(BCNU) 및 로무스틴(CCNU)), 알킬설포네이트(예를 들어, 부설판 및 트레오설판), 트리아젠(예를 들어, 다카르바진, 테모졸로미드), 시스플라틴, 트레오설판 및 트로포스파미드; 식물 알칼로이드: 빈블라스틴, 파클리탁셀, 도세탁셀; DNA 토포이소머라제 억제제: 테니포시드, 크리스나톨 및 미토마이신; 항-폴레이트: 메토크세이트, 미코페놀산 및 하이드록시우레아; 피리미딘 유사체: 5-플루오로우라실, 독시플루리딘 및 시토신 아라비노시드; 퓨린 유사체: 머캅토피린 및 티오구아닌; DNA 항대사산물: 2'-데옥시-5-플루오로우리딘, 아피디콜린 글리시네이트 및 피라졸로이미다졸; 및 항유사분열제: 할리콘드린, 콜히친 및 리족신을 포함한다. 유사하게는, 추가적인 예시적 제제는 백금-함유 화합물(예를 들어, 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴), 빈카 알칼로이드(예를 들어, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신 및 비노렐빈), 타코사이드(예를 들어, 파클리탁셀 또는 파클리탁셀 등가물, 예컨대, 나노입자 알부민-결합된 파클리탁셀(ABRAXANE), 도코사헥사엔산 결합-파클리탁셀(DHA-파클리탁셀, 타코프렉신), 폴리글루타메이트 결합-파클리탁셀(PG-파클리탁셀, 파클리탁셀 폴리글루맥스, CT-2103, XYOTAX), 종양-활성화된 프로드럭(TAP) ANG1005(3개의 분자의 파클리탁셀에 결합된 안지오펍-2), 파클리탁셀-EC-1(erbB2-인식 펩티드 EC-1에 결합된 파클리탁셀) 및 글루코스-컨쥬게이션된 파클리탁셀, 예를 들어, 2'-파클리탁셀 메틸 2-글루코피라노실 석시네이트; 도세탁셀, 타술), 에피도도필린(예를 들어, 에토포시드, 에토포시드 포스페이트, 테니포시드, 토포테칸, 9-아미노캄프토테신, 캄프토티리노테칸, 이리노테칸, 크리스나톨, 마이토마이신 C), 항-대사산물, DHFR 억제제(예를 들어, 메토크세이트, 디클로로메토크세이트, 트리메트렉세이트, 에다트렉세이트), IMP 데하이드로게나제 억제제(예를 들어, 미코페놀산, 티아조푸린, 리바비린 및 EICAR), 리보뉴클로티드 리덕타제 억제제(예를 들어, 하이드록시우레아 및 데페록사민), 우라실 유사체(예를 들어, 5-플루오로우라실(5-FU), 플록수리딘, 독시플루리딘, 라티트렉세드, 테가푸르-우라실, 카페시타빈), 시토신 유사체(예를 들어, 시타라빈(ara C), 시토신 아라비노시드 및 플루다라빈), 퓨린 유사체(예를 들어, 머캅토피린 및 티오구아닌), 비타민 D3 유사체(예를 들어, EB 1089, CB 1093 및 KH 1060), 이소프레닐화 억제제(예를 들어, 로바스타틴), 도파민성 신경독(예를 들어, 1-메틸-4-페닐피리디늄 이온), 세포 주기 억제제(예를 들어, 스타우로스포린), 악티노마이신(예를 들어, 악티노마이신 D, 닥티노마이신), 블레오마이신(예를 들어, 블레오마이신 A2, 블레오마이신 B2, 페플로마이신), 안트라사이클린(예를 들어, 다우노루비신, 독소루비신, 페길화된 리포솜 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 피라루비신, 조루비신, 미톡산트론), MDR 억제제(예를 들어, 베라파밀), Ca^{2+} ATP아제 억제제(예를 들어, 탐시가르긴), 이마티닙, 탈리도미드, 레날리도미드, 티로신 키아제 억제제(예를 들어, 악시티닙(AG013736), 보수티닙(SKI-606), 세디라닙(RECENTINTM, AZD2171), 다사티닙(SPRYCEL®, BMS-354825), 에를로티닙(TARCEVA®), 제피티닙(IRESSA®), 이마티닙(Gleevec®, CGP57148B, STI-571), 라파티닙(TYKERB®, TYVERB®), 레스타우르티닙(CEP-701), 네라티닙(HKI-272), 닐로티닙(TASIGNA®), 세막사닙(세막시닙, SU5416), 수니티닙(SUTENT®, SU11248), 토세라닙(PALLADIA®), 반데타닙(ZACTIMA®, ZD6474), 바탈라닙(PTK787, PTK/ZK), 트라스투주맵(HERCEPTIN®), 베바시주맵(AVASTIN®), 리툽시맵(RITUXAN®), 세툽시맵(ERBITUX®), 파니투주맵(VECTIBIX®), 라니비주맵(Lucentis®), 닐로티닙(TASIGNA®), 소라페닙(NEXAVAR®), 에베롤리무스(AFINITOR®), 알렘투주맵(CAMPATH®), 켐투주맵 오조가미신(MYLOTARG®), 템시롤리무스(TORISEL®), ENMD-2076, PCI-32765, AC220, 도비티닙 락테이트(TKI258, CHIR-258), BIBW 2992(TOVOKTM), SGX523, PF-04217903, PF-02341066, PF-299804, BMS-777607, ABT-869, MP470, BIBF 1120(VARGATEF®), AP24534, JNJ-26483327, MGCD265, DCC-2036, BMS-690154, CEP-11981, 티보자닙(AV-951), OSI-930, MM-121, XL-184, XL-647 및/또는 XL228), 프로테아좀 억제제(예를 들어, 보르테조미드(VELCADE®)), mTOR 억제제(예를 들어, 라파마이신, 템시롤리무스(CCI-779), 에베롤리무스(RAD-001), 리다포롤리무스, AP23573(Ariad), AZD8055 (AstraZeneca), BEZ235 (Novartis), BGT226 (Novartis), XL765 (Sanofi Aventis), PF-4691502 (Pfizer), GDC0980 (Genentech), SF1126 (Semafoe) 및 OSI-027 (OSI)), 오블리머센, 켐시타빈, 카르미노마이신, 류코보린, 페메트렉세드, 사이클로포스파미드, 다카르바진, 프로카르비진, 프레드니솔론,

텍사메타손, 캄파테신, 플리카마이신, 아스파라기나제, 아미노프테린, 메토프테린, 포르피로마이신, 멜팔란, 류로시딘, 류로신, 클로르암부실, 트라벡테딘, 프로카르바진, 디스코더몰리드, 카르미노마이신, 아미노프테린 및 헥사메틸 멜라민을 포함한다. 하나 이상의 화학요법제(예를 들어, FLAG, CHOP)를 포함하는 조성물이 또한 사용될 수 있다. FLAG는 플루다라빈, 시토신 아라비노시드(Ara-C) 및 G-CSF를 포함한다. CHOP는 사이클로포스파미드, 빈크리스틴, 독소루비신 및 프레드니손을 포함한다. 또 다른 구체예에서, PARP(예를 들어, PARP-1 및/또는 PARP-2) 억제제가 사용되고, 이러한 억제제는 당 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, Olaparib, ABT-888, BSI-201, BGP-15(N- Gene Research Laboratories, Inc.); INO-1001(Inotek Pharmaceuticals Inc.); PJ34(Soriano 등, 2001; Pacher 등, 2002b); 3-아미노벤즈아미드(Trevigen); 4-아미노-1,8- 나프탈이미드; (Trevigen); 6(5H)-페난트리딘 (Trevigen); 벤즈아미드 (미국 특허 Re. 36,397); 및 NU1025 (Bowman 등). 작용 기전은 일반적으로 PARP에 결합하여 이의 활성을 감소시키는 PARP 억제제의 능력과 관련이 있다. PARP는 베타-니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD+)의 니코틴아미드 및 폴리-ADP-리보스(PAR)로의 전환을 촉매화한다. 폴리(ADP-리보스) 및 PAR 둘 모두는 전사, 세포 증식, 게놈 안정성 및 발암의 조절과 관련이 있다(Bouchard et.al. (2003) Exp. Hematol. 31:446-454); Herceg (2001) Mut. Res. 477:97-110). 폴리(ADP-리보스) 폴리머라제 1(PARP1)은 DNA 단일-가닥 파손(SSB)의 수복에서 핵심 분자이다(de Murcia J. 등 (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:7303 -7307; Schreiber 등 (2006) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7:517-528; Wang 등 (1997) Genes Dev. 11:2347-2358). PARP1 기능의 억제에 의한 SSB 수복의 늦아옴은 결합 있는 상동성-지시된 DSB 수복을 갖는 암 세포에서 합성 치사를 유발할 수 있는 DNA 이중-가닥 파손(DSB)을 유도한다(Bryant 등 (2005) Nature 434:913-917; Farmer 등 (2005) Nature 434:917-921). 화학요법제의 전술한 예는 예시적인 것이며 제한하려는 것이 아니다.

[0502] 또 다른 구체예에서, 방사선 요법이 사용된다. 방사선 요법에 사용되는 방사선은 이온화 방사선일 수 있다. 방사선 요법은 또한 감마선, X-선 또는 양성자 빔일 수 있다. 방사선 요법의 예는 비제한적으로, 외부-빔 방사선 요법, 방사성 동위원소(I-125, 팔라듐, 이리듐)의 간질 이식, 스트론튬-89와 같은 방사성 동위원소, 흉부 방사선 요법, 복강내 P-32 방사선 요법, 및/또는 전체 복부 및 골반 방사선 요법을 포함한다. 방사선 요법의 일반적인 개요는 문헌[Hellman, Chapter 16: Principles of Cancer Management: Radiation Therapy, 6th edition, 2001, DeVita 등, eds., J.B. Lippencott Company, Philadelphia]을 참조한다. 방사선 요법은 외부 빔 방사선 또는 원격요법으로서 투여될 수 있고, 여기서 방사선은 원격 소스로부터 지향된다. 방사선 치료는 또한 내부 요법 또는 근접요법으로서 투여될 수 있으며, 여기서 방사성 공급원은 암 세포 또는 종양 덩어리에 가깝게 체내에 배치된다. 또한, 감광제, 예컨대, 헤마토포르핀 및 이의 유도체, 베르토포르핀(Vertoporphin)(BPD-MA), 프탈로시아닌, 감광제 Pc4, 데메톡시-하이포크렐린 A; 및 2BA-2-DMHA의 투여를 포함하는 광역동 요법의 사용이 또한 포함된다.

[0503] 또 다른 구체예에서, 호르몬 요법이 사용된다. 호르몬 치료학적 치료는 예를 들어, 호르몬 효능제, 호르몬 길항제(예를 들어, 플루타미드, 비칼루타미드, 타목시펜, 랄록시펜, 류프롤리드 아세테이트(LUPRON), LH-RH 길항제), 호르몬 생합성 및 프로세싱의 억제제, 및 스테로이드(예를 들어, 텍사메타손, 레티노이드, 델타이드, 베타메타손, 코르티솔, 코르티손, 프레드니손, 데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 미네랄로코르티코이드, 에스트로겐, 테스토스테론, 프로게스틴), 비타민 A 유도체(예를 들어, 올-트랜스 레티노산(ATRA)); 비타민 D3 유사체; 항게스타젠(예를 들어, 미페프리스톤, 오나프리스톤), 또는 항안드로겐(예를 들어, 사이프로테론 아세테이트)을 포함할 수 있다.

[0504] 일 양태에서, 대상체에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 방법은 본원에 기재된 약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 약학적 조성물은 대상체에게 투여될 때, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유발한다.

[0505] 일부 구체예에서, 면역 반응은 세포-매개 면역 반응을 포함할 수 있다. 세포 면역 반응은 T 세포를 포함하는 반응이며, 시험관내, 생체의 또는 생체내에서 결정될 수 있다. 예를 들어, 일반적인 세포 면역 반응은 약학적 조성물의 투여 후 적절한 시간에 대상체로부터 샘플링된 세포(예를 들어, 말초 혈액 백혈구(PBL))에서의 T 세포 증식 활성으로서 결정될 수 있다. 적절한 기간 동안 자극제와 함께, 예를 들어, PBMC의 인큐베이션 후, [³H]티미딘 혼입이 결정될 수 있다. 증식하는 T 세포의 서브세트는 유세포 분석을 사용하여 결정될 수 있다.

[0506] 본 발명에 포함되는 또 다른 양태에서, 본원에 제공된 방법은 상기 기재된 바와 같은 인간 및 비인간 포유동물들 모두에 투여하는 것을 포함한다. 수의학적 적용이 또한 고려된다. 일부 구체예에서, 대상체는 면역 반응이 유도될 수 있는 임의의 살아있는 유기체일 수 있다.

- [0507] 일부 구체예에서, 약학적 조성물은 적절한 임의의 시간에 투여될 수 있다. 예를 들어, 투여는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발을 갖는 대상체의 치료 전 또는 치료 동안 수행될 수 있고, 임상적으로 검출불가능해지는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발 후에 연속될 수 있다. 투여는 또한 재발의 징후를 나타내는 대상체에서 계속될 수 있다.
- [0508] 일부 구체예에서, 약학적 조성물은 치료적 또는 예방적 유효량으로 투여될 수 있다. 대상체에게 약학적 조성물을 투여하는 것은 공지된 절차를 이용하여, 원하는 효과를 달성하기에 충분한 용량 및 기간 동안 수행될 수 있다.
- [0509] 일부 구체예에서, 약학적 조성물은 임의의 적절한 부위에서 대상체에게 투여될 수 있다. 투여는 당 분야에 일반적으로 공지된 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 세포를 포함하는 제제는 직접 주사에 의해, 또는 비제한적으로, 혈관내, 뇌내, 비경구, 복강내, 정맥내, 경막외, 척수내, 흉골내, 관절내, 활액내, 척수강내, 동맥내, 심장내 또는 근육내 투여를 포함하는 당 분야에서 사용되는 임의의 다른 수단에 의해 요망되는 부위에 도입될 수 있다. 예를 들어, 관심 대상체는 다양한 경로에 의해 이식된 세포로 생착될 수 있다. 이러한 경로는 비제한적으로, 정맥내 투여, 피하 투여, 특정 조직으로의 투여(예를 들어, 국소 이식), 대퇴골 골수강으로의 주사, 비장으로의 주사, 태아 간의 심피막하 투여, 및 등을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명에 포함되는 암 백신은 대상체에게 종양내 또는 피하 주사된다. 세포는 1회 주입으로, 또는 요망되는 효과를 발생시키기에 충분한 규정된 기간에 걸쳐 연속 주입을 통해 투여될 수 있다. 이식된 세포의 이식, 생착 평가 및 마커 표현형 분석을 위한 예시적인 방법은 당 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Pearson 등 (2008) *Curr. Protoc. Immunol.* 81:15.21.1-15.21.21; Ito 등 (2002) *Blood* 100:3175-3182; Traggiai 등 (2004) *Science* 304:104-107; Ishikawa 등 *Blood* (2005) 106:1565-1573; Shultz 등(2005) *J. Immunol.* 174:6477-6489; and Holyoake 등 (1999) *Exp. Hematol.* 27:1418-1427] 참조). 일부 구체예에서, 용량은 원하는 반응을 일으키는데 효과적인 양과 기간 동안 투여될 수 있으며, 이는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현 및/또는 이와 관련된 증상을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애, 또는 과증식성 장애의 재발의 면역 반응 또는 예방학적 또는 치료학적 치료를 유발한다.
- [0510] 약학적 조성물은 대상체에서 면역 반응을 또한 유발하는 요법을 포함하는 다른 요법에 이어서, 이전에, 또는 이와 동시에 제공될 수 있다. 예를 들어, 대상체는 다른 형태의 면역조절제에 의해 이전에 또는 동시에 치료될 수 있고, 이러한 다른 요법은 본원에 기재된 조성물의 면역원성을 방해하지 않는 방식으로 제공될 수 있다.
- [0511] 투여는 간병인(예를 들어, 의사, 수의사)에 의해 적절하게 신간 선택될 수 있고, 대상체의 임상 상태, 투여의 목적 및/또는 또한 고려되거나 투여되는 다른 요법에 의존적일 수 있다. 일부 구체예에서, 초기 용량이 투여될 수 있고, 대상체는 면역학적 및/또는 임상적 반응에 대해 모니터링된다. 면역학적 모니터링의 적합한 수단은 반응자로서 환자의 말초 혈액 림프구(PBL) 및 자극제로서 본원에 기재된 면역원성 펩티드 또는 펩티드-MHC 복합체를 사용하는 것을 포함한다. 면역학적 반응은 또한 투여 부위에서 지연된 염증 반응에 의해 결정될 수 있다. 초기 용량에 후속하는 하나 이상의 용량은 요망되는 효과가 달성될 때까지 전형적으로 매일, 반개월 또는 매주 기준으로 적절하게 제공될 수 있다. 그 후, 특히 면역학적 또는 임상적 이점이 가라앉는 것으로 보이는 경우, 추가 부스터 또는 유지 용량이 필요에 따라 제공될 수 있다.
- [0512] 일반적으로, 적절한 투여량 및 치료 요법은 이점을 제공하기에 충분한 양으로 활성 분자 또는 세포를 제공한다. 이러한 반응은 치료되지 않은 대상체와 비교하여 치료된 대상체에서 개선된 임상 결과(예를 들어, 더 빈번한 관해, 완전한 또는 부분적인, 또는 더 긴 무병 생존)를 확립함으로써 모니터링될 수 있다. 바이러스 단백질에 대한 기존의 면역 반응의 증가는 일반적으로 개선된 임상 결과와 상관관계가 있다. 이러한 면역 반응은 일반적으로 관련적인 일상적인 표준 증식, 세포독성 또는 사이토카인 검정을 사용하여 평가될 수 있다.
- [0513] 예방적 사용을 위해, 용량은 질병 또는 장애와 관련된 질병을 예방하거나, 발병을 지연시키거나, 중증도를 감소시키기에 충분해야 한다. 본원에 기재된 방법에 따라 투여되는 면역원성 조성물의 예방적 이점은 전임상(시험관내, 생체 및 생체내 동물 연구 포함) 및 임상 연구를 수행하고 이로부터 수득된 데이터를 적절한 통계적, 생물학적 및 임상 방법 및 기술에 의해 분석함으로써 결정될 수 있으며, 상기 기술은 당업자에 의해 용이하게 실시될 수 있다.
- [0514] 본원에서 사용되는 바와 같이, 조성물의 투여는 전달 경로 또는 방식에 관계없이 이를 대상체에게 전달하는 것을 지칭한다. 투여는 연속적으로 또는 간헐적으로, 및 비경구적으로 수행될 수 있다. 투여는 인지된 병태, 질병

또는 질병 상태를 갖는 것으로 이미 확인된 대상체를 치료하기 위한 것일 수 있거나, 이러한 병태, 질병 또는 질병 상태에 걸리기 쉽거나 발병할 위험이 있는 대상체를 치료하기 위한 것일 수 있다. 보조 요법과의 공동-투여는 임의의 순서 및 임의의 투여 스케줄로 다중 제제의 동시 및/또는 순차적 전달(예를 들어, 하나 이상의 사이토카인을 갖는 조작된 면역 세포; 칼시뉴린 억제제, 코르티코스테로이드, 미세소관 억제제, 저용량의 미코페놀산 프로드럭, 또는 이들의 임의의 조합과 같은 면역억제 요법)을 포함할 수 있다.

[0515] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 복수의 용량의 숙주 세포(예를 들어, 조작된 면역 세포)가 대상체에게 투여되고, 이는 약 2 내지 약 4주의 투여 사이의 간격을 두고 투여될 수 있다.

[0516] 본 발명에 포함되는 치료 또는 예방 방법은 바로 개시된 단위 용량, 세포 또는 조성물의 투여 전 또는 후에 추가 치료를 포함할 수 있는 치료 과정 또는 요법의 일부로서 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 단위 용량의 숙주 세포(예를 들어, 조작된 면역 세포)를 받은 대상체는 조혈 세포 이식(HCT; 골수과피 및 비골수과피 HCT 포함)을 받고 있거나 이전에 받은 적이 있다. 임의의 전술한 구체예에서, HCT에 사용되는 조혈 세포는 "범용 공여자" 세포일 수 있으며, 이는 (예를 들어, 본원에 기재된 방법에 따른 염색체 유전자 녹아웃에 의해) MHC, 항원, 및 결합 단백질로부터 선택되는 폴리펩티드 생성물을 인코딩하는 하나 이상의 내인성 유전자의 발현을 감소시키거나 제거하도록 변형된다.

[0517] 세포 이식을 수행하기 위한 기술 및 요법은 당 분야에 공지되어 있으며, 임의의 적합한 공여자 세포, 예를 들어, 제대혈, 골수 또는 말초 혈액으로부터 유래된 세포, 조혈 줄기 세포, 동원된 줄기 세포, 또는 양수로부터의 세포의 이식을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 본 발명에 포함되는 숙주 세포(예를 들어, 조작된 면역 세포)는 줄기 세포 요법과 함께 또는 그 직후에 투여될 수 있다.

[0518] 본 발명에 포함되는 방법은, 일부 구체예에서, 조합 요법에서 질환 또는 장애(예를 들어, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애, 또는 과증식성 장애의 재발)를 치료하기 위해 하나 이상의 추가 제제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 조합 요법은 본 발명에 포함되는 숙주 세포 또는 결합 단백질을 항바이러스제와 (함께, 동시에 또는 순차적으로) 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 조합 요법은 로피나비르/리토나비르, 클로로퀸, 리바비린, 스테로이드 약물, 하이드록시클로로퀸, 및/또는 인터페론 α와 본 발명에 포함되는 숙주 세포 또는 결합 단백질을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 조합 요법은 본 발명에 포함되는 숙주 세포, 조성물, 또는 단위 용량의 숙주 세포를 2차 요법, 예컨대, 수술, 항체, 백신, 또는 이들의 임의의 조합과 함께 투여하는 것을 포함한다.

[0519] 일부 구체예에서, 대상체는 인간, 예컨대, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발을 갖는 인간이다. 일부 구체예에서, 대상체는 마우스와 같은 설치류이다. 이러한 일부 구체예에서, 마우스는 유전자전이 마우스, 예를 들어, 인간 MHC(즉, HLA) 분자 예컨대, HLA-A2를 발현하는 마우스이다(예를 들어, Nicholson 등 (2012) *Adv. Hematol.* 2012:404081).

[0520] 일부 구체예에서, 대상체는 인간 TCR을 발현하는 유전자전이 마우스 또는 항원-음성 마우스이다(예를 들어, Li 등 (2010) *Nat. Med.* 16:1029-1034 and Obenaus 등 (2015) *Nat. Biotechnol.* 33:402-407). 일부 구체예에서, 대상체는 인간 HLA 분자 및 인간 TCR을 발현하는 유전자전이 마우스이다.

[0521] 일부 구체예에서, 예를 들어, 대상체가 유전자전이 HLA 마우스인 경우, 확인된 TCR은, 예를 들어, 키메라 또는 인간화되도록 변형된다. 일부 구체예에서, TCR 스캐폴드는, 예를 들어, 공지된 결합 단백질 인간화 방법과 유사하게 변형된다.

[0522] c. 스크리닝 방법

[0523] 본 발명에 포함되는 또 다른 양태는 스크리닝 검정을 포함한다.

[0524] 본 발명은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 또는 이의 항원에 결합하거나 이의 활성을 조절하는 시험 단백질과 같은 스크리닝 제제에 대한 검정을 포함한다. 이러한 제제는 비제한적으로 항체, 단백질, 융합 단백질, 소분자 및 핵산을 포함한다. 일부 구체예에서, 면역 반응을 조절하는 제제를 확인하기 위한 방법은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 활성을 조절하고 관심 면역 반응, 예컨대, 조절된 세포독성 T 세포 활성화 및/또는 활성, 면역 체크포인트 요법에 대한 암 세포의 민감성 등을 추가로 조절하는 후보 제제의 능력을 결정하는 것을 포함한다.

[0525] 일부 구체예에서, 검정은 표적을 시험 제제와 접촉시키고, 예컨대 하기 기술된 바와 같이 직접 또는 간접 파라미터를 측정함으로써 표적의 양 및/또는 활성을 조절(예를 들어, 상향조절 또는 하향조절)하는 시험 제제의 능

력을 결정하는 것을 포함하는 무세포 또는 세포-기반 검정이다.

- [0526] 일부 구체예에서, 검정은 세포-기반 검정, 예를 들어, (a) 관심 세포를 시험 제제와 접촉시키고, 결합 특성과 같은 상기 표적의 양 및/또는 활성을 조절하는 시험 제제의 능력을 결정하는 것을 포함하는 검정이다. 서로 결합하거나 상호작용하는 폴리펩티드의 능력을 결정하는 것은, 예를 들어, 직접 결합을 측정하거나 면역 세포 활성화 또는 기능의 파라미터를 측정함으로써 달성될 수 있다.
- [0527] 또 다른 구체예에서, 검정은 세포, 예컨대, 암 세포를 면역 세포(예를 들어, 세포독성 T 세포) 및 시험 제제와 접촉시키고, 예컨대, 하기 기재된 바와 같은 직접 또는 간접 파라미터를 측정함으로써 표적의 양 및/또는 활성 및/또는 조절된 면역 반응을 조절하는 시험 제제의 능력을 결정하는 것을 포함하는 세포-기반 검정이다.
- [0528] 상기 및 본원에 기재된 방법은 또한 본원에 기재된 하나 이상의 바이오마커의 양 및/또는 활성을 조절하는 것으로 이미 공지된 하나 이상의 제제를 시험하여 하나 이상의 바이오마커의 조절을 확인하고/하거나 조절된 면역 반응, 면역 체크포인트 차단에 대한 민감성 등과 같은 요망되는 표현형의 관독에 대한 제제의 효과를 확인하도록 채택될 수 있다.
- [0529] 일부 구체예에서, 주어진 폴리펩티드 세트 사이의 상호작용을 조절하는 시험 제제(예를 들어, 항체, 융합 단백질, 펩티드 또는 소분자)의 능력을 결정하는 것은 폴리펩티드 세트의 하나 이상의 구성원의 활성을 결정함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 단백질 및/또는 하나 이상의 결합 파트너의 활성은 세포 제2 메신저(예를 들어, 세포내 신호전달)의 유도를 검출하거나, 적절한 기질의 촉매/효소 활성을 검출하거나, 리포터 유전자(검출 가능한 마커, 예를 들어, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제를 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 표적-반응성 조절 요소를 포함함)의 유도를 검출하거나, 단백질 및/또는 하나 이상의 결합 파트너에 의해 조절된 세포 반응을 검출함으로써 결정될 수 있다. 상기 폴리펩티드에 결합하거나 이와 상호작용하는 시험 제제의 능력을 결정하는 것은, 예를 들어, 증식 검정에서 면역 세포 공동자극 또는 억제에 조절하는 화합물의 능력을 측정함으로써, 또는 상기 폴리펩티드가 이의 일부를 인식하는 항체에 결합하는 능력을 방해함으로써 달성될 수 있다.
- [0530] 표적 양 및/또는 활성, 예컨대, 하나 이상의 결합 파트너와의 상호작용을 조절하는 제제는 시험관내 검정에 첨가되는 경우 면역 세포 증식 및/또는 이펙터 기능을 억제하거나, 비활동성, 클론 결실 및/또는 고갈을 유도하는 이들의 능력에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 세포는 활성화 수용체를 통해 신호 전달 변환을 자극하는 제제의 존재 하에 배양될 수 있다. 세포 활성화의 다수의 인지된 관독이 제제의 존재 하에 세포 증식 또는 이펙터 기능(예를 들어, 항체 생산, 사이토카인 생산, 포식작용)을 측정하는데 사용될 수 있다. 이러한 활성화를 차단하는 시험 제제의 능력은 당 분야에 공지된 기술을 사용하여 측정되는 증식 또는 이펙터 기능의 감소에 영향을 미치는 제제의 능력을 측정함으로써 용이하게 결정될 수 있다.
- [0531] 예를 들어, 본 발명에 포함되는 제제는 문헌[Freeman 등 (2000) *J. Exp. Med.* 192:1027 and Latchman 등 (2001) *Nat. Immunol.* 2:261]에 기술된 바와 같이 T 세포 검정에서 동시자극을 억제하거나 향상시키는 능력에 대해 시험될 수 있다. CD4⁺ T 세포는 인간 PBMC로부터 분리되고 항-CD3 항체 활성화로 자극될 수 있다. T 세포의 증식은 ³H 티미딘 혼입에 의해 측정될 수 있다. 검정은 검정에서 CD28 공동자극의 존재 또는 부재하에 수행될 수 있다. Jurkat T 세포 및 PBMC로부터의 PHA-모세포로 유사한 검정을 수행할 수 있다.
- [0532] 대안적으로, 본 발명에 포함되는 제제는 하나 이상의 바이오마커의 조절에 반응하여 면역 세포에서 생산되거나 생산이 향상되거나 억제되는 사이토카인의 세포 생산을 조절하는 능력에 대해 시험될 수 있다. 관심 면역 세포에 의해 방출되는 지표 사이토카인은 ELISA에 의해 또는 사이토카인에 의해 유도되는 면역 세포 증식 또는 다른 세포 유형, 예컨대, 실시예 섹션에 기재된 것들의 증식을 억제하는 사이토카인을 차단하는 항체의 능력에 의해 확인될 수 있다. 시험관내 면역 세포 공동자극 검정은 또한 하나 이상의 바이오마커의 조절에 의해 조절될 수 있는 사이토카인을 확인하기 위한 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 공동자극시 유도된 특정 활성, 예를 들어, 면역 세포 증식이 공지된 사이토카인에 대한 차단 항체의 첨가에 의해 억제될 수 없는 경우, 활성은 미지의 사이토카인의 작용으로부터 발생할 수 있다. 공동자극 후, 이 사이토카인은 통상적인 방법에 의해 배지로부터 정제될 수 있고 이의 활성은 면역 세포 증식을 유도하는 이의 능력에 의해 측정될 수 있다. 관용의 유도 역할을 할 수 있는 사이토카인을 확인하기 위해, 상기 기재된 바와 같은 시험관내 T 세포 공동자극 검정이 사용될 수 있다. 이 경우, T 세포에는 일차 활성화 신호가 제공되고 선택된 사이토카인과 접촉되지만, 공동자극 신호는 제공되지 않을 것이다. 면역 세포를 세정하고 휴지시킨 후, 세포는 일차 활성화 신호 및 공동자극 신호 둘 모두로 재도전될 것이다. 면역 세포가 반응(예를 들어, 사이토카인을 증식시키거나 생산)하지 않은 경우, 이들은 내성이 된 것이고 사이토카인은 내성의 유도를 방지하지 못하였다. 그러나, 면역 세포가 반응하는 경우, 관용의 유도는 사이토카인에 의해 방지되었다. 관용의 유도를 방지할 수 있는 사이토카인은 이식 수용자 또는 자가면역

질환을 갖는 대상체에서 관용을 유도하기 위한 보다 효율적인 수단으로서 B 림프구 항원을 차단하는 시약과 함께 생체내 차단을 위해 표적화될 수 있다.

[0533] 일부 구체예에서, 본 발명에 포함되는 검정은 바이오마커 및/또는 하나 이상의 결합 파트너 간의 상호작용을 조절하는 제제를 스크리닝하기 위한 세포 비함유 검정으로서, 폴리펩티드 및 하나 이상의 천연 결합 파트너 또는 이의 생물학적 활성 부분을 시험 제제와 접촉시키고, 폴리펩티드와 하나 이상의 천연 결합 파트너 또는 이의 생물학적 활성 부분의 상호작용을 조절하는 시험 화합물의 능력을 결정하는 것을 포함하는 검정이다. 시험 화합물의 결합은 상기 기재된 바와 같이 직접적으로 또는 간접적으로 결정될 수 있다. 일 구체예에서, 검정은 폴리펩티드 또는 이의 생물학적 활성 부분을 이의 결합 파트너와 접촉시켜 검정 혼합물을 형성하는 단계, 검정 혼합물을 시험 화합물과 접촉시키는 단계, 및 검정 혼합물 중 폴리펩티드와 상호작용하는 시험 제제의 능력을 결정하는 단계를 포함하며; 폴리펩티드와 상호작용하는 시험 제제의 능력을 결정하는 것은 결합 파트너와 비교하여 폴리펩티드 또는 이의 생물학적 활성 단편에 우선적으로 결합하는 시험 제제의 능력을 결정하는 것을 포함한다.

[0534] 일부 구체예에서, 세포-기반 검정이든 무세포 검정이든, 시험 제제는 추가로 이것이 폴리펩티드 및 하나 이상의 결합 파트너와 다른 결합 파트너 사이의 결합 및/또는 상호작용의 활성화에 영향을 미치는지의 여부를 결정하기 위해 추가로 검정될 수 있다. 다른 유용한 결합 분석 방법은 실시간 생체분자 상호작용 분석(BIA)의 사용을 포함한다(Sjolander and Urbaniczky (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345 and Szabo 등 (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). 본원에서 사용되는 바와 같은 "BIA"는 임의의 상호작용제(예를 들어, Biacore®)를 표지화하지 않고 실시간으로 생물특이적 상호작용을 연구하기 위한 기술이다. 표면 플라즈몬 공명(SPR)의 광학 현상의 변화는 생물학적 폴리펩티드 사이의 실시간 반응의 지표로서 사용될 수 있다. 관심 폴리펩티드는 Biacore® 칩에 고정될 수 있고, 다수의 제제(차단 항체, 융합 단백질, 펩티드 또는 소분자)는 관심 폴리펩티드에 대한 결합에 대해 시험될 수 있다. BIA 기술을 사용하는 예는 문헌 [Fitz 등 (1997) *Oncogene* 15:613]에 기술되어 있다.

[0535] 본 발명에 포함되는 무세포 검정은 가용성 및/또는 막-결합 형태의 단백질 둘 모두를 사용할 수 있다. 막-결합된 형태의 단백질이 사용되는 무세포 검정의 경우, 막-결합된 형태의 단백질이 용액에서 유지되도록 가용화제를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 가용화제의 예는 비이온성 세정제, 예컨대, n-옥틸글루코시드, n-도데실글루코시드, n-도데실말토시드, 옥타노일-N-메틸글루카미드, 데카노일-N-메틸글루카미드, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, 이소트리데사이폴리(에틸렌 글리콜 에테르)_n, 3-[(3-콜아미도프로필)디메틸암미니오]-1-프로판 설포네이트(CHAPS), 3-[(3-콜아미도프로필)디메틸암미니오]-2-하이드록시-1-프로판 설포네이트(CHAPSO) 또는 N-도데실=N,N-디메틸-3-암모니오-1-프로판 설포네이트를 포함한다.

[0536] 상기 기재된 검정 방법의 하나 이상의 구체예에서, 단백질의 하나 또는 둘 모두의 복합체화되지 않은 형태로부터 복합체의 분리를 용이하게 할 뿐만 아니라 검정의 자동화를 수용하기 위해 어느 하나의 폴리펩티드를 고정시키는 것이 바람직할 수 있다. 폴리펩티드에 대한 시험 화합물의 결합은 반응물을 함유하기에 적합한 임의의 용기에서 달성될 수 있다. 이러한 용기의 예는 미세역가 플레이트, 시험관 및 미세-원심분리 튜브를 포함한다. 일 구체예에서, 단백질 중 하나 또는 둘 모두가 매트릭스에 결합되도록 하는 도메인을 부가하는 융합 단백질이 제공될 수 있다. 예를 들어, 글루타티온-S-트랜스퍼라제-기반 폴리펩티드 융합 단백질, 또는 글루타티온-S-트랜스퍼라제/표적 융합 단백질은 글루타티온 세파로스 비드(Sigma Chemical, St. Louis, MO) 또는 글루타티온 유도체화된 미세역가 플레이트 상에 흡착될 수 있으며, 그 후, 시험 화합물과 조합되고, 혼합물을 복합체 형성에 도움이 되는 조건 하에(예를 들어, 염 및 pH에 대한 생리학적 조건에서) 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 비드 또는 미세역가 플레이트 웰을 세정하여 임의의 결합되지 않은 성분을 제거하고, 비드의 경우 매트릭스를 고정시키고, 예를 들어, 상기 기재된 바와 같이 복합체를 직접 또는 간접적으로 결정한다. 대안적으로, 복합체는 매트릭스로부터 해리될 수 있고, 폴리펩티드 결합 또는 활성의 수준은 표준 기술을 사용하여 결정될 수 있다.

[0537] 본 발명은 추가로 상기 기재된 스크리닝 검정에 의해 확인된 신규한 제제에 관한 것이다. 따라서, 적절한 모델 시스템에서 본원에 기재된 바와 같이 확인된 제제를 추가로 사용하는 것은 본 발명의 범위 내에 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 확인된 제제는 이러한 제제로의 치료의 효능, 독성 또는 부작용을 결정하기 위한 모델 시스템에서 사용될 수 있다. 대안적으로, 본원에 기재된 바와 같이 확인된 제제는 이러한 제제의 작용 기전을 결정하기 위한 모델 시스템에서 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 치료를 위한 상기 기재된 스크리닝 검정에 의해 확인된 신규한 제제의 용도에 관한 것이다.

[0538] d. 임상 시험 중 효과의 모니터링

- [0539] T 세포 반응성(예를 들어, 결합 및/또는 T 세포 활성화 및/또는 이펙터 기능의 존재)과 같은, 면역 반응에 대한 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발 요법(예를 들어, 화합물, 약물, 백신, 세포 요법 등)의 영향을 모니터링하는 것은 기본 후보 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원 결합 분자 스크리닝 뿐만 아니라 임상 시험에도 적용될 수 있다. HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 관심 세포, 예컨대, 과증식성 세포에 대한 면역 반응(예를 들어, T 세포 면역 반응)을 증가시키기 위한 본원에 기재된 결합 단백질 및 관련 조성물, 예컨대, 핵산, 숙주 세포, 약학적 제형 등의 효과는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발을 앓고 있는 대상체의 임상 시험에서 모니터링될 수 있다. 이러한 임상 시험에서, 결합 및/또는 T 세포 활성화 및/또는 이펙터 기능(예를 들어, T 세포 증식, 사멸 및/또는 사이토카인 방출)의 존재는 특정 세포, 조직 또는 시스템의 표현형의 "판독" 또는 마커로서 사용될 수 있다. 유사하게, 관심 세포, 예컨대 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 과증식성 세포에 대한 면역 반응을 증가시키기 위해 본원에 기재된 바와 같은 결합 단백질(예를 들어, TCR, TCR의 항원-결합 단편, CAR 또는 TCR과 이펙터 도메인을 포함하는 융합 단백질)을 발현하도록 조작된 T 세포를 이용한 적응 T 세포 요법의 효과는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발을 앓는 대상체의 임상 시험에서 모니터링될 수 있다. 이러한 임상 시험에서, 결합 및/또는 T 세포 활성화 및/또는 이펙터 기능(예를 들어, T 세포 증식, 사멸, 또는 사이토카인 방출)의 존재는 특정 세포, 조직 또는 시스템의 표현형의 "판독" 또는 마커로서 사용될 수 있다.
- [0540] 예를 들어, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발 요법의 증가된 투여는 대상체로부터 수득된 샘플과 하나 이상의 결합 단백질 또는 관련 조성물 간의 반응성의 존재 또는 수준을 증가시키는데, 예컨대 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발 요법의 효과를 증가시키는데 바람직할 수 있다. 이러한 구체예에 따르면, 대상체로부터 수득된 샘플과 하나 이상의 결합 단백질 또는 관련 조성물 간의 반응성의 존재 또는 수준은 관찰 가능한 표현형 반응의 부재하에서도 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발 요법의 효과의 지표로서 사용될 수 있다. 유사하게는, 예컨대, 직접 결합 검정, 형광 활성화 세포 분류(FACS), 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사면역 검정(RIA), 면역화학, 웨스턴 블롯, 또는 세포내 유동 검정에 의한 대상체로부터 수득된 샘플과 하나 이상의 결합 단백질 또는 관련 조성물 간의 반응성의 존재 또는 수준의 분석은 또한 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발 요법을 받을 환자를 선택하는데 또한 사용될 수 있다.
- [0541] 예를 들어, 직접 결합 검정에서, 면역원성 펩티드 또는 항원 펩티드-MHC(pMHC) 복합체는 표지된 면역원성 펩티드 또는 pMHC 복합체를 검출함으로써 결합이 결정될 수 있도록 방사성동위원소 또는 효소 표지와 커플링될 수 있다. 예를 들어, 면역원성 펩티드 또는 pMHC 복합체는 ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C 또는 ³H로 직접적으로 또는 간접적으로 표지될 수 있고, 방사성동위원소는 방사성 방출의 직접 카운팅 또는 섬광 카운팅에 의해 검출된다. 대안적으로, 면역원성 펩티드 또는 pMHC 복합체는, 예를 들어, 호스레이쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제 또는 루시페라제로 효소적으로 표지될 수 있고, 효소 표지는 생성물로의 적절한 기질의 전환의 결정에 의해 검출된다. 면역원성 펩티드 또는 pMHC 복합체와 면역 세포, 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포 사이의 상호작용을 결정하는 것은 또한 표준 결합 또는 효소 분석 검정을 사용하여 달성될 수 있다. 상기 기재된 검정 방법의 하나 이상의 구체예에서, 검정의 자동화를 수용하기 위해 면역원성 펩티드 또는 pMHC 복합체를 고정화시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0542] 임의의 상호작용제의 표지 없이 관심 파라미터를 조절하는 제제의 능력을 결정하는 것도 본 발명의 범위 내에 있다. 예를 들어, 미세물리계는 모니터링될 폴리펩티드의 표지 없이 폴리펩티드 사이의 상호작용을 검출하는데 사용될 수 있다(McConnell 등 (1992) *Science* 257:1906-1912). 본원에서 사용되는 바와 같은 "미세생리계"(예를 들어, Cytosensor®)는 광-어드레서블 전위차 센서(LAPS)를 사용하여 세포가 이의 환경을 산성화하는 속도를 측정하는 분석 기기이다. 이러한 산성화 속도의 변화는 화합물과 수용체 사이의 상호작용의 지표로서 사용될 수 있다.
- [0543] 면역 세포, 예컨대, T 세포 및/또는 NK 세포에 대한 면역원성 펩티드 또는 pMHC 복합체의 결합은 반응물을 함유하기에 적합한 임의의 용기에서 달성될 수 있다. 이러한 용기의 비제한적 예는 미세액가 플레이트, 시험관 및 미세-원심분리 튜브를 포함한다. 면역원성 펩티드 또는 pMHC 복합체의 고정된 형태는 또한 다공성, 미세다공성

(약 1 미크론 미만의 평균 기공 직경을 가짐) 또는 거대다공성(약 10 미크론 초과)의 평균 기공 직경을 가짐) 물질과 같은 고체 상, 예컨대, 막, 셀룰로스, 니트로셀룰로스, 또는 유리 섬유; 비드, 예컨대, 아가로스 또는 폴리아크릴아미드 또는 라텍스로 제조된 것; 또는 폴리스티렌으로 제조된 것과 같은 디쉬, 플레이트 또는 웰의 표면에 결합된 면역원성 펩티드 또는 pMHC 복합체를 포함할 수 있다.

[0544] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 하나 이상의 결합 단백질 또는 하나 이상의 숙주 세포에 대한 대상체로부터 수득된 샘플의 반응성은 결합 및/또는 T 세포 활성화 및/또는 이펙터 기능의 존재를 검출함으로써 측정될 수 있다. 용어 "T 세포 활성화"는 증식, 분화, 사이토카인 분비, 세포독성 이펙터 분자의 방출, 세포독성 활성화 및 활성화 마커의 발현으로부터 선택된 T 림프구를 지칭하고, 특히 세포독성 T 림프구의 하나 이상의 세포 반응을 지칭한다.

[0545] 사이토카인 생산 및/또는 방출은 당 분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어, ELISA, 효소-결합 면역 흡수 반응(ELISPOT), Luminex® 검정, 세포내 사이토카인 염색, 및 유세포 분석, 및 이들의 조합(예를 들어, 세포내 사이토카인 염색 및 유세포 분석)에 의해 측정될 수 있다. 이는 구현된 방법에 따라 결정될 수 있다.

[0546] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "사이토카인"은 생물학적 또는 세포 기능 또는 과정(예를 들어, 면역, 염증 및 조절)을 매개하고/거나 조절하는 분자를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "사이토카인"은 "림프카인", "케모카인", "모노카인" 및 "인터루킨"을 포함한다. 유용한 사이토카인의 예는 GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TGF- β , TNF- α 및 TNF- β 이다.

[0547] 항원-특이적 유도 또는 면역 반응의 자극으로부터 발생한 T 세포의 증식 및 클론 확장은, 예를 들어, 삼중수소화 티미딘 검정 또는 MTT 검정과 같은 비-방사성 검정의 통합을 통해 결정될 수 있다.

[0548] CTL 활성을 결정하기 위한 세포독성 검정은 당 분야에서 통상적으로 실시되는 여러 기술 및 방법 중 임의의 하나를 사용하여 수행될 수 있다(예를 들어, Henkart 등 (2003) *Fund. Immunol.* 1127-1150). 항원-특이적 T 세포 반응성을 측정하기 위한 방법의 추가 설명은, 예를 들어, 미국 특허 번호 10,208,086 및 미국 특허 공개 번호 2017/0209573에서 찾아볼 수 있다.

[0549] e. 예측 의학

[0550] 본 발명은 또한 진단 검정, 예후 검정 및 모니터링 임상 시험이 예후(예측) 목적으로 사용되어 개체를 예방적으로 치료하는 예측 의학 분야에 관한 것이다. 따라서, 본 발명에 포함되는 한 양태는 생물학적 샘플(예를 들어, 혈액, 혈청, 세포 또는 조직)의 맥락에서 HPV16 E7₁₁₋₁₉의 존재, 부재, 양 및/또는 활성 수준 또는 HPV16 E7₁₁₋₁₉에 대한 반응성을 결정하여 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애를 앓고 있는 개체가 원래 상태에서 또는 재발 상태에서든 요법에 반응할 가능성이 있는지의 여부를 결정(예를 들어, 검출)하기 위한 진단 검정을 포함한다. 이러한 검정은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애의 발병 전 또는 재발 후에 개체를 예방적으로 치료하기 위해 예후 또는 예측 목적으로 사용될 수 있다.

[0551] 본원에 기재된 진단 방법은 또한 HPV16 E7₁₁₋₁₉의 발현 또는 이의 결핍과 관련된 장애가 있거나 발병할 위험이 있는 대상체를 확인하는데 이용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "이상"은 정상 수준으로부터의 HPV16 E7₁₁₋₁₉의 상향조절 또는 하향조절을 포함한다. 비정상적 발현 또는 활성은 증가되거나 감소된 발현 또는 활성, 뿐만 아니라 발현의 정상적인 발달 패턴 또는 발현의 세포화 패턴을 따르지 않는 발현 또는 활성을 포함한다. 예를 들어, 비정상적인 수준은 바이오마커 유전자 또는 조절 서열의 돌연변이, 또는 이의 염색체 유전자의 증폭이 관심 바이오마커의 상향조절 또는 하향조절을 야기하는 경우를 포함하는 것으로 의도된다. 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "원치 않는"은 면역 세포 활성화와 같은 생물학적 반응과 관련된 원치 않는 현상을 포함한다.

[0552] 본원에 기재된 검정, 예컨대, 선행하는 진단 검정 또는 하기 검정은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 조절장애와 관련된 장애를 갖거나 발병할 위험이 있는 대상체를 확인하는데 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 시험 샘플을 대상체로부터 수득하고 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 검출하는 이상 또는 원치 않는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 조절과 관련된 장애를 확인하기 위한 방법을 제공하며, 여기서 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현의 존재는 이상 또는 원치 않는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현과 관련된 장애가 있거나 발병할 위험이 있는 대상체에 대해 진단적이다. 본원에서 사용되는 바와 같은 "시험 샘플"은 관심 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 지칭한다. 예를 들어, 시험 샘플은 생물학적 유체(예를 들어, 뇌척수액 또는

혈청), 세포 샘플, 또는 조직, 예컨대, 종양 미세환경, 종양주위 영역, 및/또는 종양내 영역의 조직병리학적 슬라이드일 수 있다.

[0553] 또한, 본원에 기재된 예후 검정은 이상 또는 원치 않는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현과 관련된 이러한 장애를 치료하기 위해 대상체가 본원에 기재된 제제를 투여받을 수 있는지의 여부를 결정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 방법은 대상체가 하나의 제제 또는 제제의 조합으로 효과적으로 치료될 수 있는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 대상체가 이상 또는 원치 않는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현과 관련된 장애를 치료하기 위해 본원에 기재된 하나 이상의 제제로 효과적으로 치료될 수 있는지의 여부를 결정하기 위한 방법을 제공한다.

[0554] 본원에 기재된 방법은, 예를 들어, 본원에 기재된 적어도 하나의 항체 시약을 포함하는 사전-패키징된 진단 키트를 이용함으로써 수행될 수 있고, 이는, 예를 들어, 임상 환경에서 관심 바이오마커를 포함하는 질환 또는 질병의 가족력 또는 증상을 나타내는 환자를 진단하기 위해 편리하게 사용될 수 있다.

[0555] 또한, 관심 바이오마커가 발현되는 임의의 세포 유형 또는 조직은 본원에 기재된 예후 검정에 이용될 수 있다.

[0556] 또한, 본원에 기재된 예후 방법은 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애를 치료하기 위해 대상체에게 치료제가 투여될 수 있는지의 여부를 결정하는데 사용될 수 있다.

[0557] f. 임상 효능

[0558] 임상 효능은 당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 요법에 대한 반응은 예컨대, 신애주버트 또는 애주버트 화학요법의 개시 후 바람직하게는 암 세포의 수, 종양 질량 및/또는 종양 부피를 변화시키기 위한 요법에 대한 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 발현을 특징으로 하는 장애, 예를 들어, 종양의 임의의 반응에 관한 것이다. 종양 반응은 신애주버트 또는 애주버트 상황에서 평가될 수 있으며, 여기서 전신 개입 후 종양의 크기는 CT, PET, 유방조영상, 초음파 또는 촉진에 의해 측정된 초기 크기 및 치수와 비교될 수 있고 종양의 세포성이 조직학적으로 추정되고 치료 개시 전에 취해진 종양 생검의 세포성과 비교될 수 있다. 반응은 또한 생검 또는 외과적 절제 후 종양의 캘리퍼 측정 또는 병리학적 검사에 의해 평가될 수 있다. 반응은 종양 부피 또는 세포도의 백분율 변화와 같은 정량적 방식으로 또는 잔류 암 부하와 같은 반-정량적 스코어링 시스템을 사용하여 (Symmans 등 (2007) *J. Clin. Oncol.* 25:4414-4422) 또는 "병리학적 완전 반응"(pCR), "임상 완전 관해"(cCR), "임상 부분 관해"(cPR), "임상 안정 질환"(cSD), "임상 진행성 질환"(cPD) 또는 다른 정성적 기준과 같은 정성적 방식의 Miller-Payne 스코어(Ogston 등 (2003) *Breast (Edinburgh, Scotland)* 12:320-327)로 기록될 수 있다. 종양 반응의 평가는 신애주버트 또는 애주버트 요법의 개시 후 초기에 (예를 들어, 수 시간, 수일, 수주 후 또는 바람직하게는 수개월 후에) 수행될 수 있다. 반응 평가에 대한 전형적인 종점은 신애주버트 화학요법의 종료시 또는 잔류 종양 세포 및/또는 종양 베드의 외과적 제거시이다. 추가 설명서는 상기 섹션 I에 열거된 용어의 정의에 제공된다.

[0559] VII. 세포 요법

[0560] 본 발명에 포함되는 또 다른 양태에서, 상기 방법은 입양 세포 요법을 포함하며, 이에 의해 MHC-제한된 에피토프를 표적화하는 제공된 분자(예를 들어, 결합 단백질(예를 들어, TCR 또는 CAR)를 발현하는 세포 또는 항원-결합 이의 단편)를 발현하는 유전자 조직된 세포가 대상체에게 투여된다. 이러한 투여는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 과증식성 세포와 같은 관심 세포가 파괴 대상이 되도록 항원-표적화 방식으로 면역 세포의 활성화(예를 들어, T 세포 활성화)를 촉진할 수 있다.

[0561] 따라서, 제공된 방법 및 용도는 입양 세포 요법을 위한 방법 및 용도를 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 질환, 병태 또는 장애를 가질 위험이 있거나 가질 것으로 의심되는 것과 같은 대상체, 조직 또는 세포에 세포 또는 세포를 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 세포, 집단 및 조성물은 치료될 특정 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 투여된다(예를 들어, 입양 T 세포 요법과 같은 입양 세포 요법을 통해). 일부 구체예에서, 세포 또는 조성물은 질병 또는 병태를 갖거나 가질 위험이 있는 대상체와 같은 대상체에게 투여된다. 일부 구체예에서, 이에 의해 방법은 질병 또는 병태의 하나 이상의 증상을 치료, 예를 들어, 개선한다.

[0562] 입양 세포 요법을 위한 세포의 투여 방법은 공지되어 있으며, 제공된 방법 및 조성물과 관련하여 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2003/0170238, 미국 특허 번호 4,690,915, Rosenberg (2011) *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8:577-585, Themeli 등 (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:928-933, Tsukahara 등 (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438:84-89, 및 Davila 등 (2013) *PLoS ONE* 8:e61338).

- [0563] 일부 구체예에서, 세포 요법(예를 들어, 입양 세포 요법, 예를 들어, 입양 T 세포 요법)은 자가 전달에 의해 수행될 수 있으며, 여기서 세포는 세포 요법을 받을 대상체로부터 또는 이러한 대상체로부터 유래된 샘플로부터 분리되고/거나 달리 제조된다. 따라서, 일부 구체예에서, 세포는 치료를 필요로 하는 대상체, 예를 들어, 환자로부터 유래되고, 분리 및 처리 후 세포는 동일한 대상체에게 투여된다.
- [0564] 일부 구체예에서, 세포 요법(예를 들어, 입양 세포 요법, 예를 들어, 입양 T 세포 요법)은 동종이계 전이에 의해 수행될 수 있으며, 여기서 세포는 세포 요법을 받거나 궁극적으로 받은 대상체 이외의 대상체, 예를 들어, 제 1 대상체로부터 분리되고/거나 달리 제조된다. 이러한 구체예에서, 그 후 세포는 동일한 종의 상이한 대상체, 예를 들어, 제2 대상체에게 투여된다. 일부 구체예에서, 제1 및 제2 대상체는 유전적으로 동일하다(동계). 일부 구체예에서, 제1 및 제2 대상체는 유전적으로 유사하다. 일부 구체예에서, 제2 대상체는 제1 대상체와 동일한 HLA 부류 또는 슈퍼타입을 발현한다.
- [0565] 일부 구체예에서, 세포, 세포 집단 또는 조성물이 투여되는 대상체는 영장류, 예컨대 인간이다. 일부 구체예에서, 영장류는 원숭이 또는 유인원이다. 대상체는 남성 또는 여성일 수 있고, 유아, 미성년자, 청소년, 성인 및 노인 대상체를 포함하는 임의의 적합한 연령일 수 있다. 일부 구체예에서, 대상체는 비-영장류 포유동물, 예컨대 설치류이다. 일부 예에서, 환자 또는 대상체는 질병, 입양 세포 요법 및/또는 사이토카인 방출 증후군(CRS)과 같은 독성 결과를 평가하기 위한 검증된 동물 모델이다.
- [0566] 결합 분자, 예컨대, TCR, TCR의 항원-결합 단편(예를 들어, scTCR) 및 TCR을 함유하는 키메라 수용체(예를 들어, CAR), 및 이를 발현하는 세포는 임의의 적합한 수단, 예를 들어, 주사, 예를 들어, 정맥내 또는 피하 주사, 안내 주사, 안구주사, 망막하 주사, 유리체내 주사, 경중격 주사, 공막하 주사, 맥락막내 주사, 전방내 주사, 결막내 주사, 결막하 주사, 테논하 주사, 안구후 주사, 안구주위 주사 또는 후방 공막 옆 전달에 의해 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 이들은 비경구, 폐내 및 비강내, 및 국소 치료에 요망되는 경우, 병변내 투여에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투약 및 투여는 투여가 단기인지 만성인지에 부분적으로 의존적일 수 있다. 다양한 투여 스케줄은 다양한 시점에 걸친 단일 또는 다중 투여, 일시 투여 및 펄스 주입을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0567] 질병의 예방 또는 치료를 위해, 결합 분자 또는 세포의 적절한 투여량은 치료될 질병의 유형, 결합 분자의 유형, 질병의 중증도 및 경과, 결합 분자가 예방 또는 치료 목적을 위해 투여되는지의 여부, 이전 요법, 환자의 임상 이력 및 결합 분자에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 의존적일 수 있다. 조성물 및 분자 및 세포는 일부 구체예에서 적합하게는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 투여된다.
- [0568] 일부 구체예에서, 세포는 대상체 체중 킬로그램 당 0.1×10^6 , 0.2×10^6 , 0.3×10^6 , 0.4×10^6 , 0.5×10^6 , 0.6×10^6 , 0.7×10^6 , 0.8×10^6 , 0.9×10^6 , 1.0×10^6 , 5.0×10^6 , 1.0×10^7 , 5.0×10^7 , 1.0×10^8 , 5.0×10^8 이상 또는 이들 사이의 임의의 범위 또는 임의의 값의 세포로 투여될 수 있다. 이식된 세포의 수는 주어진 시간의 원하는 생착 수준에 기초하여 조정될 수 있다. 일반적으로, 1×10^5 내지 약 1×10^9 개 세포/kg 체중, 약 1×10^6 내지 약 1×10^8 세포/kg 체중, 또는 약 1×10^7 세포/kg 체중, 또는 그 초과인 세포가 필요에 따라 이식될 수 있다. 일부 구체예에서, 평균 크기 마우스에 있어서 적어도 약 0.1×10^6 , 0.5×10^6 , 1.0×10^6 , 2.0×10^6 , 3.0×10^6 , 4.0×10^6 , 또는 5.0×10^6 개의 총 세포의 이식이 효과적이다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 세포, 또는 세포의 서브-타입의 개별 집단은 약 백만 내지 약 1000억 개의 세포 범위 및/또는 체중 킬로그램 당 그 세포의 양, 예를 들어, 100만 내지 약 500억 개의 세포(예를 들어, 약 500만 개 세포, 약 2500만 개 세포, 약 5억 개 세포, 약 10억 개 세포, 약 50억 개 세포, 약 200억 개 세포, 약 300억 개 세포, 약 400억 개의 세포, 또는 전술한 값 중 임의의 2개에 의해 정의된 범위), 예를 들어, 약 1천만 내지 약 1000억 개의 세포(예를 들어, 약 2천만 개의 세포, 약 3천만 개의 세포, 약 4천만 개의 세포, 약 6천만 개의 세포, 약 7천만 개의 세포, 약 8천만 개의 세포, 약 9천만 개의 세포, 약 100억 개의 세포, 약 250억 개의 세포, 약 500억 개의 세포, 약 750억 개의 세포, 약 900억 개의 세포, 또는 전술한 값 중 임의의 2개에 의해 정의된 범위), 및 일부 경우에 약 1억 개 내지 약 500억 개 세포(예를 들어, 약 1억 2천만 개의 세포, 약 2억 5천만 개의 세포, 약 3억 5천만 개의 세포, 약 4억 5천만 개의 세포, 약 6억 5천만 개의 세포, 약 8억 개의 세포, 약 9억 개의 세포, 약 30억 개의 세포, 약 300억 개의 세포, 약 450억 개의 세포) 또는 이들 범위 사이의 임의의 값 및/또는 체중 킬로그램 당으로 대상체에 투여될 수 있다. 투여량은 질환 또는 장애 및/또는 환자 및/또는 다른 치료에 대한 특정 속성에 따라 달라질 수 있다.

- [0569] 이식된 세포의 생착은 임의의 다양한 방법, 예를 들어, 비제한적으로, 종양 부피, 사이토카인 수준, 투여 시간, 이식 후 하나 이상의 시점에서 대상체로부터 수득된 관심 세포의 유세포 분석, 등에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28일 대기의 시간 기반 분석은 종양 수확을 위한 시간을 신호할 수 있다. 임의의 이러한 메트릭스는 항암 면역요법에 대한 반응에 대한 변수의 효과를 결정하기 위해 잘 알려진 파라미터에 따라 조정될 수 있는 변수이다. 또한, 이식된 세포는 사이토카인, 세포의 매트릭스, 세포 배양 지지체 등과 같은 다른 제제와 공동-이식될 수 있다.
- [0570] 세포는 또한 다른 항암제 전, 이와 동시에, 또는 후에 투여될 수 있다.
- [0571] 2개 이상의 세포 유형이 조합될 수 있으며, 예컨대, 세포-기반 요법 및 줄기 세포의 입양 세포 전이, 암 백신 및 세포-기반 요법 등으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 입양 세포-기반 면역요법은 본 발명에 포함되는 세포-기반 요법과 조합될 수 있다. 일부 구체예에서, 세포-기반 제제는 단독으로 또는 추가적인 세포-기반 제제, 예컨대 입양 T 세포 요법(ACT)과 같은 면역요법과 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, T 세포는 소포 B 세포 림프종을 치료하는 데 사용되는 CD19를 인식하도록 유전자 조작된다. ACT에 대한 면역 세포는 수지상 세포, T 세포, 예컨대, $CD8^+$ T 세포 및 $CD4^+$ T 세포, 자연 살해(NK) 세포, NK T 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 종양 침윤 림프구(TIL), 림포카인 활성화된 살해(LAK) 세포, 기억 T 세포, 조절 T 세포(Treg), 헬퍼 T 세포, 사이토카인-유도된 킬러(CIK) 세포, 및 이들의 임의의 조합일 수 있다. 비제한적으로, 방사선조사된 자가 또는 동종이계 종양 세포, 종양 용해물 또는 아포토시스 종양 세포, 항원-제시 세포-기반 면역요법, 수지상 세포-기반 면역요법, 입양 T 세포 전이, 입양 CAR T 세포 요법, 자가 면역 증강 요법(AIET), 암 백신, 및/또는 항원 제시 세포를 포함하는 널리 공지된 입양 세포-기반 면역요법 양식. 이러한 세포-기반 면역요법은 GM-CSF와 같은 사이토카인을 발현하는 것과 같은 면역 반응을 추가로 조절하기 위해 및/또는 Mage-1, gp-100 등과 같은 종양-관련 항원(TAA) 항원을 발현하기 위해 하나 이상의 유전자 생성물을 발현하도록 추가로 변형될 수 있다. 본 발명에 포함되는 제제, 예컨대 암 세포 대 본 발명에 포함되는 또 다른 제제 또는 다른 조성물의 비율은 서로에 대해 1:1일 수 있으나(예를 들어, 동일한 양의 2개의 제제, 3개의 제제, 4개의 제제, 등), 원하는 임의의 양으로 조절될 수 있다(예를 들어, 1:1, 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 2:1, 2.5:1, 3:1, 3.5:1, 4:1, 4.5:1, 5:1, 5.5:1, 6:1, 6.5:1, 7:1, 7.5:1, 8:1, 8.5:1, 9:1, 9.5 :1, 10:1 이상).
- [0572] 일부 구체예에서, 예를 들어, 대상체가 인간인 경우, 용량은, 약 1×10^8 개의 총 결합 단백질(예를 들어, TCR 또는 CAR)-발현 세포, T 세포 또는 말초혈 단핵 세포(PBMC), 예를 들어, 약 1×10^6 내지 1×10^8 개의 이러한 세포의 범위, 예컨대, 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 또는 1×10^8 또는 총 이러한 세포, 또는 상기 값 중 임의의 2개 사이의 범위로 포함한다.
- [0573] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 세포 또는 관련 조성물, 예컨대, 핵산, 숙주 세포, 약학적 제형 등은 조합 치료의 일부로서, 예컨대, 또 다른 치료적 개입, 예컨대 또 다른 항체 또는 조작된 세포 또는 수용체 또는 제제, 예컨대 세포독성제 또는 치료제와 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0574] 일부 구체예에서, 세포 또는 관련 조성물은 하나 이상의 추가적인 치료제와 또는 또 다른 치료학적 개입과 함께 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 공동-투여될 수 있다. 일부 맥락에서, 세포 또는 관련 조성물은 세포 집단이 하나 이상의 추가 치료제의 효과를 향상시키도록, 또는 그 반대의 경우에 충분히 가까운 시기에 또 다른 요법과 공동-투여된다. 일부 구체예에서, 세포 또는 관련 조성물은 하나 이상의 추가 치료제 전에 투여된다. 일부 구체예에서, 세포 또는 관련 조성물은 하나 이상의 추가 치료제 후에 투여된다.
- [0575] 일부 구체예에서, 세포 또는 관련 조성물의 생물학적 활성은 일단 세포 또는 관련 조성물이 대상체(예를 들어, 인간)에게 투여되면 임의의 다수의 공지된 방법에 의해 측정된다. 평가할 파라미터는 생체내, 예를 들어, 영상화에 의해, 또는 시험관내/생체외에서 예를 들어, ELISA 또는 유세포 분석에 의한 항원에 대한 조작된 또는 천연 T 세포 또는 다른 면역 세포의 특이적 결합을 포함한다. 일부 구체예에서, 표적 세포를 파괴하는 세포의 능력(세포독성)은 당 분야에 공지된 임의의 적합한 검정 또는 방법을 사용하여 측정될 수 있다(예를 들어, Kochenderfer 등 (2009) *J. Immunother.* 32: 689-702 및 Herman 등 (2004) *J. Immunol. Meth.* 285:25-40). 일부 구체예에서, 세포의 생물학적 활성은 또한 특정 사이토카인, 예컨대, CD107a, IFN γ , IL-2 및 TNF 알파의 발현 및/또는 분비를 검정함으로써 측정될 수 있다. 일부 구체예에서, 생물학적 활성은 바이러스 부하 또는 로드의 감소와 같은 임상 결과를 평가함으로써 측정된다.

- [0576] 일부 구체예에서, 세포는 이들의 치료 또는 예방 효능이 증가하도록 임의의 수의 방식으로 변형된다. 예를 들어, 집단에 의해 발현된 결합 단백질(예를 들어, 조작된 TCR, CAR, 또는 이의 항원-결합 단편)은 링커를 통해 표적화 모이어티에 직접적으로 또는 간접적으로 컨주게이션될 수 있다. 화합물을 표적화 모이어티에 컨주게이션시키는 관행은 당 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, Wadwa 등 (1995) *J. Drug Targeting* 3:111 및 미국 특허 번호 5,087,616).
- [0577] 세포독성 림프구와 같은 면역 세포는 말초 혈액, 비장 및 림프절과 같은 임의의 적합한 공급원으로부터 수득될 수 있다. 면역 세포는 미정제 제제물 또는 부분적으로 정제된 또는 실질적으로 정제된 제제물로서 사용될 수 있으며, 이는 항체를 사용하는 면역자기 또는 유세포 분석 기술을 포함하는 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는 표준 기술에 의해 수득될 수 있다.
- [0578] 본 발명에 포함되는 또 다른 양태에서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 결합 단백질(예를 들어, 조작된 TCR, CAR 또는 이의 항원-결합 단편)을 발현하는 본원에 기재된 세포를 면역 반응을 유발하기에 충분한 유효량으로 대상체에 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발을 치료 또는 예방하기 위한 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 결합 단백질(예를 들어, 조작된 TCR, CAR, 또는 이의 항원-결합 단편)을 발현하는 본원에 기재된 세포를 유효량으로 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 세포는 예컨대, 주사에 의해 전신 투여된다. 대안적으로, 예를 들어, 데포(depot) 또는 서방형 제형과 같이 조직에 직접 주사를 통해 전신보다는 국소적으로 투여될 수 있다.
- [0579] 일부 구체예에서, 결합 단백질(예를 들어, 조작된 TCR, CAR, 또는 이의 항원-결합 단편)을 발현하는 본원에 기재된 세포는 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원의 발현을 특징으로 하는 비-악성 장애, 과증식성 장애 또는 과증식성 장애의 재발의 예방적 또는 치료적 치료를 위한 면역조절 조성물에서 활성 화합물로서 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, HPV16 E7₁₁₋₁₉-프라이밍된 항원-제시 세포는 결합 단백질(예를 들어, 조작된 TCR, CAR, 또는 이의 항원-결합 단편)을 발현하는 본원에 기재된 세포와 함께 대상체로의 입양 전달에 추가로 사용하기 위한 림프구(예를 들어, CD8⁺ T 림프구, CD4⁺ T 림프구 및/또는 B 림프구)를 생성하는데 사용될 수 있다.
- [0580] 일부 구체예에서, 결합 단백질(예를 들어, 조작된 TCR, CAR, 또는 이의 항원-결합 단편)을 발현하는 본원에 기재된 세포는 단독으로 또는 림프구와 조합되어 면역 반응, 특히 HPV16 E7₁₁₋₁₉ 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유발하기 위해 대상체에 투여될 수 있다.
- [0581] 상기 기재된 바와 같이, 결합 단백질(예를 들어, 조작된 TCR, CAR 또는 이의 항원-결합 단편)을 발현하는 본원에 기재된 세포의 단독의 또는 림프구와 조합된 단일 또는 다중 투여는 치료 제공자(예를 들어, 의사)에 의해 선택되는 치료 및 세포 수로 수행될 수 있다. 유사하게, 세포는 단독으로 또는 림프구와 조합되어 약학적으로 허용되는 담체로 투여될 수 있다. 적합한 담체는 세포가 성장한 성장 배지, 또는 포스페이트 완충된 염수와 같은 임의의 적합한 완충 배지일 수 있다. 세포는 단독으로 또는 다른 치료제와 함께 애주번트 요법으로서 투여될 수 있다.
- [0582] VIII. 키트 및 장치
- [0583] 본 발명은 또한 키트 및 장치를 포함한다. 예를 들어, 키트 또는 장치는 적합한 용기에 패키징된 결합 단백질, 핵산 또는 결합 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하는 벡터, 핵산 또는 벡터를 포함하고/거나 본원에 기재된 바와 같은 결합 단백질을 발현하는 숙주 세포, 안정한 MHC-펩티드 복합체, 애주번트, 검출 시약 및 이들의 조합물을 포함할 수 있으며, 이러한 시약을 사용하기 위한 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 키트 또는 장치는 또한 별도의 용기에 패키징된 투여 도구와 같은 다른 성분을 함유할 수 있다. 키트 또는 장치는 본 발명에 포함되는 방법을 수행하기 위한 단위로서 홍보, 배포 또는 판매될 수 있다.
- [0584] 본 개시는 제한하는 것으로 해석되어서는 안 되는 하기 실시예에 의해 추가로 예시된다.
- [0585] 실시예
- [0586] 실시예 1: 실시예 2에 대한 재료 및 방법
- [0587] a. 렌티바이러스 포장 및 렌티바이러스 역가의 정량화
- [0588] Lenti-XTM GoStixTM Plus(Takara Bio USA, 캘리포니아주 마운틴뷰 소재)를 사용하여 HPV16-E7₁₁₋₁₉ 바이러스 작

제물을 포장하고 정량화했다. 간략하게 말하면, HPV16-E7₁₁₋₁₉ 바이러스 작제물을 PBS로 1:100으로 희석했다. 20ul의 HPV16-E7₁₁₋₁₉ 바이러스 상등액을 Lenti-X™ GoStix™ Plus 카세트 샘플 웰에 적용한 후 80ul의 Chase 완충액을 적용했다. 측면 흐름 테스트는 10분 동안 실행되었으며 샘플에 충분한 렌티바이러스가 함유된 경우 테스트 밴드(T)가 5분 이내에 나타나기 시작하고 10분에 최대 강도에 도달한다. 테스트가 적절하게 기능하면 대조군 밴드(C)가 항상 나타난다. 10분 후 스캔 윈도우에 있는 카세트의 윤곽선을 사용하여 이미징을 위한 적절한 정렬과 초점 거리가 달성된다. 샘플 명칭은 카세트 윤곽선 아래에 표시되었다. 적절한 정렬이 달성되면 윤곽선이 녹색으로 바뀌고 카세트가 자동으로 스캔된다. 알려지지 않은 스톱에 대한 실제 IFU/ml를 계산하기 위해, CD8 발현으로 측정된 역가가 알려진 기준 바이러스(IFU/ml이 알려진 바이러스 스톱)를 사용하고 시험하여 감염 단위 값뿐만 아니라 GoStix™ 값 GV를 얻었다. 기준 바이러스에 대해 IFU/GV 비율을 계산했다. 알려지지 않은 샘플을 Lenti-X™ GoStix™ Plus를 사용하여 분석하여 GV(ng/ml p24)을 얻고 다음 계산 [식: GV(미지) x (IFU/ml)/GV(기준) = IFU/ml(미지)]을 수행하여 IFU/ml를 결정했다.

[0589]

b. HPV16-E7₁₁₋₁₉ TCR 기능 평가

[0590]

(i) HPV16-E7₁₁₋₁₉-특이적 TCR을 발현하기 위한 T 세포 조작

[0591]

제조업체의 지침에 따라 EasySep 인간 T 세포 분리 키트(StemCell Technologies)를 사용하여 HLA-A*02:01 양성 건강한 공여자 PBMC로부터 범 T 세포를 분리했다. 분리된 T 세포를 ImmunoCult CD3/CD28/CD2 T 세포 활성화제 카테일(StemCell Technologies)로 활성화하고 완전 T 세포 배지(5% 인간 혈청[Sigma Aldrich], 1% 페니실린-스트렙토마이신[Thermo Fisher Scientific], 1X GlutaMax™ 보충제[Thermo Fisher Scientific], 5ng/mL IL-7[R&D Systems] 및 50IU/mL IL-2[Sigma Aldrich]이 보충된 X-VIVO 15[Lonza, 뉴저지주 모리스타운 소재])에서 밤새 배양했다. 24시간 활성화-후, T 세포에 HPV16-E7₁₁₋₁₉ TCR 바이러스 상등액을 형질도입했다. 24시간 형질도입-후, T 세포를 세정하고 G-Rex 플레이트(Wilson Wolf, 미네소타주 뉴브라이트 소재) 또는 VECCELL 96-웰 플레이트(Cosmo Bio, 캘리포니아주 칼즈바드 소재)로 옮기고 활성화-후 총 7-11일 동안 확장시켰다. T 세포 배양물에 2-3일마다 신선한 IL-2(50 IU/mL) 및 IL-7(5 ng/mL)을 보충하고/하거나 분할하여 최적의 세포 밀도를 유지했다.

[0592]

(ii) 조작된 HPV16-E7₁₁₋₁₉ TCR 형질도입 범 T 세포의 유세포 분석

[0593]

조작된 범 T 세포는 HLA-A*02:01 HPV16-E7₁₁₋₁₉(YMLDLQPET)(Immudex) 텍스트라머, TCR α/β PE-Cy7(IP26, BioLegend), CD8 PerCP-Cy5.5(HIT8a, BioLegend), CD4 APC-Cy7(OKT4, BioLegend), 및 CD34 Alex Fluor 488(QBEND/10, R&D Systems) 및 DAPI로 제조업체의 지침에 따라 염색되었다. 그런 다음 세포를 CytoFLEX 유세포 분석기(Beckman Coulter)에서 실행하고 FlowJo 소프트웨어(버전 10, TreeStar)를 사용하여 분석했다.

[0594]

(iii) 세포주

[0595]

T 림프아구 세포주 T2(ATCC CRL-1992), 선암종 세포주 NCI-H1792(ATCC CRL-5895), 표피암종 세포주 Ca Ski(ATCC CRL-1550); 및 편평 세포 암종 세포주 SCC152(ATCC CRL-3240), SCC090(ATCC CRL-3239) 및 SiHa(ATCC HTB-35)를 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입했다. T2 세포를 20% 열-불활성화 FBS 1% 페니실린-스트렙토마이신[Thermo Fisher Scientific]을 함유하는 IMDM에서 배양했다. Ca Ski 및 NCI-H1792 세포를 10% 열-불활성화 FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신[Thermo Fisher Scientific]을 함유하는 RPMI 1640에서 배양했다. SCC152, SCC090 및 SiHa는 10% 열-불활성화 FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신[Thermo Fisher Scientific] 및 1X GlutaMax 보충제[Thermo Fisher Scientific]를 함유하는 EMEM에서 유지되었다.

[0596]

(iv) Incucyte® Nuclight Red를 발현하는 안정한 세포주의 생성

[0597]

T2, NCI-H1792, Ca Ski, SiHa, SCC090 및 SCC152 세포를 무혈청 배지에서 MOI 5에서 IncuCyte® NucLight Red Lentivirus Reagent(EF-1α 프로모터, 퓨로마이신 선택)(Sartorius)로 형질도입했다. 24시간 형질도입-후, 세포를 세정하고 각각의 세포주 배지에 재현탁시킨 후 37°C, 5% CO₂에서 배양했다. 3일 형질도입-후, 퓨로마이신(Gibco, 매사추세츠주 월섬 소재)을 미리 결정된 농도(0.5 ug/mL 내지 1 ug/mL 범위)로 배양물에 첨가하여 형질도입된 세포를 선택했다. 유세포 분석에 의해 측정될 때 Incucyte® NucLight Red-양성이 적어도 98%일 때까지 퓨로마이신 선택 하에 배양물을 확장했다.

[0598] (v) 시험관내 세포독성 검정

[0599] T2 세포에 대한 시험관내 세포독성 검정은 폴리-L-오르니틴(Sigma Aldrich)으로 코팅된 96-웰 평면-바닥 조직 배양 플레이트에서 실온(RT)에서 30분 동안 수행한 후 코팅 용액을 제거하고 플레이트를 실온에서 추가로 30분 동안 건조되도록 두었다. 부착성 세포주에 대한 시험관내 세포독성 검정은 폴리-L-오르니틴으로 코팅하지 않은 96-웰 평면-바닥 조직 배양 플레이트에서 수행되었으며, 여기서 부착성 세포를 도말하고 T 세포를 첨가하기 하루 전에 부착되도록 했다. 표시된 경우, T 세포를 Incucyte® NuLight™ Red-발현 NCI-H1792, Ca Ski, SiHa, SCC090, SCC152 또는 펩티드-펄싱된 T2 세포(1 ng/ml의 HPV16-E7₁₁₋₁₉ 펩티드[YMLDLQPET, Genscript])로 20:1부터 1.25:1의 범위인 E:T 비율에서 공동-배양했다. Incucyte® S3 기기(Sartorius)에서 데이터를 수집하고 표적 세포 성장을 Incucyte S3에서 T 세포 세포독성의 관독값으로 정량화했다.

[0600] (vi) 사이토카인 생산 검정

[0601] T 세포를 Incucyte® NuLight™ Red-발현 NCI-H1792, Ca Ski, SiHa, SCC090 및 SCC152 세포 또는 펩티드-펄싱된 T2 세포(1 ng/ml의 HPV16-E7₁₁₋₁₉ 펩티드[YMLDLQPET, Genscript])로 E:T 1:1에서 공동-배양했다. 상등액을 24 시간 후에 수집하고 -80℃에서 동결했다. E11a 기기(ProteinSimple)를 사용하여 IFN- γ , TNF- α , IL-2 및 그랜자임 B의 수준을 평가하기 위해 상등액을 해동하고 multiAnalyte 카트리지(ProteinSimple, 캘리포니아주 산호세 소재) 상에 장입했다.

[0602] (vii) 증식 검정

[0603] T 세포는 제조업체의 지침에 따라 2.5 μ M CellTrace™ Violet(Thermo Fisher Scientific)으로 표지되었다. T 세포를 Incucyte® NuLight™ Red-발현 CaSki, SCC152, SCC090, SiHa 및 NCI-H1792와 공동-배양했다. 96시간 후, 세포를 수확하고 고정가능 생존성 염료 eFluor® 660(Thermo Fisher Scientific), TCR α/β PE-Cy7(IP26, BioLegend), CD4 APC-Cy7(OKT4, BioLegend) 및 CD8 PerCP-Cy5.5(HIT8a, BioLegend) 항체로 염색했다. 세포를 EasySep™ 완충액으로 세정하고 BD Cytofix™ 고정 완충액(BD Biosciences, 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)으로 고정했다. CountBright™ Absolute Counting Beads(Thermo Fisher Scientific)를 EasySep™ 완충액에 희석하고 CytoFLEX 유세포 분석기에서 획득하기 이전에 샘플에 추가하여 CellTrace™ Violet의 희석을 T 세포 증식의 지표로 평가했다. FlowJo 소프트웨어(버전 10, TreeStar)를 사용하여 데이터를 분석하고, 다음 공식을 사용하여 분할된 CD8 및 CD4 T 세포의 절대 개수를 결정했다:

[0604] # 샘플에서 CD8 또는 CD4 T 세포 = (# 게이트에서 CD8 또는 CD4 T 세포 이벤트/# 게이트에서 비드 이벤트) x 로트별로 할당된 비드 개수.

[0605] c. 동종반응성 및 안전 스크린

[0606] (i) 동종반응성 스크린을 위한 96-웰-기반 MHC-발현 어레이의 생성

[0607] 내인성 HLA-A/B/C는 CRISPR-Cas 조작을 사용하여 HEK293T 세포에서 녹아웃되었다. 가이드 RNA(gRNA)는 multicrispr.net 도구를 사용하여 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 유전자좌에 걸쳐 보존된 서열에 대해 설계되었다(Prykhodzhiy 등, Plos One, 2015). 다음 가이드가 선택되었다: CRISPR-ALL-1: CGGCTACTACAACGAGACG, CRISPR-ALL-2: AGATCACACTGACCTGGCAG, CRISPR-ALL-3: AGGTCAGTGTGATCTCCGCA. gRNA는 BsmBI 부위를 사용하여 LentiCRISPR V2 벡터 안으로 클로닝되었다. HEK293T 세포는 Mirus TransIT(Mirus Bio, 위스콘신주 매디슨 소재)를 사용하여 플라스미드 가이드 작제물로 형질감염시켰다. 7일 후, 범-MHC 항체(BioLegend)를 사용하여 MHC-녹아웃(MHC-KO) 세포를 분류하였다. 단일 세포 클론을 확장하고, MHC의 부재를 유세포 분석 및 웨스턴 블롯으로 확인했다. B2M-녹아웃(B2M-KO) 세포는 표면 MHC 발현의 완전한 부재에 대한 양성 대조군으로 사용하였다. B2M은 가이드 RNA: GGCCACGGAGCGAGACATCT를 사용하여 B2M을 표적화하는 CRISPR RNP를 전기천공하여 HEK293T 세포에서 녹아웃되었다.

[0608] MHC-null HEK293T 세포에 IncuCyte® NuLight™ 레드 바이러스(Essen BioScience)를 형질도입했다. 형질도입된 세포는 Sony SH800 분류기를 사용하여 NuLight™ 레드 발현을 위해 분류되었다. MHC 발현 어레이를 생성하기 위해, MHC-null NuLight™ 레드 발현 HEK293T 세포를 96-웰 플레이트의 개별 웰에 가장 일반적인 110개 MHC(pHAGE-EF1a-MHC-UBC-NAT)로 형질도입했다. 형질도입된 세포를 1주일 동안 누르세트리신(400 μ g/ml)으로 선택했다. 가장 일반적인 110개 MHC를 발현하는 세포를 계대배양하여 96-웰 플레이트에 어레이로 보관했다. 개별 MHC 대립유전자의 발현은 범-MHC 항체(BioLegend)를 사용한 염색을 통해 검증되었다.

- [0609] 검정을 위한 양성 대조군을 생성하기 위해, MHC-null HEK293T 세포를 IncuCyte® NucLight™ 레드 바이러스 (Essen BioScience)로 형질도입하고 Sony SH800 분류기를 사용하여 NucLight™ 레드 발현을 위해 분류했다. 그런 다음 HLA-A*02:01(pHAGE-EF1a-MHC-UBC-NAT)을 렌티바이러스 형질도입을 사용하여 세포 안으로 도입했다. 형질도입된 세포를 1주일 동안 누르세트리신(400 µg/ml)으로 선택했다. 그런 다음 이들 세포를 HPV16-E7₁₁₋₁₉ 에피토프(YMLDLQPET)를 함유하는 HPV16-E7의 단편을 발현하는 90-량체 작제물(pHAGE-CMV-FHA-HPV16-E7.1-EFS-AmCyan)로 형질도입했다. 그런 다음 형질도입된 세포를 Bigfoot 스펙트럼 세포 분류기(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 AmCyan 발현을 위해 분류했다.
- [0610] (ii) 렌티바이러스 패키징 및 형질도입
- [0611] 110개 MHC 발현 작제물(pHAGE-EF1a-MHC-UBC-NAT)의 렌티바이러스를 패키징하기 위해, MHC-null HEK293T 세포를 96웰에 75% 컨플루언스로 도말하고 jetPRIME® 형질감염 시약(Polyplus, 프랑스 일키르히 소재)을 사용하여 형질감염시켰다. 개별 MHC 발현 작제물을 패키징 플라스미드(pREV/pTAT/pVSVG/pGAGPOL)와 혼합하고 제조업체의 프로토콜에 따라 jetPRIME® 시약과 함께 인큐베이션했으며, 형질감염-후 24시간에 DMEM 배지를 추가했다. 바이러스 상등액은 형질감염 48시간 후 수확되었으며 96-웰-기반 어레이 형식으로 110개 MHC의 형질도입에 사용되었다. 다른 작제물의 렌티바이러스를 패키징하기 위해, Lenti-X® 세포(Takara Bio USA, 캘리포니아주 마운틴뷰 소재)를 75% 컨플루언스로 도말하고 jetPRIME® 형질감염 시약(Polyplus, 프랑스 일키르히 소재)을 사용하여 형질감염시켰다. 발현 작제물을 패키징 플라스미드(pREV/pTAT/pVSVG/pGAGPOL)와 혼합하고 제조업체의 프로토콜에 따라 jetPRIME® 시약과 함께 인큐베이션했으며, 형질감염-후 24시간에 OptiPRO™ SFM 배지를 추가했다. 바이러스 상등액을 형질감염 48시간 후에 수확하였으며 Vivaspin® 20 원심분리 농축기 또는 Vivaflow® 50 카세트(Sartorius, 뉴욕주 보헤미아 소재)를 사용하여 농축하였다.
- [0612] HEK293T 세포에서 유래된 세포주를 포함하는 모든 바이러스 형질도입은 폴리브렌(4 µg/ml)으로 수행되었다.
- [0613] (iii) 동종반응성 프로파일링을 위한 공동-배양
- [0614] 범 T 세포를 상기에서 기술한 대로 조작하고 냉동했다. 0일차에 T 세포를 1.0E+6 T 세포, 20.0E+6 조사된 PBMC, 제조함 인간 IL-2 및 CD3 단클론 항체(OKT3)[0.1ug/mL, eBioscience]를 갖는 수직 T25 플라스크에서 재차극했다. 2일, 4일, 5일, 6일에 배지 부피의 절반을 10% 열-불활성화된 소 태아 혈청[FBS], 100 IU/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신 및 제조함 인간 IL-2 [50 U/mL, PeproTech, 뉴저지주 크랜베리 소재]가 보충된 RPMI 1640으로 교환했다. 검정을 위해 7일차에 세포를 수확했다.
- [0615] 검정은 3회 수행되었다. 5일차에, 96-웰 어레이에서 표적 세포를 계대배양하고 384-웰 플레이트에 시딩했다. 6일차에, 제조함 E7-11-28 TCR("TCR 28" 또는 "28" 또는 "TCR-200-A02"로도 알려짐)을 발현하는 조작된 CD8+ T 세포 또는 형질도입되지 않은 대조군 T 세포를 5:1의 이펙터 대 표적(E:T) 비율로 추가하고 표적 세포와 함께 48시간 동안 인큐베이션했다. 표적 세포 수는 NucLight™ 레드-양성 세포 수를 측정하여 IncuCyte®를 사용하여 시간 경과에 따라 측정했다. 검정에서 각 MHC에 대한 관심 제조함 TCR에 의한 48시간에서의 세포 억제는 1-(세포 배가[E7-11-28 발현 T 세포로 인큐베이션됨]/세포 배가[형질도입되지 않은 대조군 T 세포로 인큐베이션됨])로 계산되었다.
- [0616] (iv) 안전 스크린을 위한 TCR E7-11-28 발현 CD8 T 세포의 생성
- [0617] 제조업체의 프로토콜에 따라 StraightFrom® Leukopak® CD8 마이크로비드 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 A*02:01-음성 공여자로부터 일차 CD8+ T 세포를 분리했다. 분리된 세포를 CryoStor® CS10(Stem Cell Technologies)에서 동결하고 사용할 때까지 액체 질소에 보관했다. -1일차에 CD8+ T 세포를 해동하고 완전 T 세포 배지(10% 열-불활성화 소 태아 혈청(FBS), 100 IU/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신, 제조함 인간 IL-2 [50 U/mL, PeproTech, 뉴저지주 크랜베리 소재], 제조함 인간 IL-15 [5 ng/mL, R&D Systems] 및 제조함 인간 IL-7 [5 ng/mL, R&D Systems]이 보충된 RPMI 1640으로 세정했다. 0일차, CD8+ T 세포를 세정하고 새로운 T 세포 배지에 재현탁시키고 ImmunoCult™ 인간 CD3/CD28/CD2 T 세포 활성화제(1 x 10⁶개 CD8+ T 세포당 5µL, Stem Cell Technologies)를 사용하여 활성화시켰다. 1일차에 세포를 세정하고 신선한 완전 T 세포 배지에 재현탁시키고 렌티바이러스 입자로 형질도입하여 MOI 10에서 TCR E7-11-28을 발현시켰다. 2일차에 세포를 세정하고 신선한 완전 T 세포 배지에 재현탁한 후 G-Rex® 24 웰 플레이트(Wilson Wolf)에서 5일차까지 확장했다. 5일차에 세포를 수확하고 EasySep™ 완충액(Stem Cell)에 재현탁시키고 HLA-A*02:01 HPV16₁₁₋₁₉ dextramer-

APC(Immudex)를 1:25 희석하여 실온에서 20분 동안 첨가했다. 항-CD34-Alexa Fluor®488(클론: QBEnd10, R&D Systems)을 1:50 희석으로 첨가하고 실온에서 10분 동안 인큐베이션했다. 세포를 EasySep™ 완충액으로 세정하고 1:200 희석으로 7-AAD를 함유하는 EasySep™ 완충액에 재현탁시켰다. 살아있는 텍스트라머-결합 세포(DAPI-Dextramer+ CD34+) 세포를 세포 분류(Beckman Coulter MoFlo Astrios EQ)로 분리했다. 분류된 세포를 세정하고 새로운 완전 T 세포 배지에 재현탁시키고 12일까지 G-Rex® 10 플라스크(Wilson Wolf)에서 확장시켰으며, 이 시점에 세포를 CryoStor® CS10에서 동결시키고 사용할 때까지 액체 질소에 보관했다.

[0618] E7-11-28을 발현하는 CD8+ T 세포를 해동하고 GRex® 100 플라스크(Wilson Wolf)에 신선한 T 세포 배지(10% 열불활성화 소 태아 혈청(FBS), 100 IU/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신, 제조함 인간 IL-2 [50 U/mL, PeproTech]가 보충된 RPMI 1640)에서의 0.1 µg/mL 항-CD3(OKT3, eBioscience) 및 50 U/mL 제조함 IL-2(PeproTech)의 존재에서 T 세포를 조사된(60 회색) 동종이형 HLA-A*02:01 PBMC와 공동-배양하여 재자극(추가 확장)했다. 50 U/mL 제조함 IL-2를 6일까지 격일로 확장 세포에 첨가했다. 6일차에, 배양 배지의 절반을 50 U/mL 제조함 IL-2를 함유하는 신선한 T 세포 배지로 교체했다. 세포는 7일차에 스크린에 사용되었다.

[0619] (v) T 세포 표적-상 사멸의 품질 관리(QC)

[0620] 재자극의 5일차에 리포터 세포(펩티도 라이브러리 발현)를 CellTrace™ Violet(Thermo Fisher)으로 실온에서 10분간 표지했다. 라벨링 반응은 5X 과량의 완전 DMEM 배지(10% FBS, 100 IU/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신이 보충된 1X DMEM)로 켄칭하였다. 원심분리 후, 후속 검정을 위해 세포를 집중했다. 표적-외 스크리닝을 위해 400 x 10⁶ 표지된 리포터 세포를 CellSTACK® 플라스크에 집중했다. T 세포 표적-상 사멸의 QC를 위해, 96-웰 평평한 바닥 플레이트의 웰당 25,000개의 리포터 세포를 시딩했다.

[0621] TCR E7-11-28 재자극의 6일차에 T 세포를 HPV16₁₁₋₁₉ 펩티드에 대한 활성에 대해 테스트했다. 양성 대조군으로서 리포터 세포의 분획을 100 ng/mL의 HPV16₁₁₋₁₉ 펩티드(Genscript)로 1시간 동안 펄싱했다. T 세포를 4개의 이펙터:표적(E:T) 비율(2:1, 1:1, 1:2, 1:4)로 리포터 세포에 3회 추가했다. 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션한 후 CytoFLEX 유세포 분석기(Beckman Coulter)에서 데이터를 획득하기 전에 위아래로 피펫하여 세포를 재현탁시켰다.

[0622] (vi) 스크린 공동-배양, 표적 세포 농축 및 분류

[0623] TCR E7-11-28 확장의 7일차에 T 세포를 라이브러리-형질도입된 리포터 세포에 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션했다. 인큐베이션 후, 모든 세포를 트립신화 및 원심분리에 의해 수확하고, 세포를 1X 아넥신 V 결합 완충액(Miltenyi Biotec)에 재현탁하고 원심분리했다. 세포를 1X 아넥신 V 결합 완충액(1 x 10⁹ 총 세포당 9mL 아넥신 V 결합 완충액 내 1mL 마이크로비드)에서 아넥신 V 자성 마이크로비드(Miltenyi Biotec)로 재현탁하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션했다. 세포를 5X 부피의 아넥신 V 결합 완충액으로 세정하고 원심분리했다. 세포를 아넥신 V 결합 완충액에 재현탁시킨 다음 2 "메가랩"에 걸쳐서 분할하고 70 µm 세포 스트레이너(Corning)를 사용하여 여과했다. 아넥신 V-표지된 세포는 autoMACS® Pro(Miltenyi Biotec)를 사용하여 적극적으로 선택되었다. 각 "메가랩"의 용리는 스크린당 총 8개의 기술적 복제물에 대해 4개의 "복제물"에 걸쳐서 추가로 분할되었다. IFP⁺ 세포는 MoFlo® Astrios EQ 세포 분류기(Beckman Coulter)를 사용하여 분류되었다.

[0624] (vii) 차세대 서열분석

[0625] 게놈 DNA(gDNA)는 GeneJET™ Genomic DNA 정제 키트(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 분류된 세포로부터 추출했다. 항원 카세트는 PCR에 의해 추출된 gDNA로부터 증폭시킨 다음 제2 PCR 반응에서 시퀀싱 어댑터 및 샘플-특이적 인덱스 서열이 첨부되었다. 표준 Illumina 시퀀싱 프라이머를 사용하여 Illumina NextSeq™ 기계에서 애플리콘을 시퀀싱했다.

[0626] (viii) 데이터 분석

[0627] 뉴클레오타이드 서열을 개별 뉴클레오타이드 타일에 맵핑하였다. 각 타일에 대한 리드 카운트의 비율은 각 스크린 복제물(n=8) 및 형질도입된 리포터 세포의 각 풀에 대한 입력에 대해 계산되었고, 각 타일의 농축은 스크린 복제물에서 타일의 비율을 입력 라이브러리에서 타일의 비율로 나누어 계산되었다. 8개의 스크린 복제물에 걸쳐 동일한 타일의 농축의 수정된 기하 평균을 사용하여 재현 가능한 스크린 히트를 식별하였다. 1.5-배 농축 임계값 초과와 각 타일에 대한 특이적 MHC-결합 에피토프는 NetMHC4.0을 사용하여 예측되었다. 각 타일에 대한 후보

에피토프는 스크린에서 농축된 중첩되는 인접 및 중복 타일에 걸쳐 공유된 예측성 강한-결합 에피토프를 확인함으로써 선택되었다.

d. TCR E7-11-28의 안전성 평가

(i) TCR E7-11-28의 추정되는 표적-외를 발현하는 암 세포주

암세포주를 다음 표 4에 기술된 배지에서 배양하였다:

표 4: 암세포주 및 그의 배양 배지

암세포주	배양 배지
CAL-12T	DMEM + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep
THP-1	RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep + 2-머캅토에탄올 (0.05 mM)
4.1TF-1	RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep + GM-CSF (2 ng/mL)
OVCAR-3	RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep + 소 인슐린 (0.01 mg/mL)
SNU-475	RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep
NCI-H1792	RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep
ChaGo-K-1	RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep
JVM-2	RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep
L363	RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep
SET-2	RPMI-1640 + 20% HIFBS + 1X Pen/Strep
CMK	RPMI-1640 + 20% HIFBS + 1X Pen/Strep
OCI-M1	IMDM + 20% HIFBS + 1X Pen/Strep
OCI-M2	IMDM + 20% HIFBS + 1X Pen/Strep
HEK-293	DMEM + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep

(ii) TCR E7-11-28의 추정 표적-외를 발현하는 건강한 인간 일차/iPS-유래된 세포

건강한 공여자로부터 일차 세포 또는 iPS-유래된 세포를 해동하고 제조업체의 지침에 따라 아래 표 5에 기술된 배지에서 배양했다. 피하 인간 백색 지방전구세포(HWP)를 지방전구세포 성장 배지(즉시 사용 가능)에서 80-90% 컨플루언트까지 배양하고, 72시간 동안 배지를 지방전구세포 분화 배지(즉시 사용 가능)로 변경하여 지방세포로 분화했다. 이를 지방세포 영양배지에서 14일 동안 추가 배양하여 분화 과정을 완료하였다.

[0635] 표 5: 건강한 인간 일차/iPS 유래된 세포 및 이의 배양 배지

세포	세포 로트 번호	배양 배지
인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)	466Z026, 0000246083	내피 세포 성장 배지(즉시 사용 가능)
인간 폐섬유아세포(HPF)	474Z024.2, 446Z03, 1474Z031.2, 1081503.2	섬유아세포 성장 배지(즉시 사용 가능)
인간 소기도 상피 세포(HSAEpC)	467Z033, 467Z025.2	기도 상피 세포 성장 배지(즉시 사용 가능)
피하 인간 백색 지방전구세포(HWP)	454Z006, 467Z014	지방전구세포 성장 배지(즉시 사용 가능)
인간 대동맥 평활근 세포(HAoSMC)	453Z011.6, 470Z011.2	평활근세포 성장배지 2(즉시 사용 가능)
인간 심장 근세포(HCM)	463Z016.2, 470Z011.9, 472Z002.3	근세포 성장 배지(즉시 사용 가능)
iCell 성장세포	01434	DMEM 배지/F-12, HEPES + 2% FBS + 1X N-2 보충제
정상 인간 성상교세포(NHA)	0000672445	AGMTM 성상교세포 성장 배지 BulletKitTM
인간 간 성상세포(HHStC)	C212011, C212641	SuperCult® 성상 세포 배지
인간 간 성상세포(HHStC)	25914	성상 세포 배지
정상 인간 피부 섬유아세포(NHDF)	472Z001.3, 471Z018.2, 477Z023.2	섬유아세포 성장 배지(즉시 사용 가능)
인간 심장 섬유아세포(HCF)	472Z002.2, 475Z017.1	섬유아세포 성장 배지 3(즉시 사용 가능)
정상 인간 표피 각질세포(NHEK) 간세포	451Z014.1 HH1052, HH1165, HH1186	각질세포 성장 배지 2(즉시 사용 가능) UPCM - 범용 1 차 세포 도말 배지
인간 소장 상피 세포(HSIEpC)	201457	상피 세포 성장 배지
인간 자궁경부 상피 세포(HCerEpC)	202099	상피 세포 성장 배지
인간 자궁경부 상피 세포(HCerEpC)	70029809	자궁경부 상피세포 기초배지+ 자궁경부 상피세포 성장 키트
인간 유방 상피 세포(HMEpC)	70043304	유방상피세포 기초배지+ 유방상피 세포 성장 키트
골격근 세포(SkMC)	81202212 2208422001, 2208412006, 2208412008	지방, 텃줄 및 골수-유래 MSC+ 일차 골격근 성장 키트용 중간엽 줄기세포 기초 배지
인간 골수 단핵 세포(HBMMNC)		RPMI-1640 + 10% HIFBS + 1X Pen/Strep

[0636]

[0637] (iii) 정량적 RT-PCR

[0638] 제조업체의 지침에 따라 Qiagen RNeasy® Mini Kit(Qiagen, 캘리포니아주 발렌시아 소재)를 사용하여 암세포주 또는 건강한 인간 일차 세포에서 총 RNA를 추출했다. 샘플 내 RNA의 품질과 농도는 NanoDrop™ One^C 기계(Thermo Fisher Scientific, 매사추세츠주 월샘 소재)를 사용하여 결정되었다. 서로 다른 샘플로부터 동일한 양의 RNA(2 µg)를 다음과 같은 사이클링 조건으로 T100™ Thermal Cycler(Bio-Rad Laboratories, 캘리포니아주 헤라클레스 소재)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 SuperScript™ IV VIL0™ 합성 키트(Thermo Fisher Scientific, 매사추세츠주 월샘 소재)를 사용하여 cDNA 합성에 사용했다: 프라이머를 25℃에서 10분간 어닐링하고, RNA를 50℃에서 10분간 역전사하고, 효소를 85℃에서 5분간 비활성화한다.

[0639] 모든 qPCR 검정은 10 µL TaqMan® Fast Advanced Master Mix(Thermo Fisher Scientific, 매사추세츠주 월샘 소재), 5 µL 희석된 cDNA(50ng), 4 µL의 RNase/DNase 유리수, 및 1 µL 각각의 유전자 특이적 TaqMan® 검정 프로브(Thermo Fisher Scientific, 매사추세츠주 월샘 소재): TATA-box 결합 단백질 (Hs00427620_m1), INTS4 (Hs00369250_m1), CPAMD8, (Hs00610855_m1) HERC1 (Hs01032486_m1), MPL (Hs00180489_m1), SPTA1 (Hs00162179_m1), 및 NUTM1 (Hs01395191_m1)을 함유하는 20 µL 반응량에서 QuantStudio™ 7 Pro PCR 시스템(Thermo Fisher Scientific, 매사추세츠주 월샘 소재)을 사용하여 3회 수행되었다. 모든 전사물에는 다음과 같은 표준 PCR 반응 조건이 사용되었다: 50℃ 2분, 95℃ 2분; 95℃ 1초, 60℃ 20초의 40 사이클. 정량화 주기(Cq) 측정을 위해 QuantStudio™ 설계 및 분석 관리자 소프트웨어(버전 2.6)를 사용하여 데이터를 분석했다. 하우스

키핑 유전자 TATA-박스 결합 단백질의 기하 평균을 사용하여 내부 정규화를 위해 $2^{-\Delta C_T}$ 방법을 적용했다.

[0640] (iv) TCR E7-11-28의 안전성 평가를 위한 사이토카인 검정

[0641] 공동-배양 검정 이십사(24)시간 이전에 Gibco TrypLE™ 시약을 사용하여 암세포주를 그 배양 플라스크에서 탈리하고 배지로 세정하고 96-웰 평면-바닥 배양 플레이트에 50,000개 세포/웰의 밀도로 접종하고 밤새도록 부착되도록 두었다. 세포를 1ng/mL 또는 100ng/mL의 E7₁₁₋₁₉ 펩티드로 2시간 동안 펄싱하거나 그 각각의 배지에서 펄싱되지 않은 채로 두었다. 펄싱에 이어서, 웰을 배지로 3회 부드럽게 세정다. 그런 다음 E7-11-28 또는 NTD 세포를 완전 T 세포 배지에 50,000개 세포/웰의 밀도로 첨가했다. 공동-배양 24시간 후, 상등액을 수집하고 -80℃에서 동결했다. E11a™ 기기를 사용하여 Simple Plex Human IFN-γ 감마(3세대) 카트리지(ProteinSimple, 캘리포니아주 산호세 소재)에 장입하여 상등액을 해동하고 IFN-γ 수준에 대해 분석했다. 공동-배양 검정 24시간 이전에 HUVEC, HPF, HSAEpC, HAsMC, NHA 및 HHSteC를 DetachKit™(PromoCell, 독일 소재)을 사용하여 배양 플라스크 또는 플레이트에서 탈리하고 세정하고 25,000개 세포/웰의 밀도로 그 각각의 배지에 도말했다. 다음날 펩티드-펄싱 또는 비펄싱되고 세정된 후 E7-11-28 또는 NTD 세포의 50,000개 세포/웰과 함께 공동배양되었다. 피하 HWP를 공급자가 권장하는 밀도로 해동한 후 96-웰 평면-바닥 배양 플레이트에 직접적으로 도말하고 이를 탈리하지 않고 성숙한 지방세포로 분화했다. HCM은 또한 공급업체-권장된 밀도로 해동한 후 96-웰 평면-바닥 배양 플레이트에 직접적으로 도말하고 40일 동안 배양하여 성숙되도록 했다. 그런 다음 지방세포와 HCM은 펩티드-펄싱 또는 비펄싱되고 E7-11-28 또는 NTD의 50,000개 세포/웰과 함께 공동배양되었다. iCell 성장교세포를 해동하고 제조업체의 지침에 따라 24-웰 배양 플레이트에 7일 동안 도말했다. 다음날 펩티드-펄싱 또는 비펄싱되고 세정된 후 E7-11-28 또는 NTD 세포의 250,000개 세포/웰과 함께 공동배양되었다. 모든 일차/iPS 유래 세포 및 T 세포의 공동배양-후 24시간에 상등액을 수집하고 E11a™ 장비에서 IFN-γ 수준을 분석했다.

[0642] e. 마우스 이중이식 연구

[0643] TCR E7-11-28의 생체내 항-종양 효능은 7-9주령 암컷 NCG 마우스(NOD-*Prkdc*^{em26Cd52}*I12rg*^{em26Cd22}/NjuCr1, Charles River)에 CaSki 및 SCC152 세포를 피하 세포 주입하여 2개의 이중이식 모델에서 평가되었다. Explora BioLabs에서의 동물 관리 및 사용 프로그램은 실험실 동물 관리 및 사용에 대해 허용된 표준 준수를 보장하는 국제 실험 동물 관리 평가 및 인증 협회(AAALAC)에 의한 인증을 받았다. CaSki 및 SCC152 세포는 각각 10% 소 태아 혈청을 함유하는 RPMI-1640 및 EMEM 배지에서 부착 배양물로 성장되었다. 50% PBS 및 50% Matrigel®로 구성된 100 μL 부피의 1x10⁶ CaSki 또는 SCC152 종양 세포를 오른쪽 옆구리에 피하로 주사했다. 주사-후 10-일 또는 14-일에, 공식: 부피 = 1/2(종양 길이 x 수직 종양 폭²)에 따라 종양 부피(캘리퍼로 측정)를 기준으로 동물을 실험 그룹으로 무작위화했다.

[0644] 투여일에, T 세포를 완전 T 세포 배지에서 해동시키고, 세정하고, 0.2mL당 2x10⁷ 살아있는 세포의 밀도로 멸균 PBS에 재현탁시켰다. 비히클(PBS), 2x10⁷ 살아있는 NTD 또는 TCR E7-11-28 T 세포를 고정된 부피 0.2mL로 각 시험 동물의 꼬리 안으로 정맥으로 주사했다.

[0645] 종양 성장에 대한 효과는 격주로 성장을 측정하여 평가되었다.

[0646] f. HPV16 E7-11-28 및 DN-TGFβRII 이중 양성 T 세포의 조작 및 DN-TGFβRII 기능의 평가

[0647] 렌티바이러스로 T 세포의 조작은 T 세포가 1) TCR E7-11-28 및 Q-태그된 CD8 α 및 (2) DN-TGFβRII를 인코딩하는 2개의 렌티바이러스로 공동-형질도입되었다는 것을 제외하고 'HPV16 E7₁₁₋₁₉-특이적 TCR을 발현하기 위한 T 세포 조작' 섹션(상기 섹션 b(i) 참조)에 기술된 대로 수행되었다. TCR E7-11-28, Q-태그된 CD8 및 DN-TGFβRII의 발현은 유세포 분석에 의해 확인되었다. 이어서, 세포를 TGFβRII(W17055, BioLegend)에 대한 항체로 염색하고 DN-TGFβRII-양성(TGFβRII 밝음) 및 DN-TGFβRII-음성(TGFβRII 희미함)으로 FACS-분류했다. T 세포를 50 IU/mL IL-2(Sigma Aldrich) 및 5 ng/mL IL-7(R&D Systems)이 보충된 T 세포 배지에서 하룻밤 동안 휴지시킨 다음, 0 또는 5 ng/mL TGFβ1(R&D Systems)을 함유하는 T 세포 배지에서의 12-웰 플레이트에 도말하였다. TGFβ1의 존재 대 부재에서 24시간 인큐베이션 후, 펩티드-펄싱된 T2 세포를 사용한 공동-배양 검정을 설정했다. 이를 위해, T2 세포를 다양한 농도(0.7 pg/mL, 7.4 pg/mL, 22 pg/mL, 67 pg/mL, 200 pg/mL 및 2,000 pg/mL)에서 E7₁₁₋₁₉ 펩티드(YMLDLQPET, Genscript)로 펄싱하고, 50% T 세포 배지 및 50% 표적 세포 배지(10% 열-불활성화 FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 RPMI 1640(Thermo Fisher Scientific))에서 E:T 1:1에서 T 세포

로 도말하고; TGF β 1을 0 또는 5 ng/mL의 최종 농도로 첨가했다. 20시간 후, GolgiPlug™(BD Biosciences)를 공동-배양에 첨가했다. 세포를 추가로 4시간 동안 인큐베이션한 후 세포내 IFN γ 에 대해 염색했다. Fc 수용체에 대한 비-특이적 결합은 세포를 Fc 블록(Thermo Fisher Scientific)과 함께 15분 동안 인큐베이션함에 의해 억제되었다. 이어서, 세포를 비오티닐화된 항-인간 CD34(QBEND10, Thermo Fisher Scientific)로 염색하고 이어 Brilliant Violet™ 421-접합된 스트렙타비딘(BD Biosciences), 항-인간 CD3 FITC(HIT3a, BioLegend) 및 고정 가능한 근적외선 LIVE/DEAD™ 염료(Thermo Fisher Scientific)로 염색했다. 세포를 Cytofix™(BD Biosciences)로 고정하고 Perm/Wash™ 완충액(BD Biosciences)으로 투과화하고 항-인간 IFN γ -PE(B27, BioLegend)로 염색했다. 샘플은 CytoFLEX 유세포 분석기(Beckman Coulter)에서 수집하고 FlowJo 소프트웨어(버전 10, TreeStar)를 사용하여 분석했다. Q-태그된 살아있는 T 세포 집단(LIVE/DEAD™-CD3+CD34+) 내의 IFN γ + 세포의 백분율을 결정했다.

[0648] 아래에 추가로 설명된 바와 같이, 용어 "TSC-200-A02"는 CD8 α , CD8 β , CD34 농축 태그(예를 들어, Q 태그) 및 DN-TGF β RII를 포함한 기타 구성요소에 부가하여, E7-11-28(즉, 표 1에서 상기 기술된 TCR-200-A02 서열)을 발현하는, CD8+ T 세포 및 CD4+ T 세포를 포함하여, 조작된 전체 T 세포 집단을 지칭한다.

[0649] g. 수용체스캔 화면

[0650] (i) DC 배양

[0651] 제조업체의 지침에 따라 EasySep™ Human CD14 양성 선택 키트 II(StemCell Technologies)로 HLA-A*02:01-양성 건강한 공여자로부터 분리된 PBMC를 사용하여 -4일차에 단핵구 분리를 수행했다. 순도 및 공동-자극 분자 발현을 CD14(M5E2, BioLegend, 매사추세츠주 데드햄 소재), HLA-A2(BB7.2, BioLegend), CD80(2D10, BioLegend), CD83(HB15e, BioLegend) 및 CD86(IT2.2, BioLegend)에 특이적인 형광으로-표지된 항체를 사용하여 평가했다. CD14 발현은 >90%였다. CD14⁺ 단핵구를 제조합 인간 GM-CSF 및 IL-4(R&D Systems, 미니소타주 미니애폴리스 소재)가 보충된 AIM-V™ 배지(Thermo Fisher Scientific, 매사추세츠주 월샘 소재)에 최종 농도 800 IU/mL 및 1000 IU/mL로 재현탁시켰다. -2일차에는 제조합 인간 TNF- α (10ng/mL), IL-6(1000IU/mL), IL-1 β (2ng/mL)(R&D Systems)뿐만 아니라 PGE2(1 μ g/mL, StemCell Technologies)를 배양된 단핵구에 첨가했다.

[0652] (ii) CD8 나이브 T 세포 분리

[0653] -1일차에 제조업체의 지침에 따라 EasySep™ 인간 나이브 CD8+ T 세포 분리 키트 II(StemCell Technologies)를 사용하여 HLA-A*02:01-발현 건강한 공여자의 PBMC로부터 자가 CD8 나이브 T 세포를 분리했다. 순도를 CD8 α (HIT8a, BioLegend), CD45RO(UCHL1, BioLegend), CD45RA(HI100, BioLegend), CD56(5.1H11, BioLegend), CD57(HCD57, BioLegend) 및 CCR7(G043H7, BioLegend)에 특이적인 형광으로-표지된 항체를 사용하여 평가했다. 나이브 CD8 α ⁺ T 세포의 순도는 >90%였다. 세포를 T 세포 배지(10% 인간 혈청[Sigma Aldrich, St. Louis, MO], 1% 페니실린-스트렙토마이신 [Thermo Fisher Scientific], 1% GlutaMAX [Thermo Fisher]를 함유하고, 10ng/ml 제조합 인간 IL-7(R&D Systems)이 보충된 X-VIVO™ 15 무혈청 배지[Lonza, 메릴랜드주 록랜드 소재] 또는 LymphoONE™[LymphoONE T-세포 확장 Xeno-Free 배지, Takara, WK552])에서 37°C, 5% CO₂에서 밤새 휴지시켰다.

[0654] (iii) 공동-배양

[0655] 0일차에 CD8 T 세포 순도를 -1일차와 동일한 항체 패널을 사용하여 재평가하고, DC 성숙을 HLA-A2, CD80, CD83 및 CD86의 상향조절과 CD14의 하향조절에 의해 확인했다. DC는 1 μ M HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드(YMLDLQPET, GenScript [뉴저지주 피스카타웨이 소재])뿐만 아니라 다양한 항원 특이성을 갖는 추가 펩티드(즉, 멀티플렉스 스크린)로 37°C, 5% CO₂에서 3시간 동안 펠딩되었다. 펠딩된 DC는 제조합 인간 IL-12(10ng/mL) 및 IL-21(60ng/mL)(R&D Systems)이 보충된 T 세포 배지에서 휴지된 CD8 나이브 T 세포와 공동-배양되었다. 공동-배양에는 3일차와 10일차 사이에 제조합 인간 IL-7 및 IL-15(R&D Systems)가 보충되었다. HPV16 E7₁₁₋₁₉-특이적 세포에 대한 텍스트라머 염색은 제조업체의 지침에 따라 A*02:01 HPV16 E7₁₁₋₁₉(YMLDLQPET) dCODE dextramer®(Immudex, 덴마크 코펜하겐 소재, WB3823-PfBC0621), CD8 α 및 TCR α/β (IP26, BioLegend) 및 DAPI(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 10 또는 11일차에 수행되었다.

[0656] (iv) 항원-특이적 세포 분류

[0657] 12일차에 세포를 수집하고 제조업체의 지침에 따라 다양한 기타 항원에 특이적인 dCODE dextramers®(Immudex)

와 함께 A*02:01 HPV16 E7₁₁₋₁₉(YMLDLQPET) dCODE dextramer®(Immudex)로 염색했다. 세포를 세정한 다음 10-11일차에 CD8 α 및 TCR α/β에 특이적인 항체와 DAPI로 염색하고 텍스트라머-양성 세포(CD8 α⁺, DAPI⁻, TCR α/β⁺, 텍스트라머⁺)를 Sony SH800S 세포 분류기(Sony Biotechnology, 캘리포니아주 산호세 소재), BigFoot 세포 분류기(ThermoFisher Scientific) 또는 MoFlo® Astrios 세포 분류기(Beckman Coulter, 캘리포니아주 브레이크 소재)를 사용하여 분류했다. 분류된 세포에 10x Genomics 플랫폼(캘리포니아주 플레즌튼 소재)을 사용하여 단일 세포 TCR α/β 시퀀싱을 실시했다.

[0658] (v) 10x Genomics 플랫폼을 사용한 다중화된 NGS 및 분석

[0659] 단일-세포 라이브러리는 세포 표면 단백질 & 면역 수용체 맵핑(10x Genomics, 프로토콜 CG000330 Rev A)을 위한 기능 바코드 기술을 갖는 10x Chromium Next GEM 단일 세포 5' 시약 키트 v2(Dual Index)에 따라 준비되었다. 최대 15,000개의 세포를 액적(GEM)에 포착하고 제조업체의 지침에 따라 처리하여 VDJ 및 세포 표면 단백질 정보를 생성하는 라이브러리를 얻었다. 완전히 조립된 라이브러리는 Illumina NextSeq™ 2000 기기(Illumina) 상에서 시퀀싱되었다.

[0660] 서열화된 VDJ 및 세포 표면 단백질 라이브러리는 각각 Cell Ranger 6.0.0 VDJ 및 COUNT 파이프라인(10x Genomics)을 사용하여 처리되었다. dCODE dextramers®(Immudex)를 측정하는 세포 표면 단백질 데이터셋을 이용하여 VDJ 데이터를 역다중화하여 각 TCR에 의해 어떤 에피토프가 인식되는지 결정했다. 주어진 세포 바코드에 대해 총 텍스트라머 계수가 10보다 크고 하나의 텍스트라머가 총 계수의 >90%를 차지하는 경우 표적 에피토프가 세포 바코드에 할당되었다. VDJ와 세포 표면 단백질 라이브러리 사이에 공유된 세포 바코드를 활용하면 각 시퀀싱된 TCR의 표적을 식별할 수 있다.

[0661] h. HPV16-E7₁₁₋₁₉-특이적 TCR을 발현하기 위한 T 세포 조작(도 15)

[0662] PBMCS는 자동화된 세포 처리 시스템을 사용하여 HLA-A*02:01-양성 건강한 공여자 백혈구로부터 분리되었다. 분리, 세정 및 농축된 PBMC를 전기천공하여 트랜스포사제-인코딩 mRNA 및 트랜스포존 나노플라스미드 벡터를 전달했다. 전기천공 후, 세포를 기본 배양 배지에서 하룻밤 동안 휴지하도록 하였다. 전기천공-후 24시간에, 세포는 CD3/CD28/CD2 T-세포 활성화제 및 성장-자극 사이토카인으로 활성화되었다. 조작된 세포의 농축은 소분자의 존재에서 선택적 성장 이점을 통해 배양 확장 단계 동안 수행되었다. 확장된 세포를 15일차에 수확하고 냉동보존 배지에 재구성했다. 자동 제어 속도 냉동 프로그램을 사용하여 세포를 동결보존했다. 데이터는 도 15에 도시되어 있다.

[0663] i. 재료

[0664] 세포주

[0665] · Lenti-X: Takara Bio USA, 632180

[0666] · HEK 293T cells: ATCC, CRL-3216

[0667] · T2: ATCC, CRL-1992

[0668] · CaSki: ATCC, CRL-1550

[0669] · NCI-H1792: ATCC, 5895

[0670] · SCC090: ATCC, CRL-3239

[0671] · SCC152: ATCC, CRL-3240

[0672] · SiHa: ATCC, HTB-35

[0673] · CAL-12T: DSMZ, ACC 443

[0674] · THP-1: ATCC, TIB202

[0675] · TF-1: ATCC, CRL-2003

[0676] · OVCAR-3: ATCC, HTB-161

- [0677] · SNU-475: ATCC, CRL-2236
- [0678] · ChaGo-K-1: ATCC, HTB-168
- [0679] · JVM2: ATCC, CRL-3002
- [0680] · L363: DSMZ, ACC 49
- [0681] · SET-2: DSMZ, ACC 608
- [0682] · CMK: DSMZ, ACC 392
- [0683] · OCI-M1: DSMZ, ACC529
- [0684] · OCI-M2: DSMZ, ACC619
- [0685] 건강한 인간 임차/iPS-유래된 세포
- [0686] · 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC): PromoCell, C-12200(로트 번호 466Z026)
- [0687] · HUVEC-인간 제대 정맥 내피 세포, 단일 공여자, EGM™: Lonza, CC-2517(로트 번호 0000246083)
- [0688] · 인간 폐 섬유아세포(HPF): PromoCell, C-12360(로트 번호 474Z024.2, 446Z03, 1474Z031.2, 1081503.2)
- [0689] · 인간 소기도 상피 세포(HSAEpC): PromoCell, C-12642(로트 번호 467Z033, 467Z025.2)
- [0690] · 피하 인간 백색 지방전구세포(HWP): PromoCell, C-12735(로트 번호 454Z006, 467Z014)
- [0691] · 인간 대동맥 평활근 세포(HAoSMC): PromoCell, C-12533(로트 번호 453Z011.6, 470Z011.2)
- [0692] · 인간 심장 근세포(HCM): PromoCell, C-12810(로트 번호 463Z016.2, 470Z011.9, 472Z002.3)
- [0693] · iCell 정상세포 키트, 01434: Fujifilm Cellular Dynamics
- [0694] · 정상 인간 정상세포(NHA): Lonza, CC-2656(로트 번호 0000672445)
- [0695] · 인간 간 정상세포(HHSteC): Creative Bioarray, CSC-C1496(로트 번호 C212011, C212641)
- [0696] · 인간 간 정상세포(HHSteC): ScienCell Research Laboratories, 5300(로트 번호 25914)
- [0697] · 정상 인간 표피 세포(NHDF): PromoCell, C-12300(로트 번호 471Z018.2), C-12302(로트 번호 472Z001.3, 477Z023.2)
- [0698] · 인간 심장 섬유아세포(HCF): PromoCell, C-12360(로트 번호 472Z002.2, 475Z017.1)
- [0699] · 정상 인간 표피 각질세포(NHEK): PromoCell, C-12003(로트 번호 451Z014.1)
- [0700] · 간세포: In Vitro ADMET Laboratories, 82006 (로트 번호 HH1052, HH1165, HH1186)
- [0701] · 인간 자궁경부 상피 세포(HCerEpC): iXCells Biotechnologies, 10HU-237(로트 번호 202099)
- [0702] · 인간 소장 상피 세포(HSIEpC): iXCells Biotechnologies, 10HU-237(로트 번호 201457)
- [0703] · 인간 자궁경부 상피 세포(HCerEpC): ATCC, PCS-480-011(로트 번호 70029809)
- [0704] · 인간 유방 상피 세포(HMEpC): ATCC, PCS-600-010(로트 번호 70043304)
- [0705] · 골격근 세포(SkMC): ATCC, PCS-950-010(로트 번호 81202212)
- [0706] · 인간 골수 단핵 세포(HBMMNC): StemCell Technologies, 70001.2(로트 번호 2208422001, 2208412006, 2208412008)
- [0707] 동물
- [0708] · NCG 마우스(NOD-*Prkdc*^{em26Cd52}*I12rg*^{em26Cd22}/NjuCr1): Charles River Laboratories
- [0709] 배지 및 보충물
- [0710] · X-VIVO 15, 무혈청 조혈 세포 배지, L-글루타민, 젠타마이신 및 페놀 레드 함유: Lonza, 04-418Q

- [0711] · 인간 남성 AB 혈청(열-불활성화): Sigma Aldrich, H3667-100ML
- [0712] · 페니실린 스트렙토마이신: Gibco, 15149-122
- [0713] · GlutaMAX™ 보충물: Fisher Scientific, 35050061
- [0714] · RPMI-1640 배지: ATCC, 30-2001
- [0715] · 우태아 혈청(FBS), 열-불활성화됨: Gibco, A3840102
- [0716] · IMDM: ATCC, 30-2005
- [0717] · RPMI 배지 1640 (1x) [+]
4.5 g/L D-글루코스, [+]
2.383 g/L HEPES 완충제, [+]
L-글루타민, [+]
1.5 g/L 소듐 바이카르보네이트, [+]
110 mg/L 소듐 피루베이트: Gibco, A10491-01
- [0718] · DMEM 배지(1X) [+]
4.5 g/L D-글루코스, [+]
L-글루타민, [+]
3.7 g/L 소듐 바이카르보네이트: Thermo Fisher Scientific, 11965084
- [0719] · DMEM(1x) [+]
4.5 g/L D-글루코스, [+]
L-글루타민, [-]
소듐 피루베이트: Gibco, 11965
- [0720] · OptiPRO™ SFM 배지: Thermo Fisher Scientific, 12309019
- [0721] · EMEM 배지: ATCC, 30-2003
- [0722] · 내피세포 성장 배지(즉시 사용 가능): PromoCell, C-22010
- [0723] · 섬유아세포 성장 배지(즉시 사용 가능): PromoCell, C-23010
- [0724] · 기도 상피 세포 성장 배지(즉시 사용 가능): PromoCell, C-21060
- [0725] · 지방전구세포 성장 배지(즉시 사용 가능): PromoCell, C-27410
- [0726] · 지방전구세포 분화 배지(즉시 사용 가능): PromoCell, C-27436
- [0727] · 지방세포 영양 배지(즉시 사용 가능): PromoCell, C-27438
- [0728] · 평활근세포 성장배지 2(즉시 사용 가능): PromoCell, C-22062
- [0729] · 근세포 성장 배지(즉시 사용 가능): PromoCell, CC-22070
- [0730] · DMEM 배지/F-12, HEPES: Thermo Fisher Scientific, 11330
- [0731] · N-2 보충제: Thermo Fisher Scientific, 17502048
- [0732] · AGM™ 성상교세포 성장 배지 BulletKit™: Lonza, CC-3186
- [0733] · SuperCult® 성상 세포 배지: Creative Bioarray, CM-1193W
- [0734] · 성상 세포 배지: ScienCell Research Laboratories, 5301
- [0735] · DetachKit™: PromoCell, C-41220
- [0736] · TrypLE™ 익스프레스: Thermo Fisher Scientific, 12605-010
- [0737] · 섬유아세포 성장 배지 3(즉시 사용 가능): PromoCell, C-23025
- [0738] · UCRM™ - 범용 냉동 보존 회수 배지, 50mL: In Vitro ADMET Laboratories, 81015
- [0739] · UPCM™ - 범용 일차 세포 도말 배지, 50mL: In Vitro ADMET Laboratories, 81016
- [0740] · 각질세포 성장 배지 2(즉시 사용 가능): PromoCell, C-20011
- [0741] · 상피 세포 성장 배지: iXCells Biotechnologies, MD-0041
- [0742] · 유방 상피 세포 기저 배지: ATCC, PCS-600-030
- [0743] · 유방 상피 세포 성장 키트: ATCC, PCS-600-040
- [0744] · 지방, 체대 및 골수-유래 MSC용 중간엽 줄기세포 기저 배지: ATCC, PCS-500-030

- [0745] · 일차 골격근 성장 키트: ATCC, PCS-950-040
- [0746] 완충제
- [0747] · EasySep 완충제: StemCell Technologies, 20144
- [0748] · DPBS(Ca²⁺/Mg²⁺ 없음): Gibco, 14190-122
- [0749] 사이토카인
- [0750] · 재조합 인간 IL-2: Sigma Aldrich, 11147528001
- [0751] · 재조합 인간 IL-2: PeproTech, 200-02
- [0752] · 재조합 인간 IL-7: R&D Systems, 219-IL-025
- [0753] · 재조합 인간 IL-15: R&D Systems, 247-ILB-005
- [0754] · 재조합 인간 TGFβ1: R&D Systems, 7754-BH-025/CF
- [0755] 키트
- [0756] · EasySep™ 인간 T 세포 분리 키트: StemCell Technologies: 17951
- [0757] · 32개 샘플용 Ella™ 심플 플렉스 키트: ProteinSimple: SPCKB-PS-003027
- [0758] · StraightFrom® Leukopak® CD8 마이크로비드 키트: Miltenyi Biotech, 130-117-019
- [0759] · 아넥신 V 마이크로비드 키트: Miltenyi Biotech, 130-090-201
- [0760] · 심플 플렉스 인간 IFN-감마(3세대) 카트리지: ProteinSimple, SPCKB-PS-002574
- [0761] 항체 및 염색 시약
- [0762] · CD3 단클론 항체(OKT), 기능 등급: eBioscience 16-0037-81
- [0763] · 항-인간 CD8 α PerCp-Cy5.5(클론: HIT8a): BioLegend: 300924
- [0764] · 항-인간 CD4 APC-Cy7(클론: OKT4): BioLegend: 317418
- [0765] · 항-인간 CD56 PE(클론: 5.1H11): BioLegend: 362508
- [0766] · 항-인간 CD57 PE(클론: HCD57): BioLegend: 322312
- [0767] · 항-인간 CD34 Alexa Fluor 488: (클론: QBEND/10): R&D Systems, FAB7227G
- [0768] · 항-인간 HLA-A2 PE(클론: BB7.2): BioLegend, 343306
- [0769] · 항-인간 TCR α/β PE-Cy7(클론: IP26): BioLegend: 306720
- [0770] · 항-인간 HLA-A,B,C APC 항체: BioLegend, 311410
- [0771] · 고정가능한 생존성 Dye eFluor 660(APC 채널) Thermo Fisher Scientific: 65-0864-14
- [0772] · DAPI: Thermo Scientific: Thermo Scientific, 62248
- [0773] · Cytotfix: BD Biosciences, 554655
- [0774] · 항-인간 CD3 FITC: (클론 HIT3a): Biolegend:300306
- [0775] · 항-인간 CD34 비오틴닐화: (클론 QBEND/10): Thermo Fisher Scientific: MA5-16924
- [0776] · 항-인간 TGFβRII PE: (클론 W17055) 생물학적 전설: 399704
- [0777] · 항-IFNγ PE: (클론 B27): Biolegend: 506507
- [0778] · 항-인간 Fc 수용체 결합 억제제: Thermo Fisher Scientific: 16-9161-73
- [0779] · LIVE/DEAD™ 고정가능한 근적외선 염료: Thermo Fisher Scientific: L10119

- [0780] · 스트랩타비딘 Brilliant Violet™ 41: BD Biosciences: 563259
- [0781] · GolgiPlug™: BD Biosciences: 555029
- [0782] · Perm/Wash™ 완충액: BD Biosciences: 554723
- [0783] · CellTrace™ Violet(CTV): ThermoFisher, C34557
- [0784] · 고정가능한 생존성 Dye eFluor® 660: Thermo Fisher Scientific: 65-0864-14
- [0785] · CountBright™ 절대 계수 비드: Fisher Scientific: C36950
- [0786] · 7-AAD 생존력 염색 용액: BioLegend, 420404
- [0787] 캡티드
- [0788] · HPV16-E7₁₁₋₁₉ (YMLDLQPET): Genscript
- [0789] 텍스트라머
- [0790] · HLA-A*02:01 YMLDLQPET HPV16-E7₁₁₋₁₉ 텍스트라머: Immundex
- [0791] CRISPR-Cas9 및 전기천공 시약
- [0792] · Alt-R® S.p. Cas9 뉴클레아제 V3 (로트 번호0000417827): IDT, 1081059
- [0793] · Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA (로트 번호0000415438): IDT, 1072534
- [0794] · 4D-Nucleofector™ 코어 유닛(Core Unit): Lonza, AAF-1002B
- [0795] · 4D-Nucleofector™ X 유닛: Lonza, AAF-1002X
- [0796] · SE Cell Line 4D-Nucleofector™ X 키트 L: Lonza V4XC-1012
- [0797] 조직 배양 플레이트
- [0798] · G-Rex® 24-웰 플레이트: Wilson Wolf, 80192M
- [0799] · G-Rex® 6-웰 플레이트: Wilson Wolf, 80240M
- [0800] · G-Rex® 100: Wilson Wolf, 800400
- [0801] · VECCELL 96-웰 플레이트: Cosmo Bio Co, VCL-V96WGPB-10-EX
- [0802] · TC-처리된 6-웰 플레이트: Corning Costar, 3506
- [0803] · TC-처리된 24-웰 플레이트: Corning Costar, 3524
- [0804] · 96-웰 평면-바닥 플레이트: Corning Costar, 3595
- [0805] · 384-웰 평면-바닥 플레이트: Corning Costar, 3764
- [0806] · HYPERflask® M: 코닝, 10020
- [0807] · CellSTACK®, 벤트 캡이 있는 챔버 5개, Corning, 3313
- [0808] · 70uM 나일론 셀 스트레이너, Corning, 431751
- [0809] · CellAdhere™ 콜라겐 I-코팅된, 96-웰 평면-바닥 플레이트: StemCell Technologies, 100-0366
- [0810] · PureCol™ 코팅된 6-웰 플레이트: MilliporeSigma, CC302
- [0811] 패키징 및 렌티바이러스 생산 시약
- [0812] · Lenti-X™ GoStix™ Plus: Takara, 631281
- [0813] · jetPRIME® 형질감염 시약: Polyplus-transfection, 114-75

- [0814] · Vivaspin® 20: Sartorius, VS2041
- [0815] · Vivaflow® 50 카세트: Sartorius, VF05P4
- [0816] 정량적 RT-PCR 시약
- [0817] · RNeasy® 미니 키트: Qiagen, 74104
- [0818] · TaqMan® Fast Advanced 마스터 믹스: Thermo Fisher Scientific, 4444557
- [0819] · SuperScript™ IV VIL0™: Thermo Fisher Scientific, 11756050
- [0820] · RT-PCR 등급 물: Thermo Fisher Scientific, AM9935
- [0821] 류코팩 처리 시약:
- [0822] · 다중-24 컬럼 블록: Miltenyi Biotec, 130-095-692
- [0823] · 림프구 분리 배지: Corning, 25-072-CV
- [0824] 기타 시약
- [0825] · ImmunoCult™ 인간 CD3/CD28/CD2 T 세포 활성화제: StemCell Technologies, 10970
- [0826] · 폴리-L-오르니틴 용액 0.01%: Millipore-Sigma, P4957-50ML
- [0827] · CryoStor CS10: StemCell Technologies, 07930
- [0828] · PBS에서의 ViaStain AO/PI 염색 용액: Nexcelom Bioscience, CS2-0106-5mL
- [0829] · 누르세트리신: GoldBio, N-500-1
- [0830] · 퓨로마이신: Gibco, A11138-03
- [0831] · Mirus TransIT, Mirus Bio MIR 2704
- [0832] · 폴리브렌: EMD Millipore, TR-1003-G
- [0833] · Incucyte® NucLight 레드 렌티바이러스 시약(EF-1 알파 프로모터, 퓨로마이신 선택), Sartorius, 4476
- [0834] · 라미닌: Millipore-Sigma, L2020
- [0835] · 폴리-L-라이신 10 mg/mL: ScienCell Research Laboratories, 0413
- [0836] · Corning® Matrigel® 기저막 매트릭스 고농도(HC), LDEV-유리, 10mL, 제품 번호 354248
- [0837] **실시예 2: HPV16-E7₁₁₋₁₉(YMLDLQPET)에 특이적인 TCR의 발견**
- [0838] 일차 인간 나이브 CD8 T 세포로부터 항원-특이적 TCR의 신속한 클로닝을 가능하게 하는 고처리량 TCR 발견 플랫폼이 개발되어 HPV16-E7₁₁₋₁₉(YMLDLQPET)에 특이적인 TCR을 식별하는 데 사용되었다(도 1). 총 459개의 TCR이 발견되었다. 59/293 및 15/161 HPV16-E7₁₁₋₁₉-특이적 TCR은 각각 2개의 별도 독점 VAYG 스크린에서 식별되었다(도 2 및 도 6). TCR의 서브세트는 다양한 세포주를 사용하여 원하는 세포 표면 발현 및 이펙터 기능 예컨대 세포독성 또는 사이토카인 생산을 갖는 것으로 식별되었다(도 3, 도 4 및 도 7)(표 6 참조). 도 8은 TCR-28이 비교자 TCR에 비해 비슷한 세포독성 및 월등한 이펙터 기능을 나타냄을 입증하는 요약 결과를 제공한다.

표 6: 세포주 발현에 대한 참고

세포주	세포주 유래	HLA-A*02:01	HPV16
CaSki	자궁경부 암종	+	+
SCC152	하인두의 편평상피 세포 암종	+	+
SCC090	혀의 기저의 편평상피 세포 암종	+	+
SiHa	자궁경부 암종	-	+
NCI-H1792	폐 암종	+	-

부가하여, HPV16-E7₁₁₋₁₉-특이적 TCR E7-11-28이 동종반응성 검정에서 스크리닝되었다. TCR28은 일반적으로 20% 초과인 표적 세포 억제로 정의되는 최소의 동종-반응성을 나타냈고(예를 들어, 테스트된 110개의 서로 다른 HLA 유형 중 108개에 대해 검출가능한 동종-반응성은 없음)(도 5), 항원-특이적 T 세포 증식을 유도했고(도 9), 추정되는 표적-외(도 11) 또는 건강한 인간 일차 세포(도 12)를 발현하는 암 세포주와 반응하지 않았고, 생체내에서 종양 성장을 효율적으로 제어했다(도 13). 더욱이, DN-TGFβRII를 사용함에 의한 것과 같이 TGFβ 시그널링을 억제하면 TSC-200-A02 T 세포가 TGFβ-매개된 억제에 저항성을 갖게 된다는 것이 입증되었다(도 14). 실제로, 대표적인 pNVVD154 및 pNVVD160 벡터에서 TCR E7-11-28의 발현 및 평가는 기능적 TCR 활성을 추가로 확인한다(도 15a-15c).

따라서, 바람직한 특징(예를 들어, 표적 인식, 세포 표면 발현, 세포독성 기능, 낮은 동종반응성 등)을 갖는 다양한 HPV16-E7₁₁₋₁₉-특이적 TCR이 식별되었고 본원에 기술되어 있다.

참조에 의한 통합

본원에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참조로서 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 나타난 것처럼 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다. 상충하는 경우, 본원의 임의의 정의를 포함하는 본 출원이 우선할 것이다.

또한, 공개 데이터베이스의 항목, 예컨대 World Wide Web at tigr.org의 The Institute for Genomic Research (TIGR) 및/또는 World Wide Web at ncbi.nlm.nih.gov의 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 의해 관리되는 것들과 같은 공개 데이터베이스의 항목과 관련된 접근 번호를 참조하는 임의의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩티드 서열이 전체적으로 참조로 포함된다.

등가물 및 범위

본 발명에 의해 포함되는 하나 이상의 구체예의 세부사항은 상기 설명에 기재되어 있다. 대표적인 예시적인 재료 및 방법이 상기에 기재되었지만, 본원에 기재된 것과 유사하거나 등가인 임의의 물질 및 방법이 본 발명에 포함되는 구체예의 실시 또는 시험에 사용될 수 있다. 본 발명과 관련된 다른 특징, 목적 및 이점은 상세한 설명으로부터 명백하다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 상충되는 경우, 상기 제공된 본 설명이 우선할 것이다.

당업자는 단지 관례적인 실험을 사용하여 본원에 기재된 본 발명에 의해 포함되는 특정 구체예에 대한 많은 등가물을 인지하거나 확인할 수 있을 것이다. 본 발명에 의해 포함되는 범위는 본원에 제공된 설명으로 제한되도록 의도되지 않으며, 이러한 등가물은 첨부된 청구범위에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

용어 "포함하는"은 개방된 것으로 의도되고 추가 요소 또는 단계의 포함을 허용하지만 이를 필요로 하지 않는다는 것이 또한 주목된다. 따라서, 용어 "포함하는"이 본원에서 사용되는 경우, 따라서 용어 "구성된"이 또한 포함되고 개시된다.

범위가 주어지는 경우, 종말점이 포함된다. 또한, 당업자의 맥락 및 이해로부터 달리 지시되거나 달리 명백하지 않는 한, 범위로서 표현되는 값은 문맥이 달리 명확하게 지시하지 않는 한, 본 발명에 포함되는 다양한 구체예

에서 언급된 범위 내의 임의의 특정 값 또는 하위범위에서 범위의 하한 단위의 10분의 1까지를 가정할 수 있다.

[0851] 또한, 종래 기술에 속하는 본 발명에 의해 포함되는 임의의 특정 구체에는 임의의 하나 이상의 청구항으로부터 명시적으로 배제될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 이러한 구체에는 당업자에게 공지된 것으로 간주되기 때문에, 배제가 본원에 명시적으로 제시되지 않더라도 배제될 수 있다. 본 발명에 포함되는 조성물의 임의의 특정 구체에(예를 들어, 임의의 항생제, 치료적 또는 활성 성분; 임의의 생산 방법; 임의의 사용 방법 등)는 선행 기술의 존재 여부와 무관하게 임의의 이유로 하나 이상의 청구범위로부터 배제될 수 있다.

[0852] 사용된 단어는 제한이 아니라 설명의 단어이며, 더 넓은 양태에서 본 발명에 의해 포함되는 진정한 범위 및 사상을 벗어나지 않으면서 첨부된 청구범위의 범위 내에서 변경될 수 있음이 이해되어야 한다.

[0853] 본 발명은 몇몇 설명된 구체예와 관련하여 어느 정도의 길이로 일부 구체적으로 설명되었지만, 이는 임의의 그러한 특정 또는 구체에 또는 임의의 특정 구체예로 제한되는 것으로 의도하는 것은 아니며, 종래 기술의 관점에서 이러한 청구범위의 가능한 가장 넓은 해석을 제공하고, 따라서 본 발명에 포함되는 의도된 범주를 효과적으로 포함하도록 첨부된 청구범위를 참조하여 해석되어야 한다.

도면

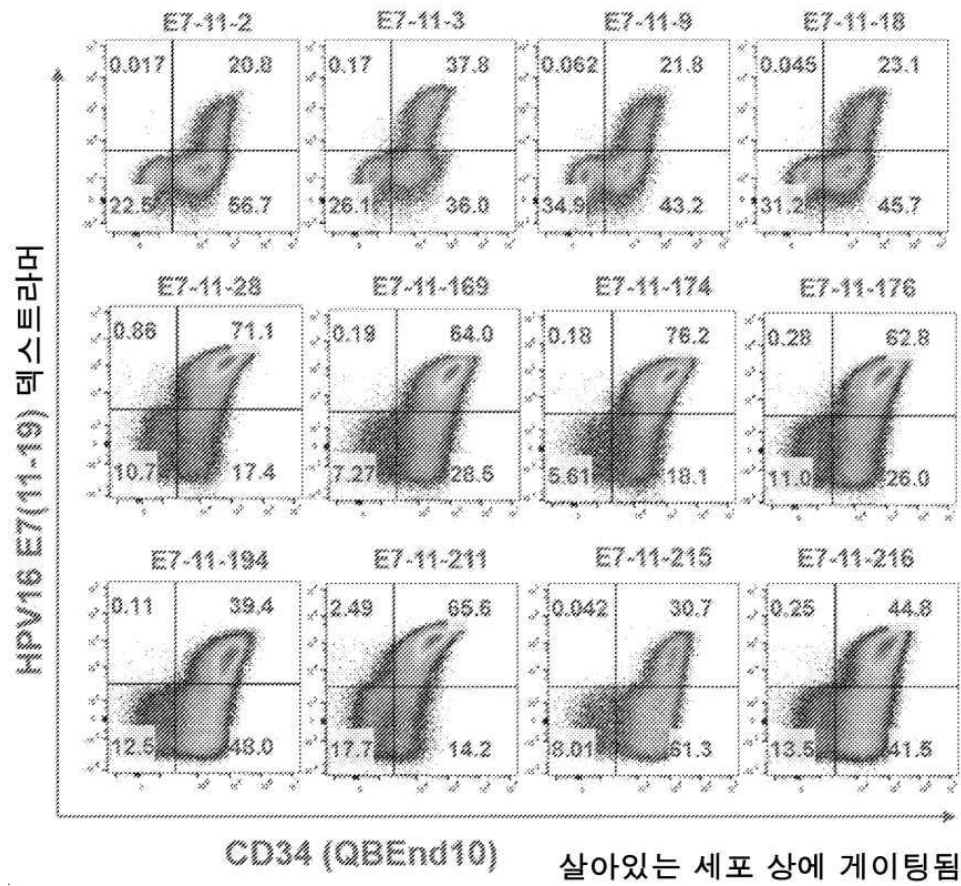
도면1

HPV16 E7₁₁₋₁₉ 펩티드 서열: YMLDLQPET

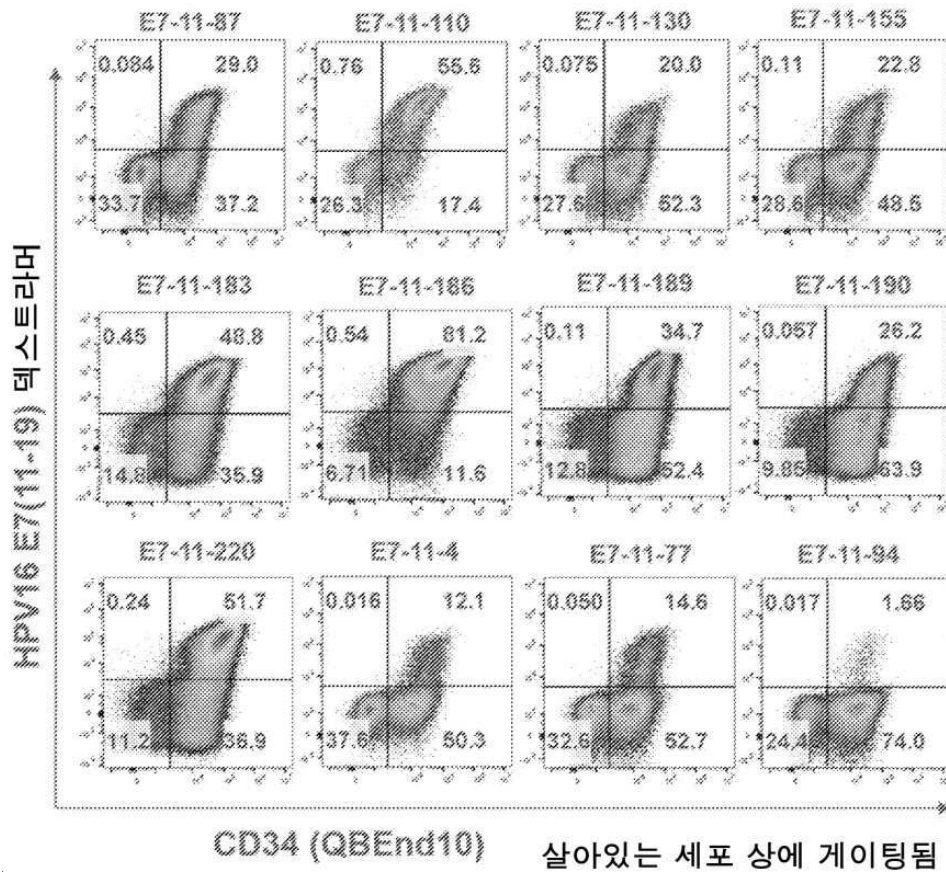
도면2

TCR	TCR	TCR	TCR
E7-11-28	E7-11-110	E7-11-190	E7-11-262
E7-11-18	E7-11-68	E7-11-216	E7-11-250
E7-11-5	E7-11-72	E7-11-177	E7-11-229
E7-11-4	E7-11-153	E7-11-211	E7-11-222
E7-11-2	E7-11-157	E7-11-183	E7-11-277
E7-11-19	E7-11-155	E7-11-174	E7-11-279
E7-11-3	E7-11-116	E7-11-176	E7-11-284
E7-11-9	E7-11-130	E7-11-189	E7-11-285
E7-11-64	E7-11-128	E7-11-194	E7-11-278
E7-11-94	E7-11-133	E7-11-271	E7-11-281
E7-11-77	E7-11-124	E7-11-272	E7-11-62
E7-11-87	E7-11-154	E7-11-273	E7-11-36
E7-11-100	E7-11-115	E7-11-220	E7-11-180
E7-11-106	E7-11-186	E7-11-239	E7-11-169
E7-11-61	E7-11-215	E7-11-245	

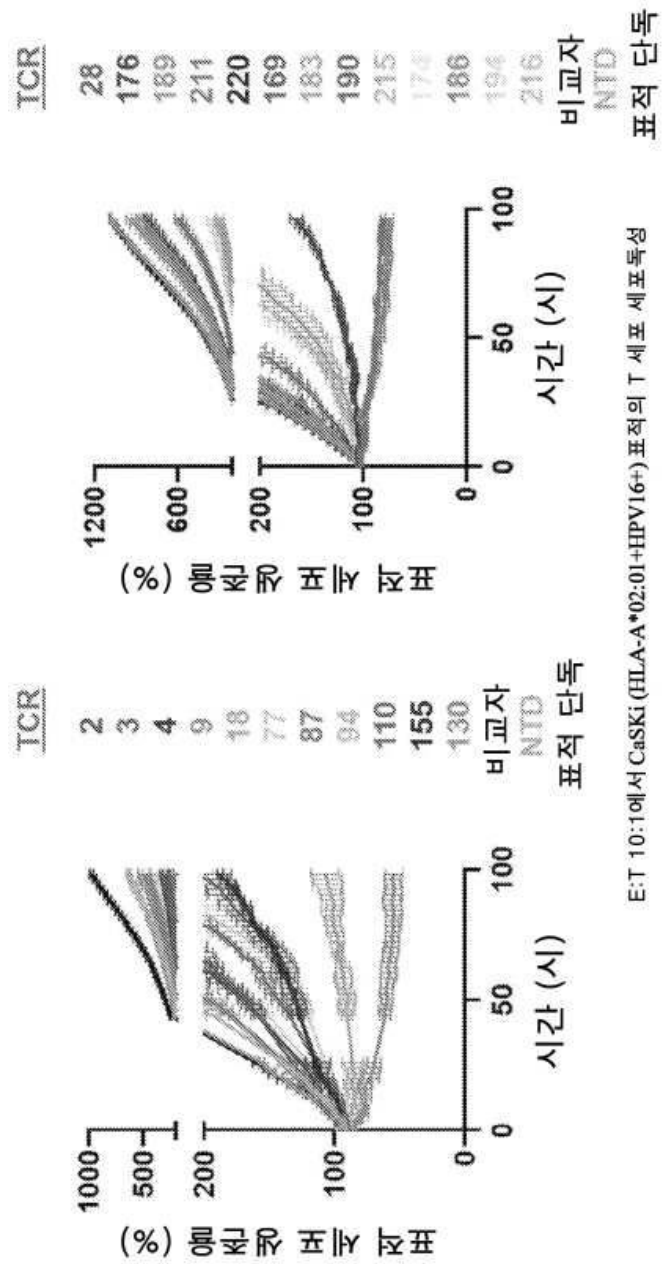
도면3aa



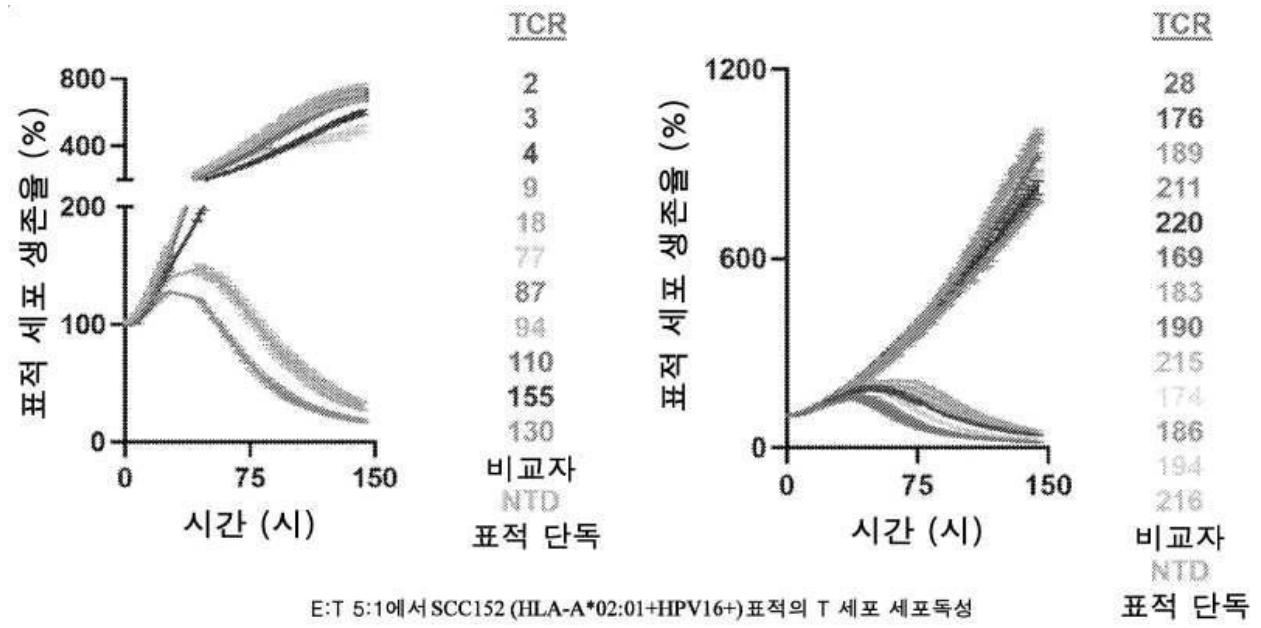
도면3ab



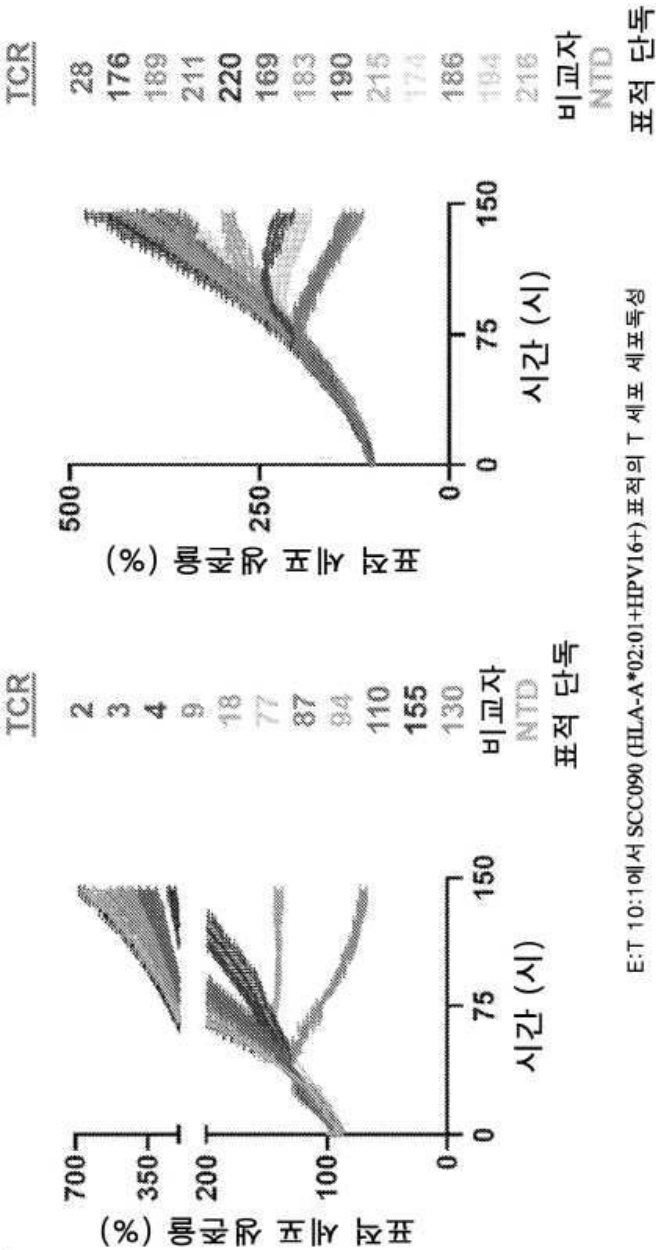
도면3b



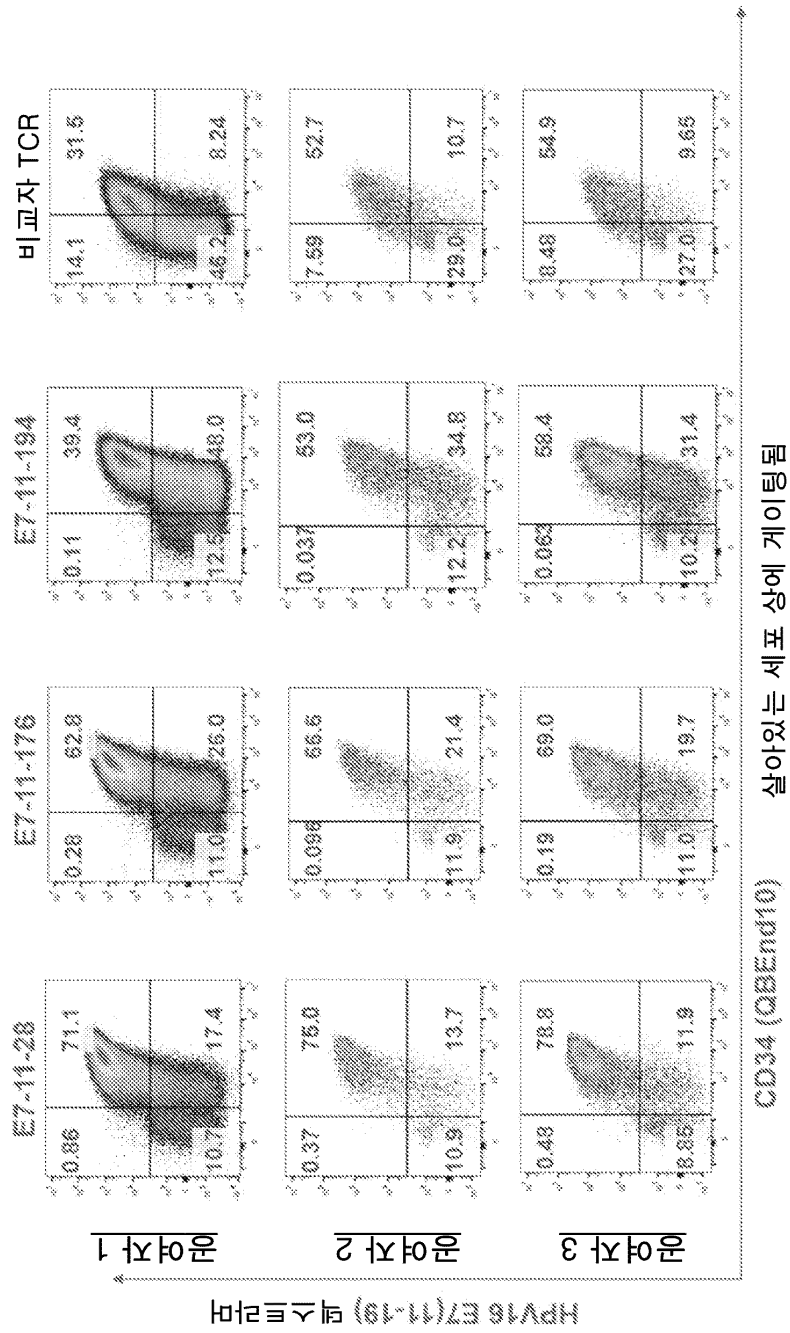
도면3c



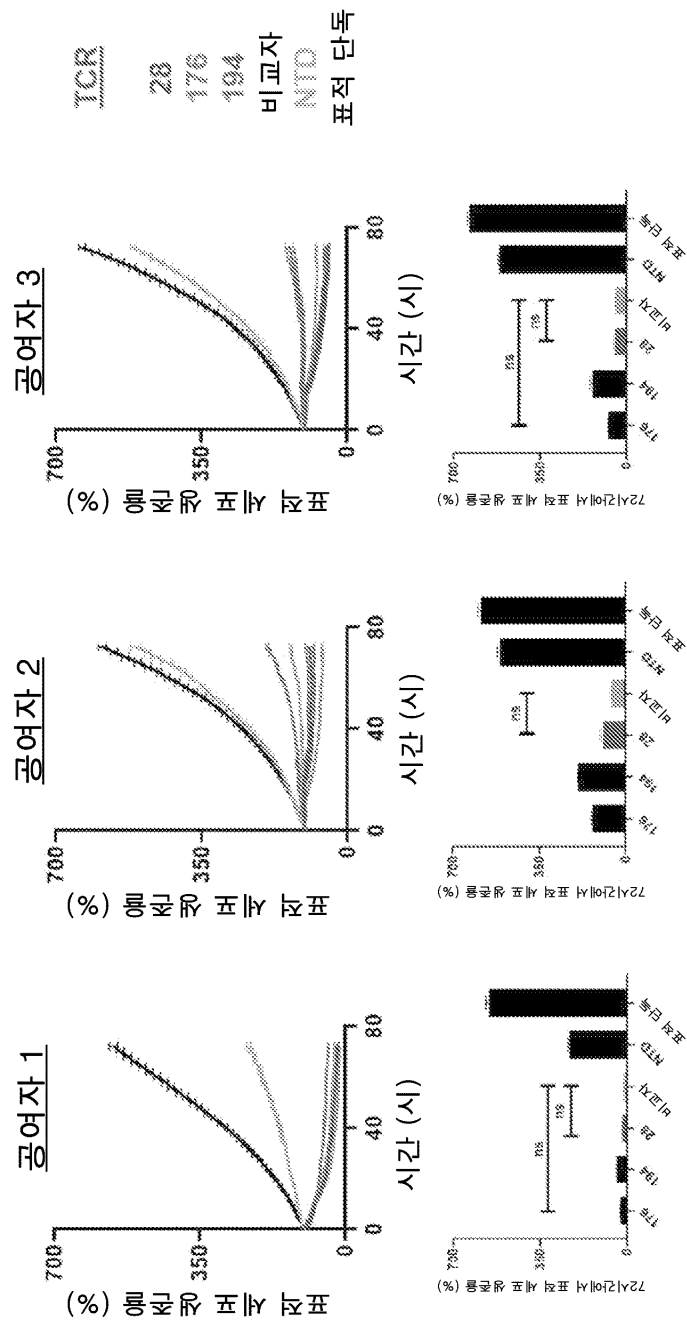
도면3d



도면4a

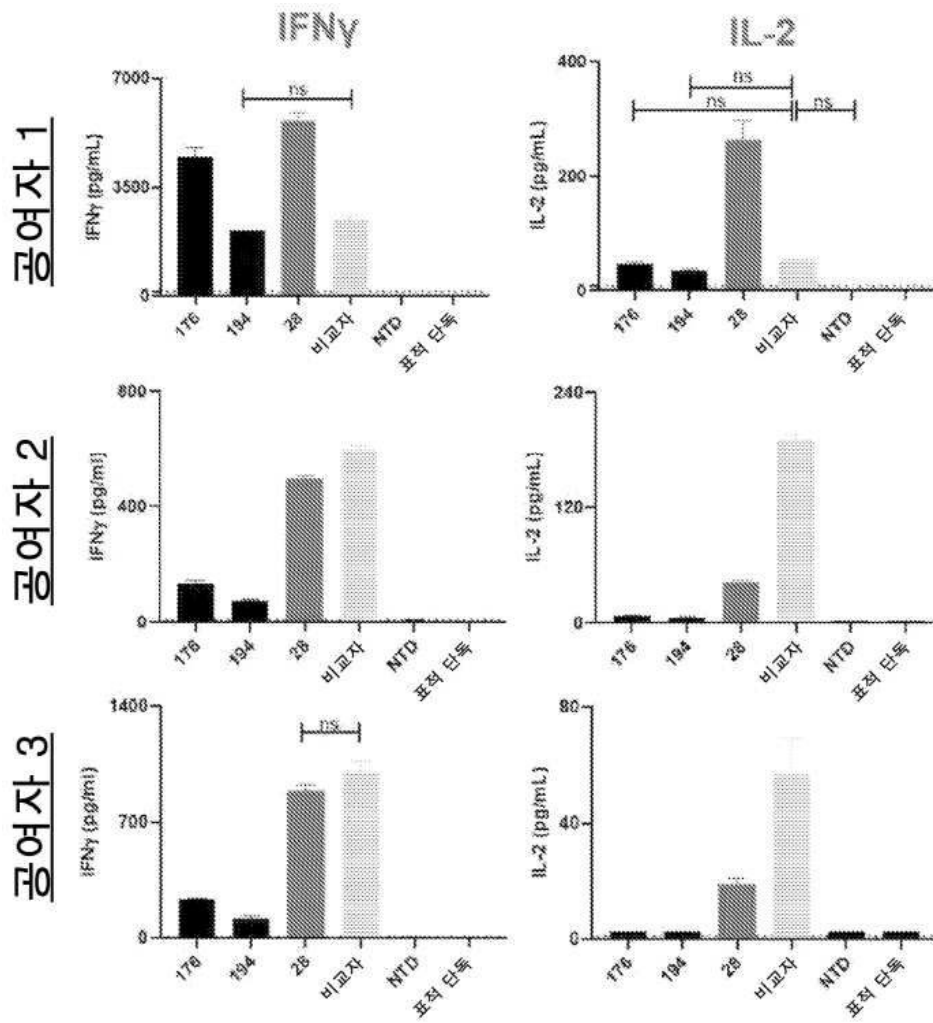


도면4b



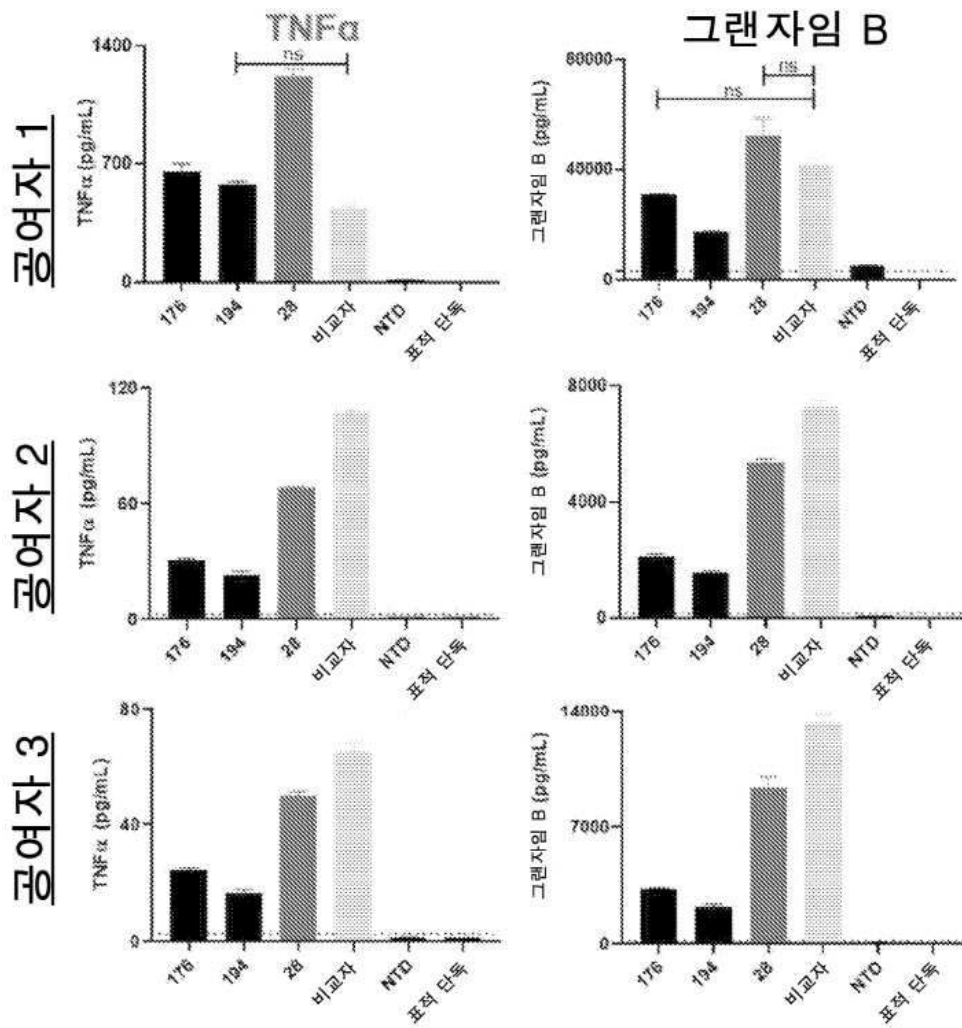
E:T 10:1에서 CaSki (HLA-A*02:01+HPV16+) 표적의 T 세포 세포독성

도면4ca



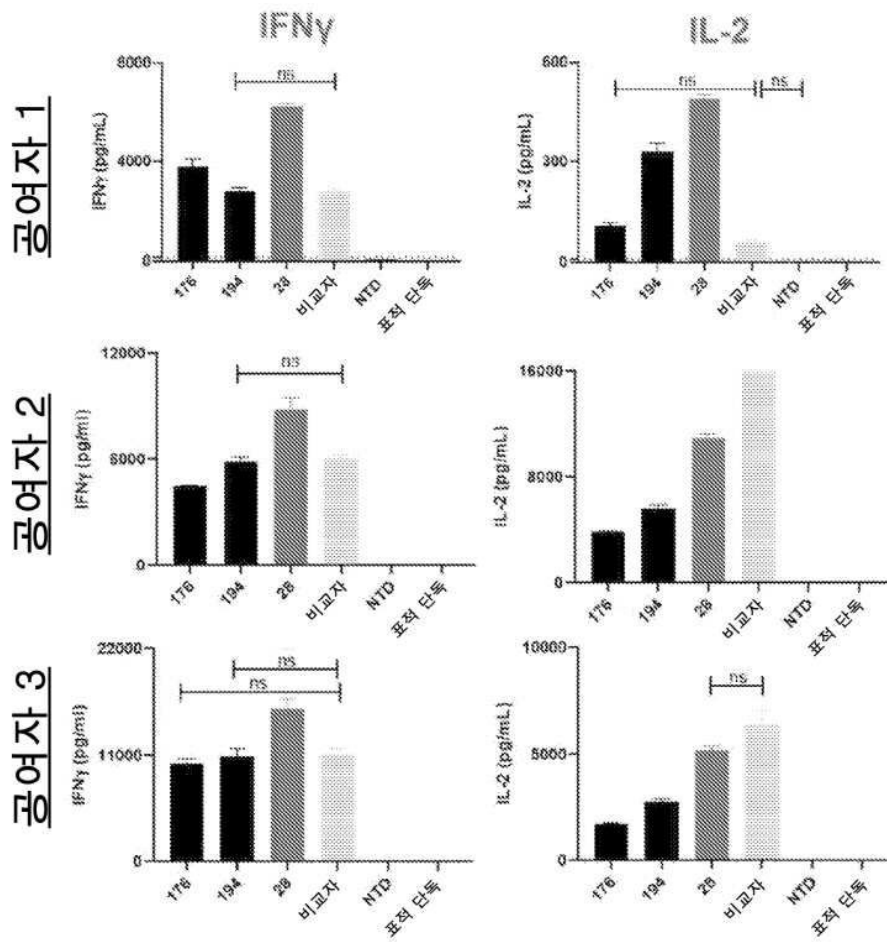
CaSki (HLA-A*02:01+HPV16+) 표적에 반응한 T 세포 사이토카인 생성

도면4cb



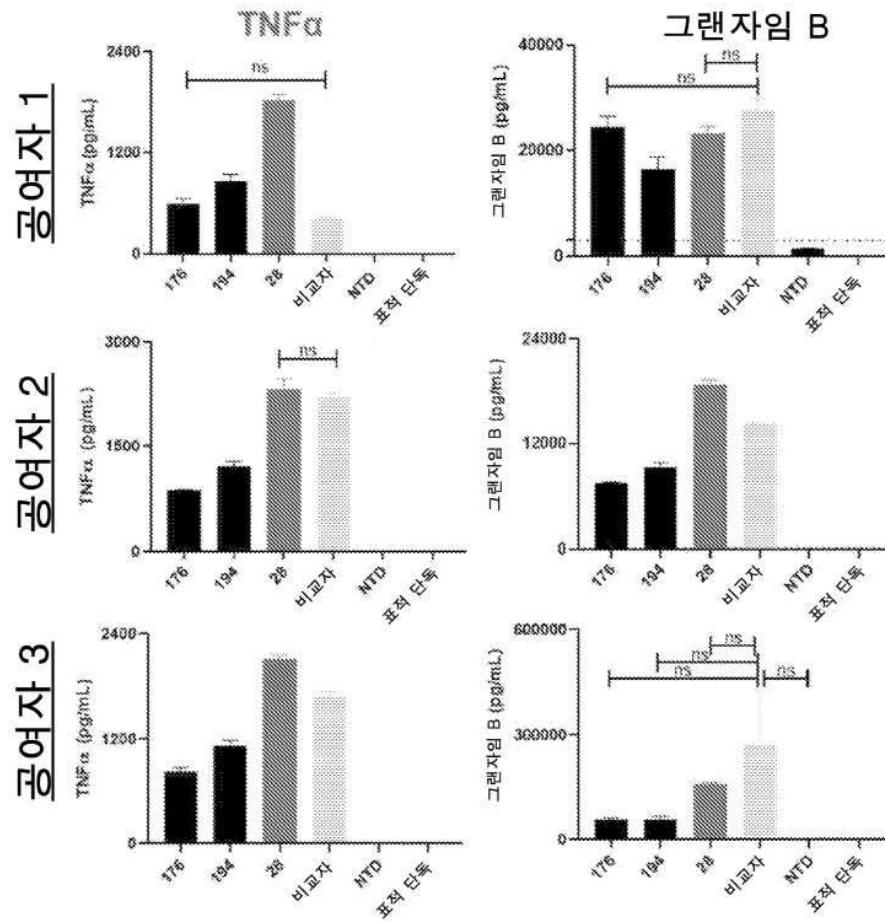
CaSki (HLA-A*02:01+HPV16+) 표적에 반응한 T 세포 사이토카인 생성

도면4ea



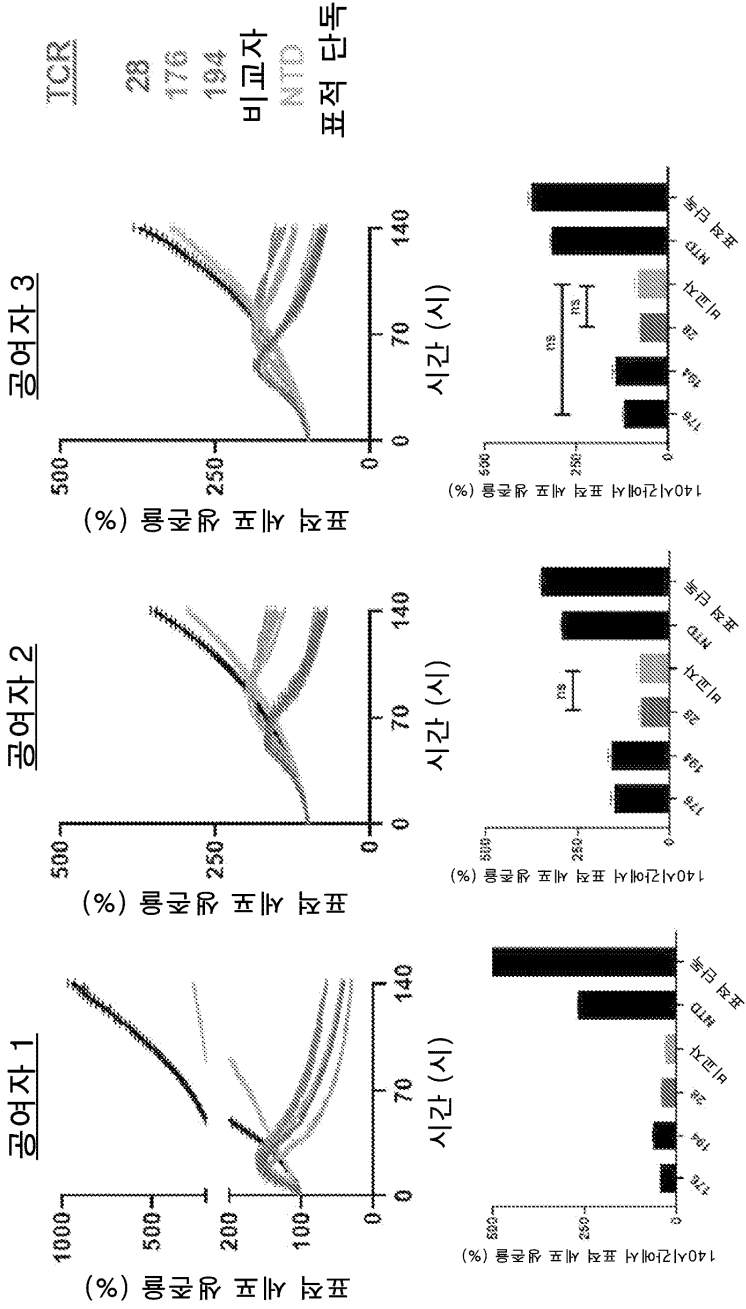
SCC152 (HLA-A*02:01+HPV16+) 표적에 반응한 T 세포 사이토카인 생성

도면4eb



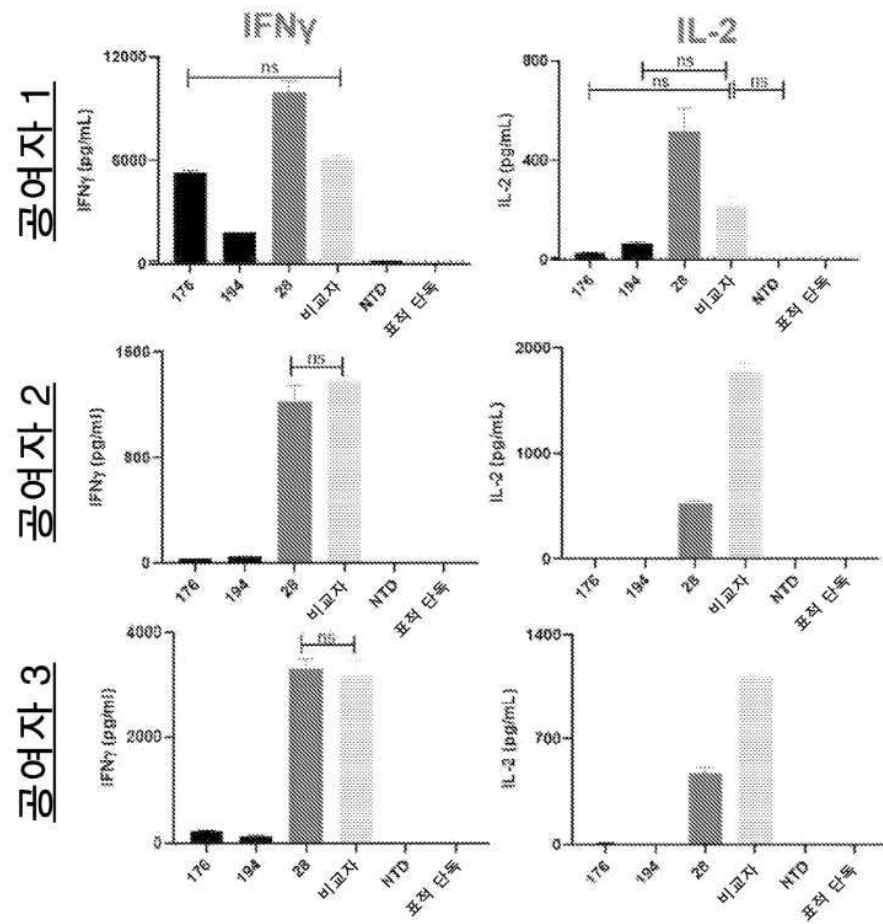
SCC152 (HLA-A*02:01+HPV16+) 표적에 반응한 T 세포 사이토카인 생성

도면4f



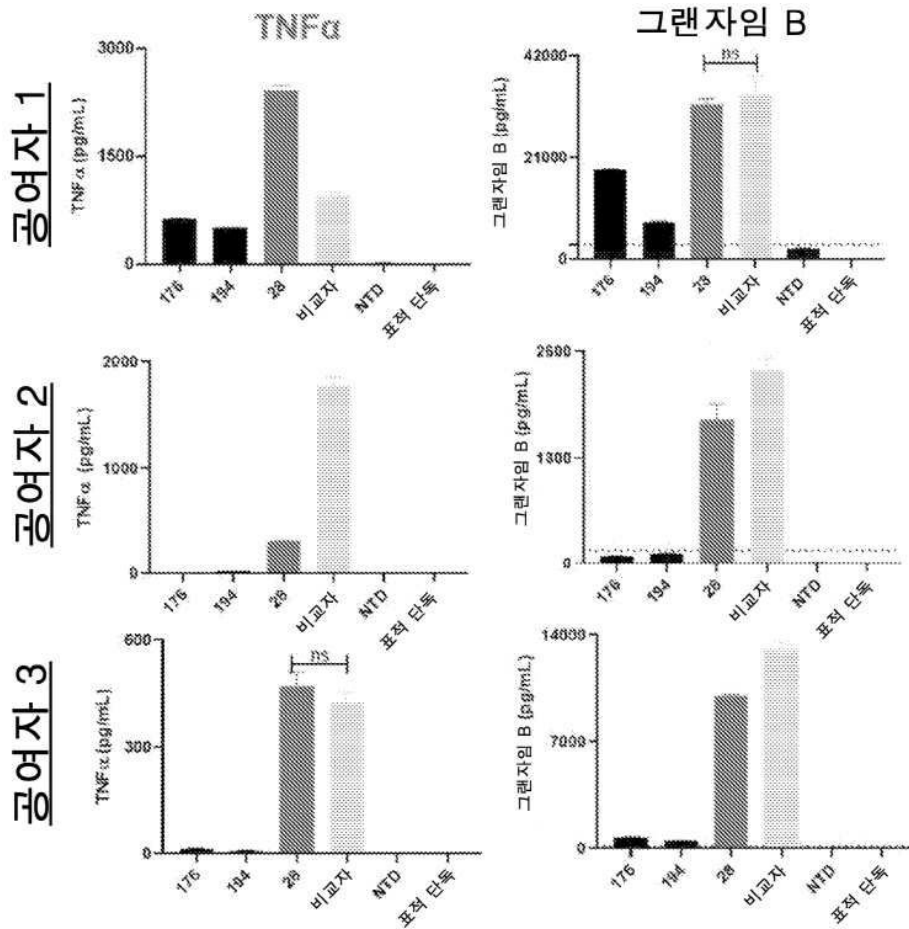
E:T 10:1에서 SCC090 (HLA-A*02:01+HPV16+) 표적의 T 세포 사이토카인 생성

도면4ga



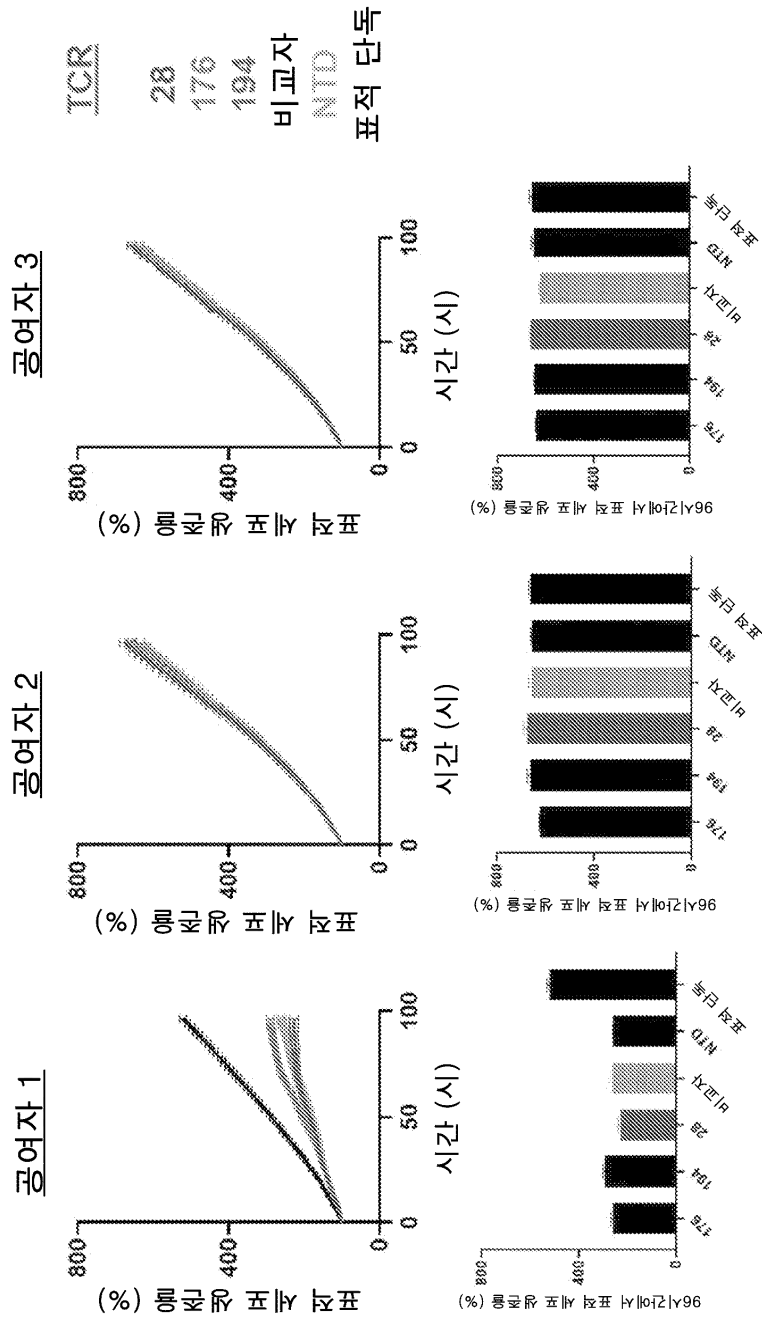
SCC090 (HLA-A*02:01+HPV16+) 표적에 반응한 T 세포 사이토카인 생성

도면4gb



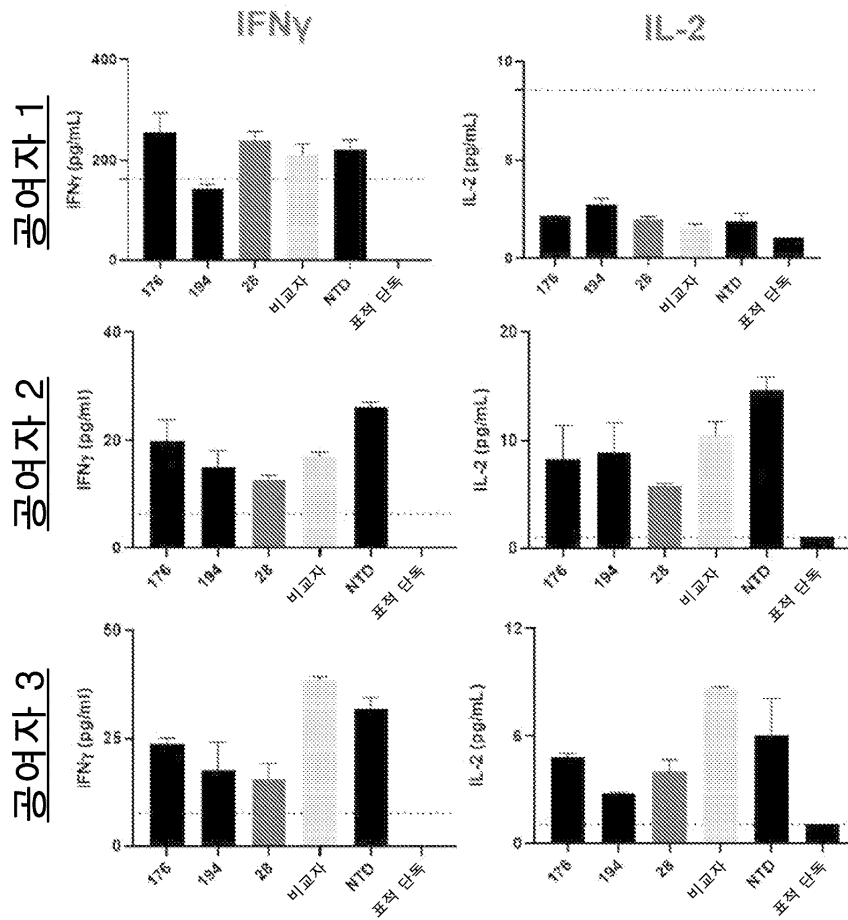
SCC090 (HLA-A*02:01+HPV16+) 표적에 반응한 T 세포 사이토카인 생성

도면4h



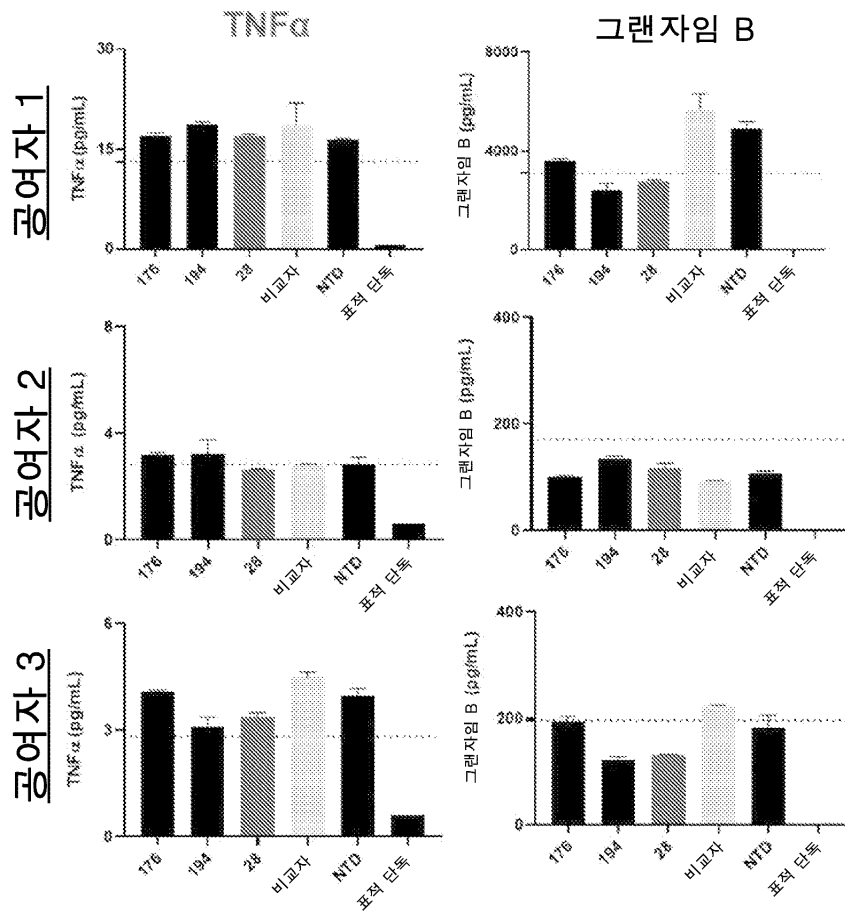
E:T 10:1에서 SIHa (HLA-A*02:01-HPV16+) 표적의 T 세포 사이토키인

도면4ia



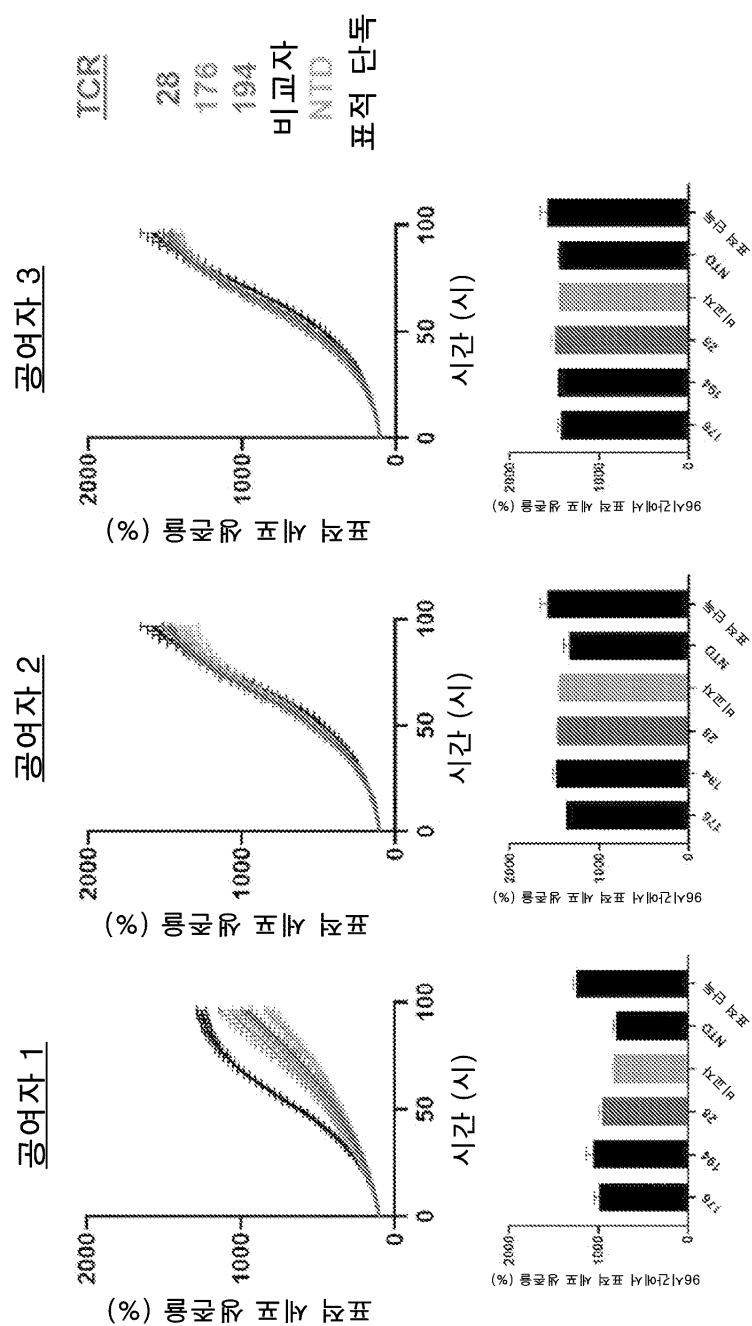
SiHa (HLA-A*02:01-HPV16+) 표적에 반응한 T 세포 사이토카인 생성

도면4ib



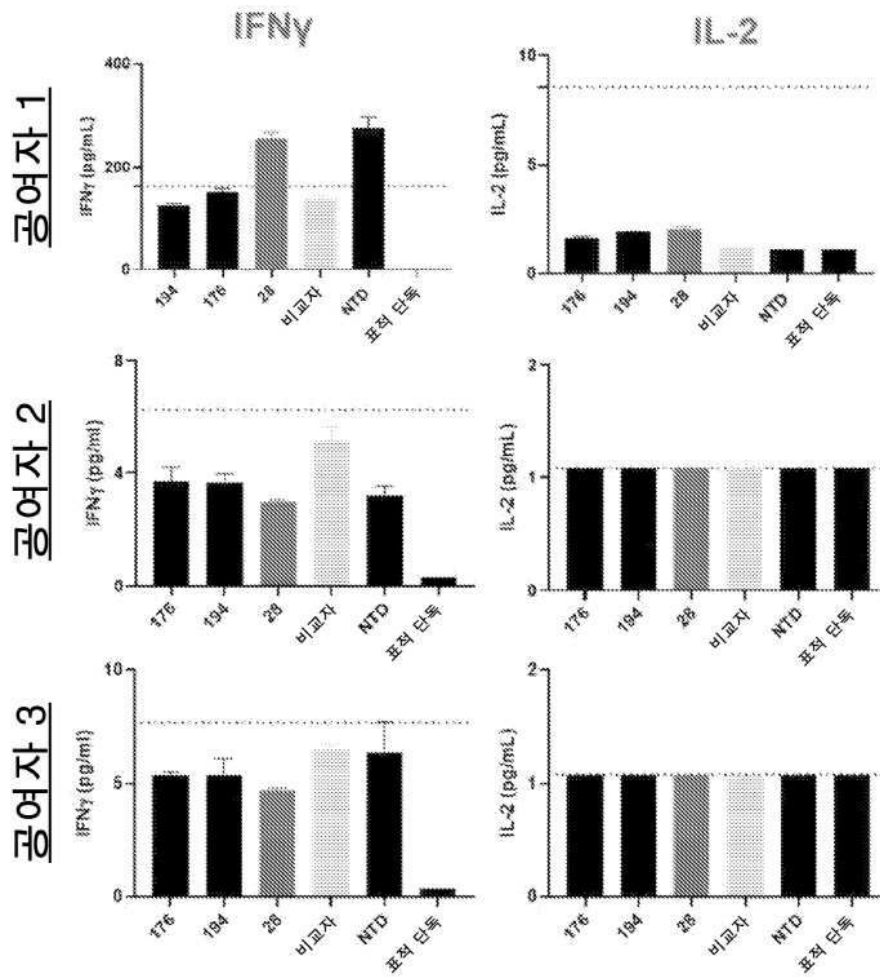
SiHa (HLA-A*02:01-HPV16+) 표적에 반응한 T 세포 사이토카인 생성

도면4j



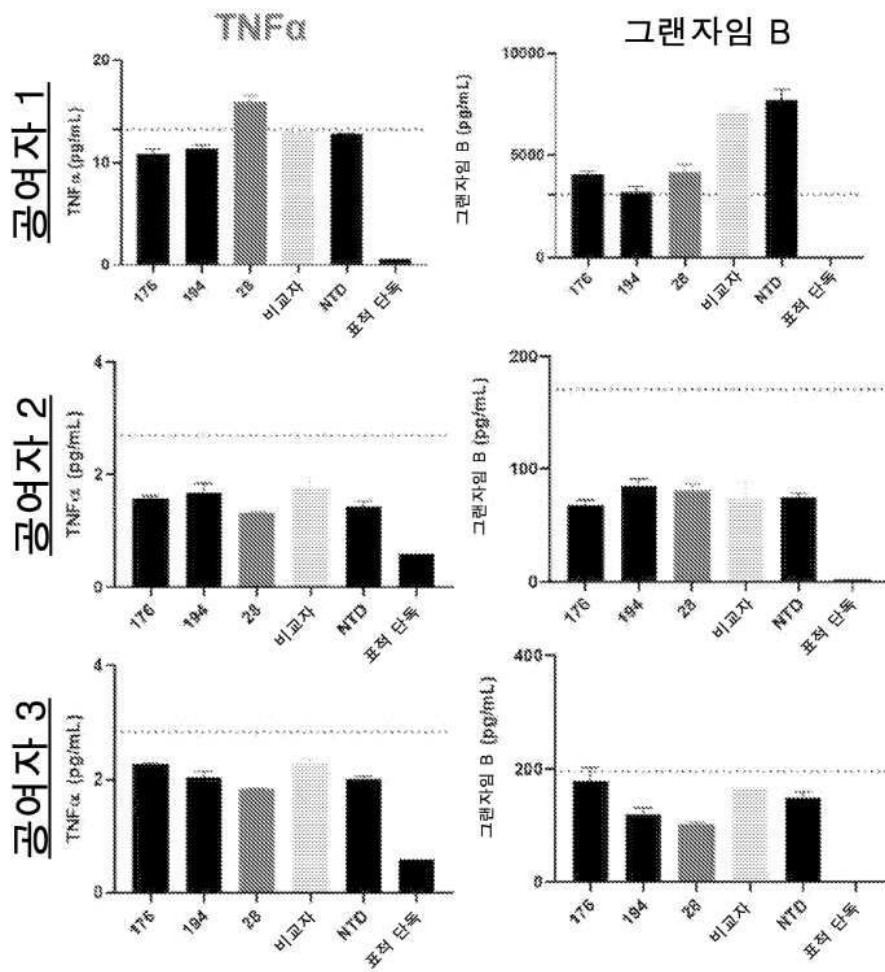
E:T 10:1에서 NCI-H1792 (HLA-A*02:01+HPV16-) 표적의 T 세포 사이토키인

도면4ka



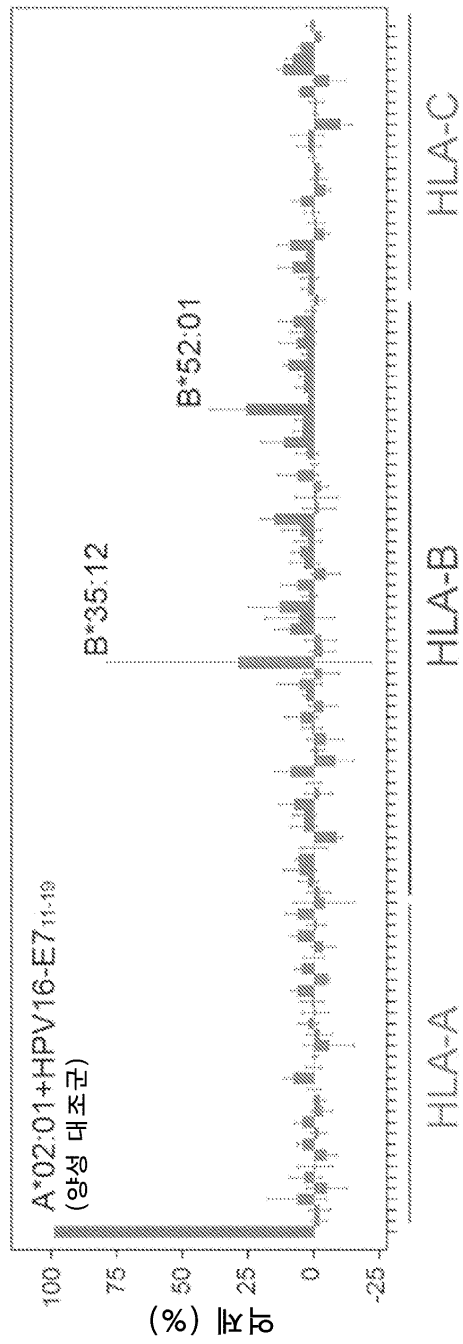
NCI-H1792 (HLA-A*02:01+HPV16-) 표적에 반응한 T 세포 사이토카인 생성

도면4kb

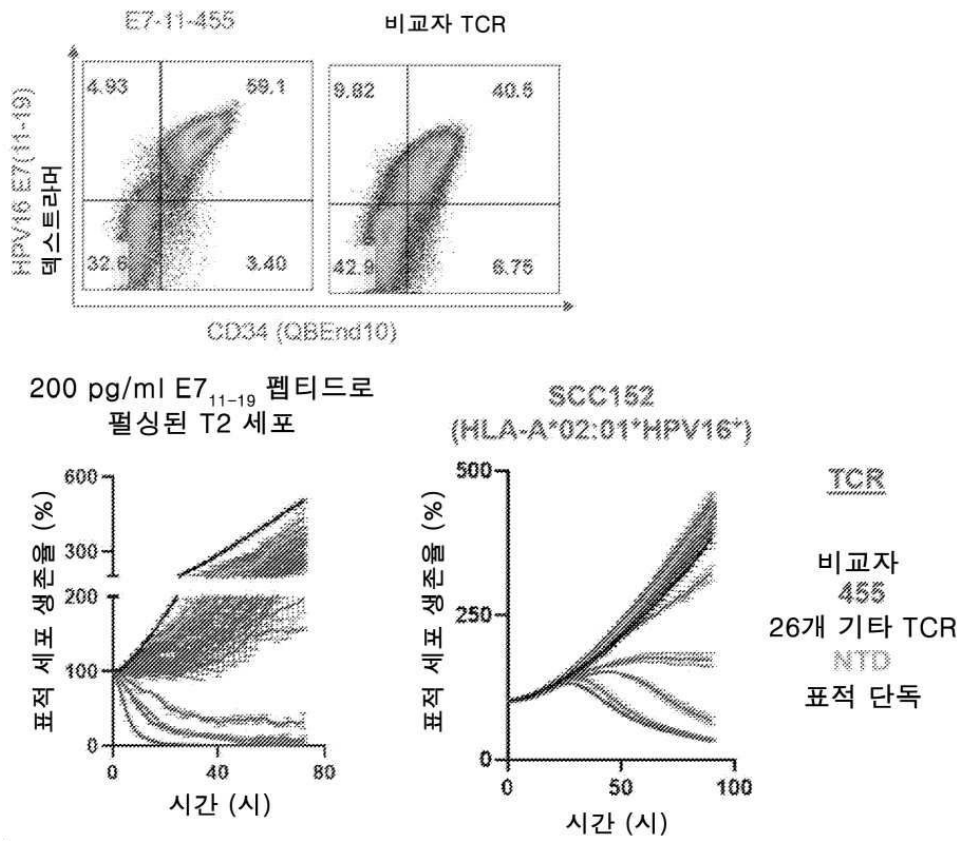


NCI-H1792 (HLA-A*02:01+HPV16-) 표적에 반응한 T 세포 사이토카인 생성

도면5



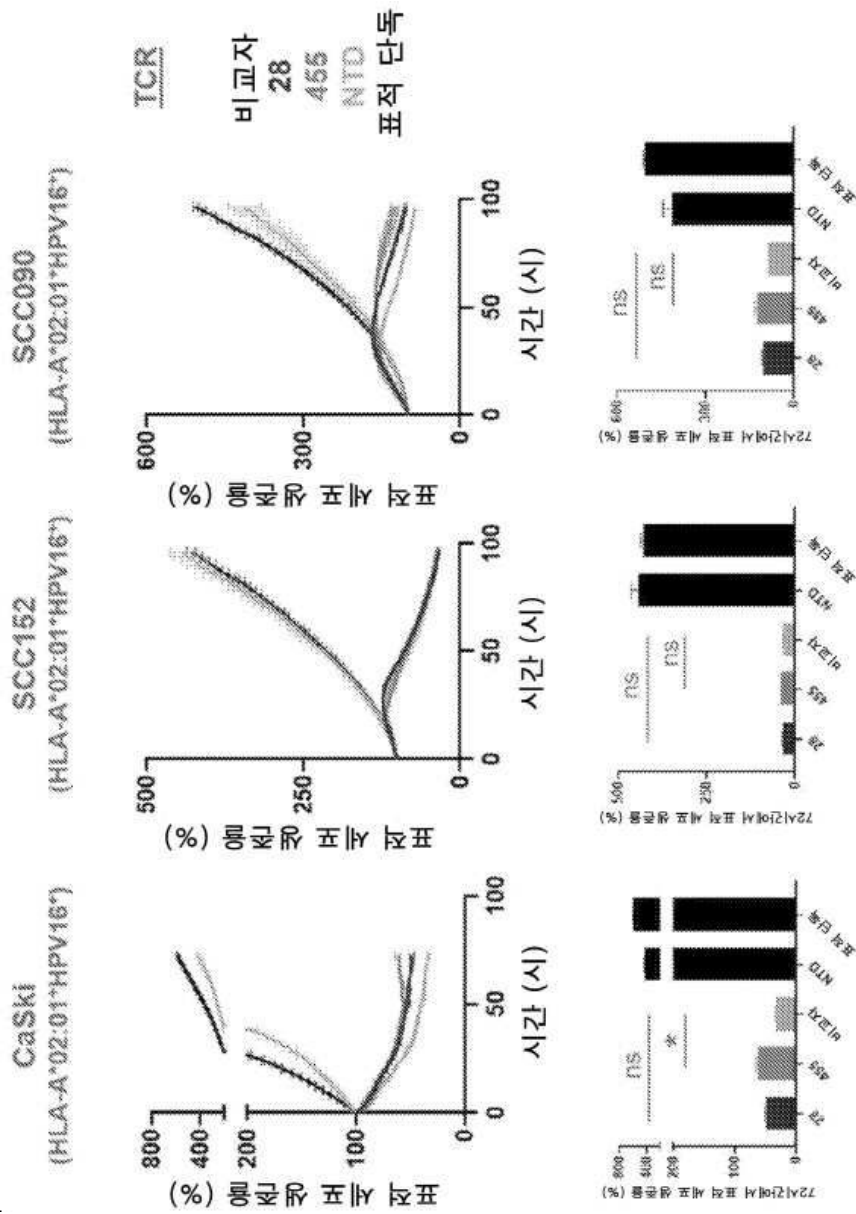
도면6a



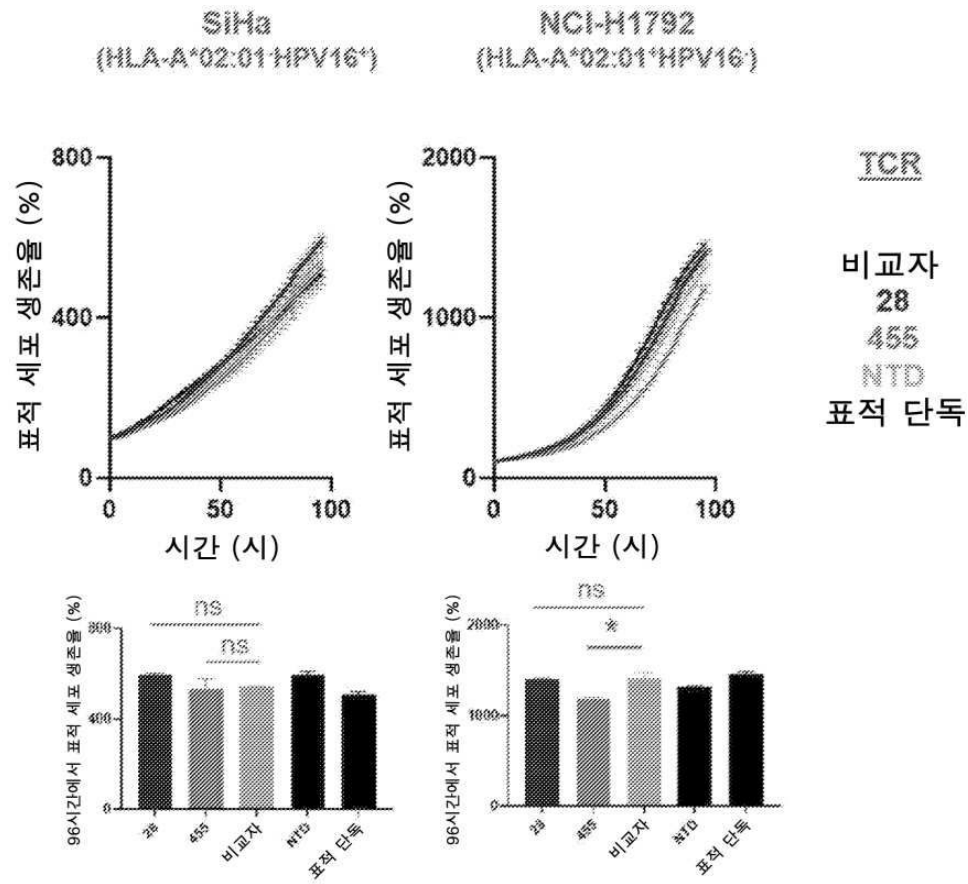
도면6b

TCR
E7-11-300
E7-11-325
E7-11-322
E7-11-310
E7-11-321
E7-11-329
E7-11-293
E7-11-330
E7-11-368
E7-11-353
E7-11-392
E7-11-366
E7-11-455
E7-11-442
E7-11-448

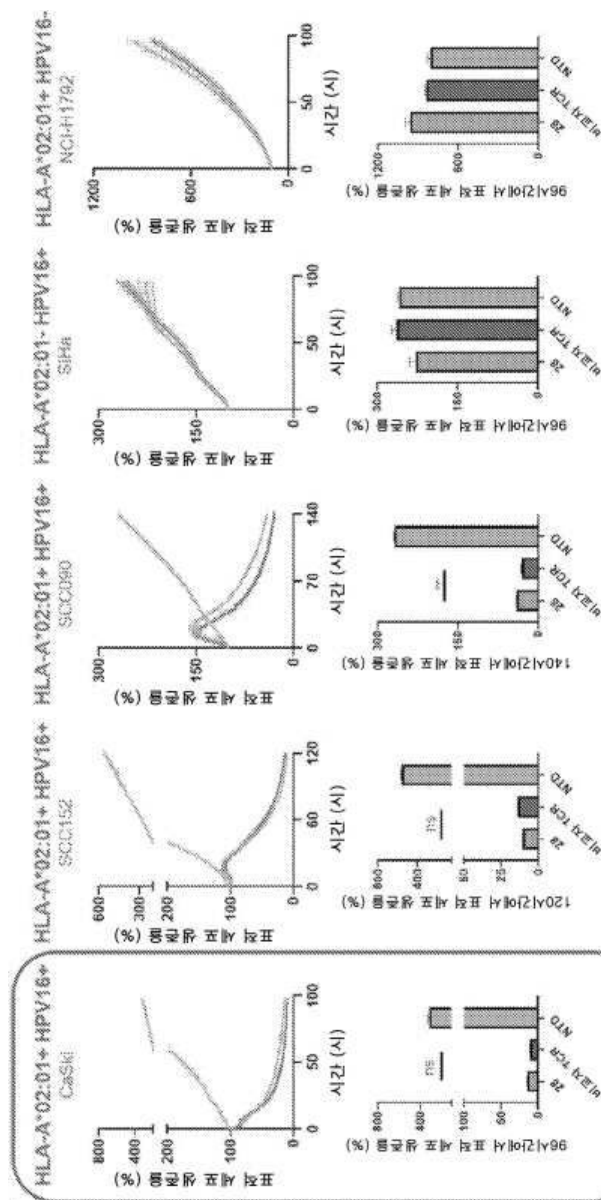
도면7a



도면7b

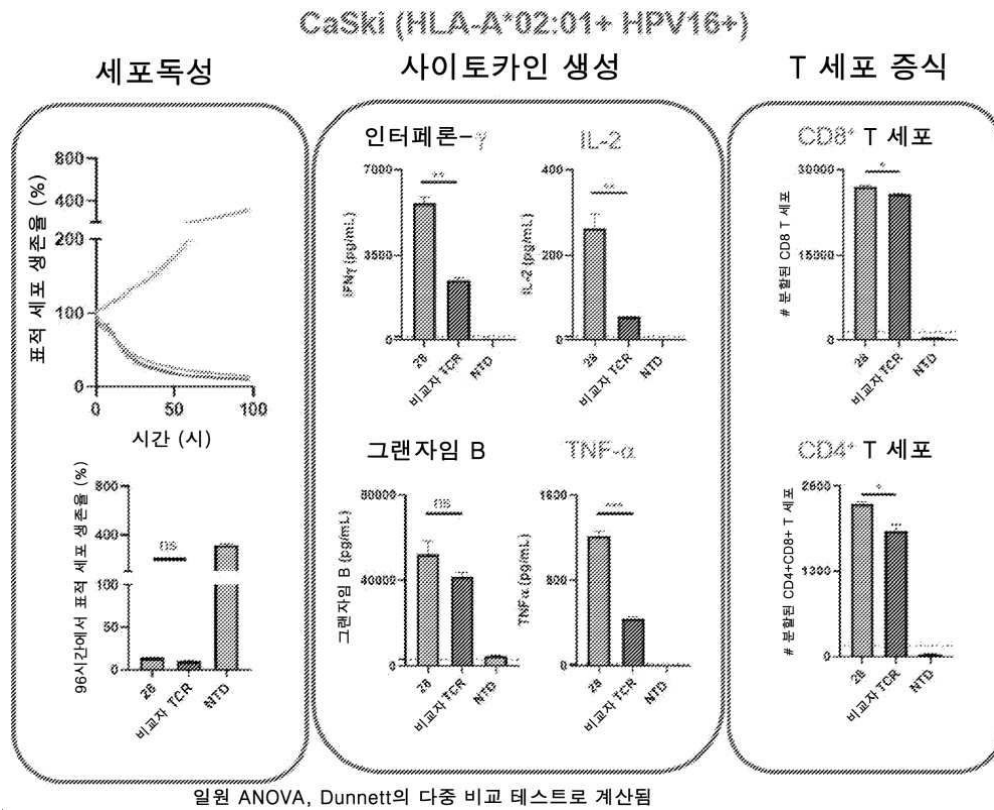


도면 8a

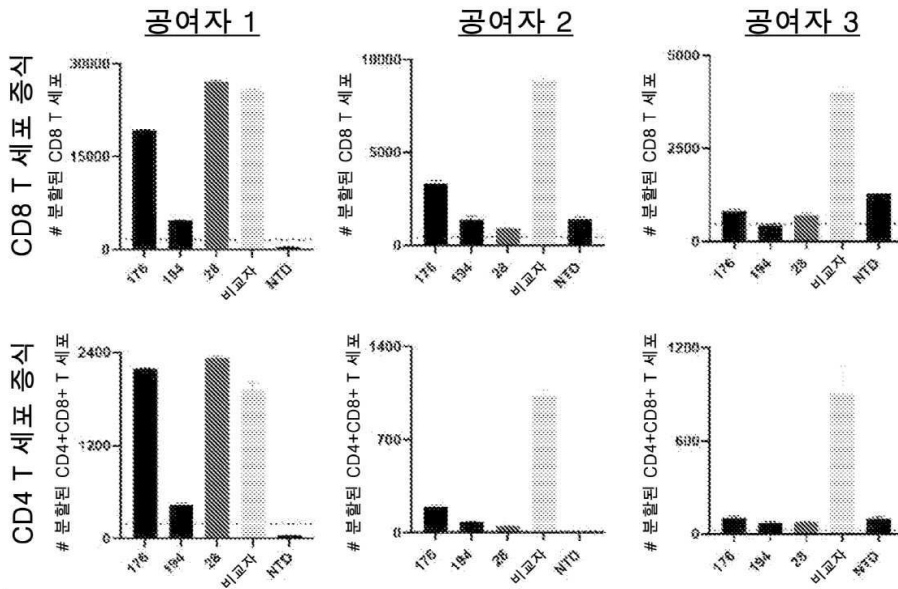


* 일원 ANOVA, Dunnett의 다중 비교 테스트로 계산됨

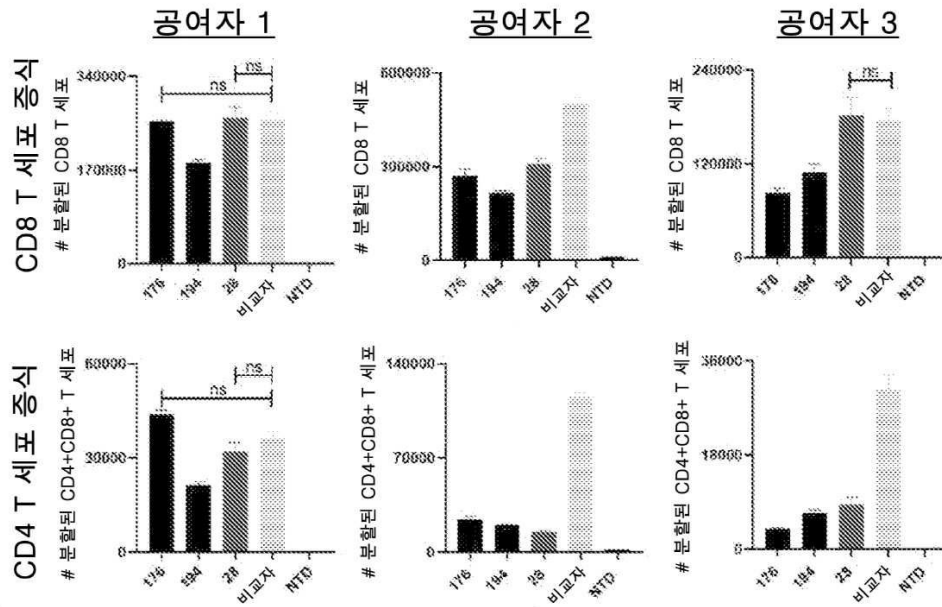
도면8b



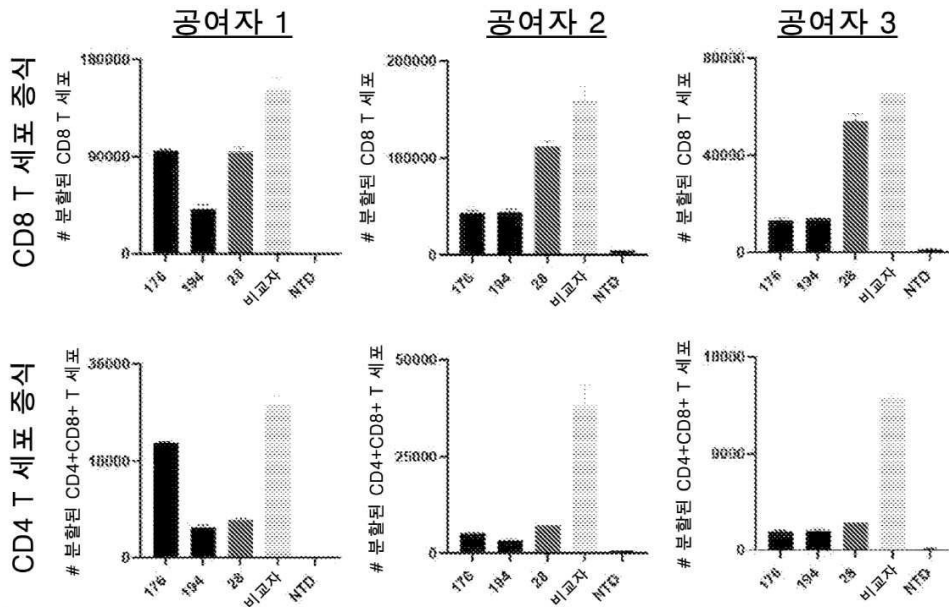
도면9a



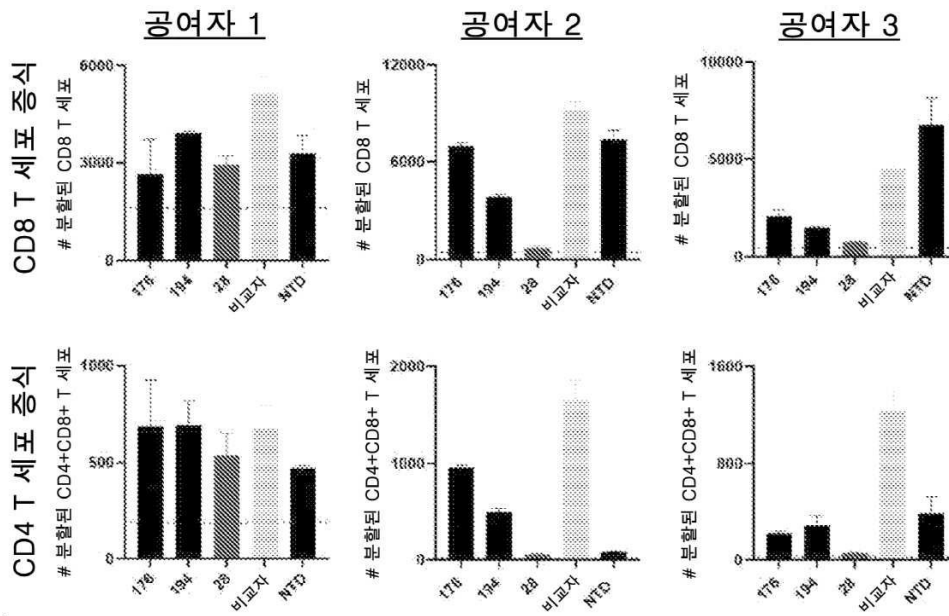
도면9b



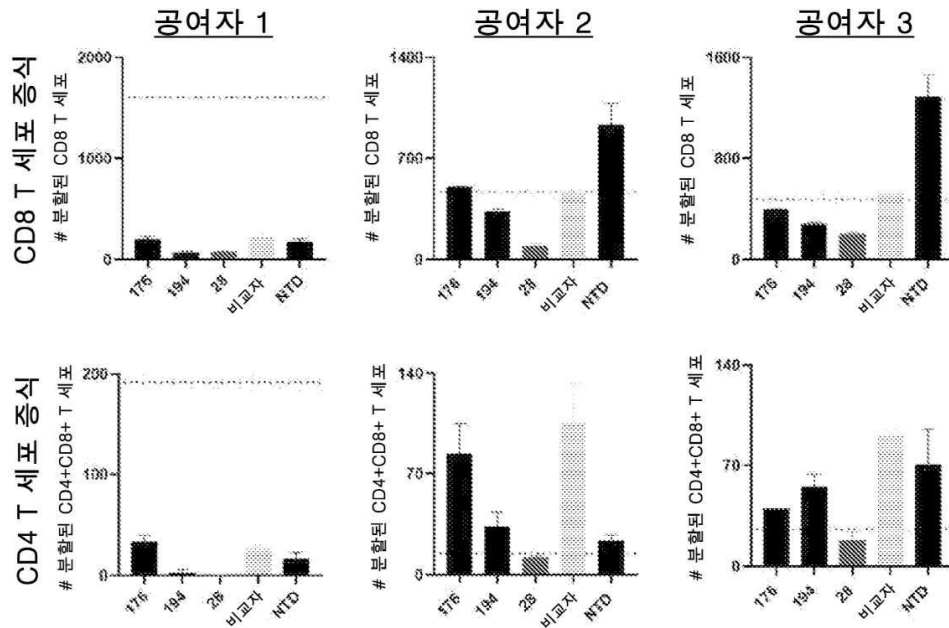
도면9c



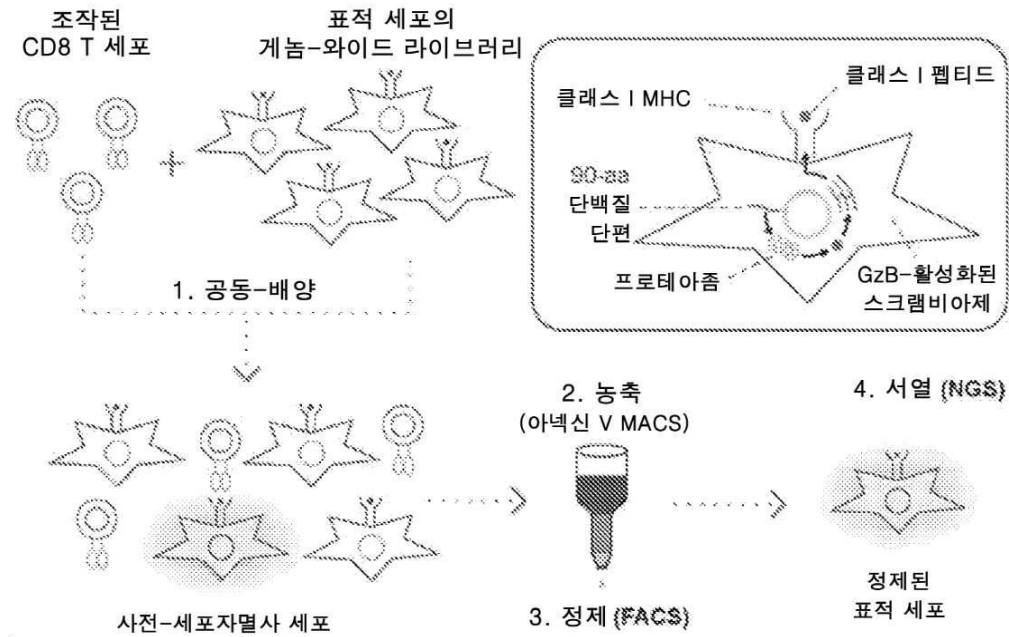
도면9d



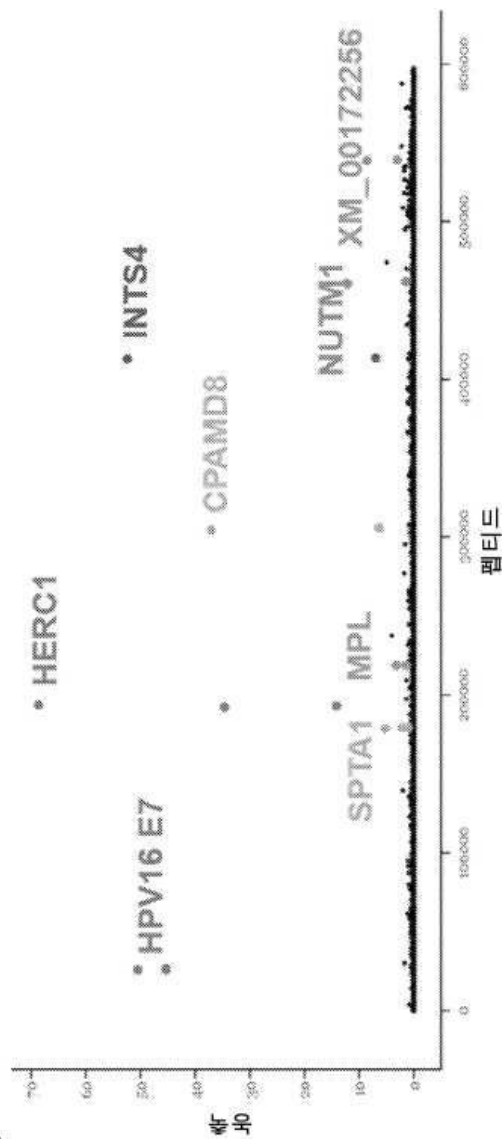
도면9e



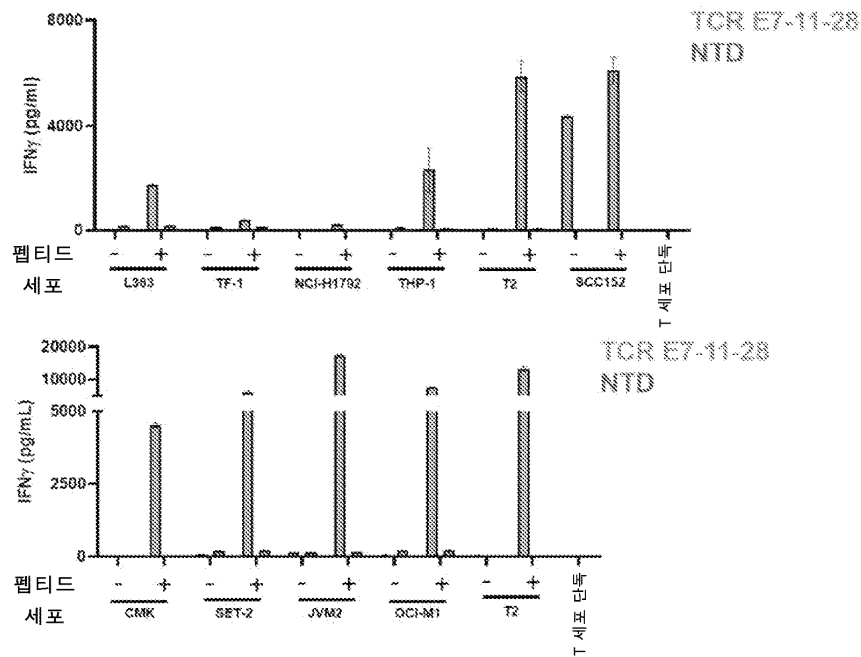
도면10a



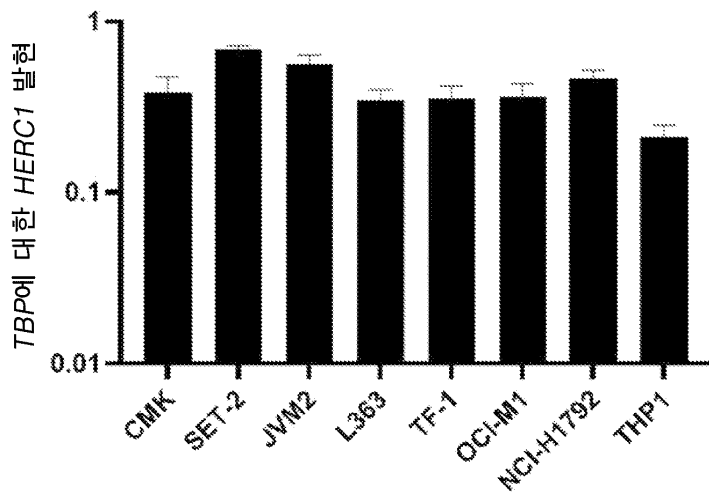
도면10b



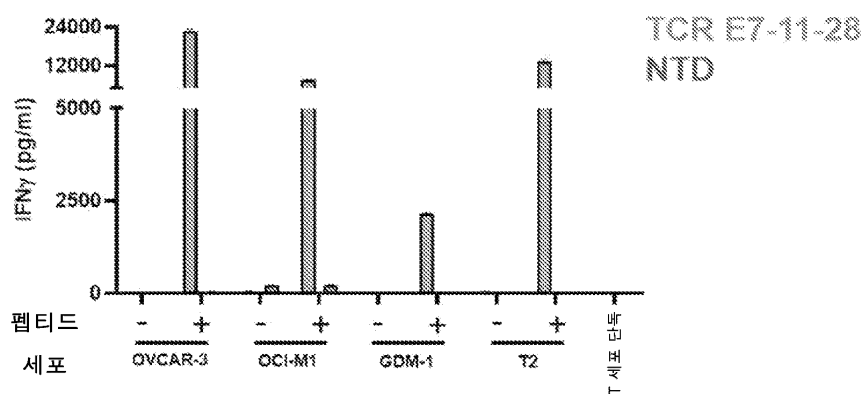
도면11a



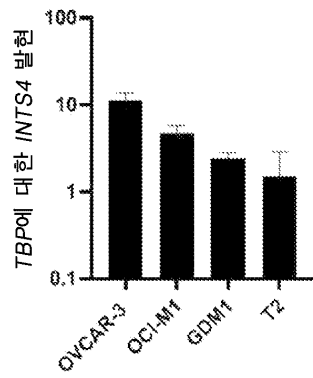
도면11b



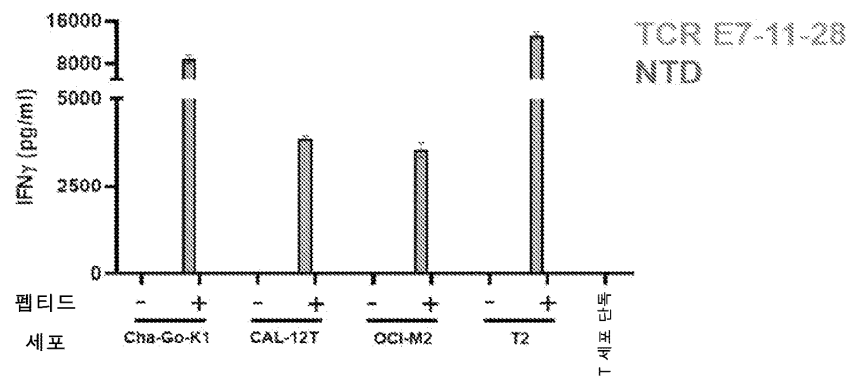
도면11c



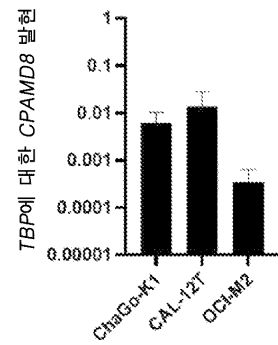
도면11d



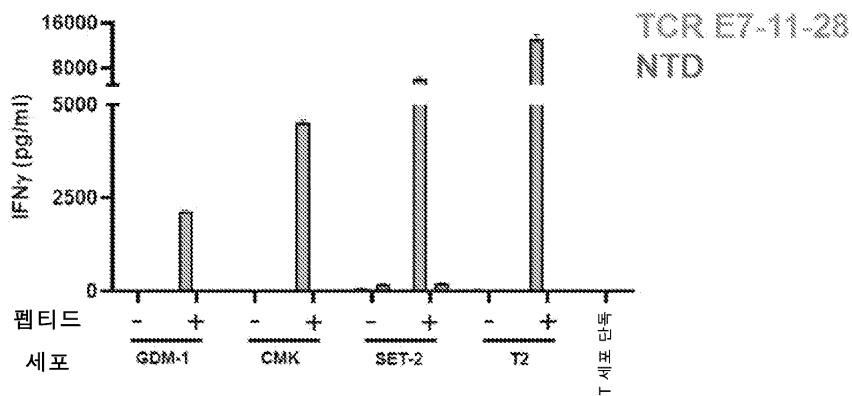
도면11e



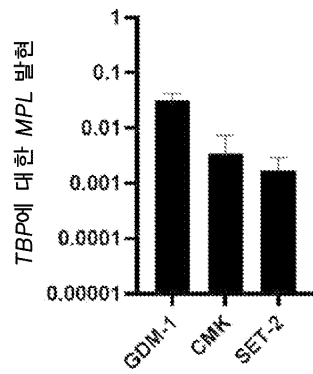
도면11f



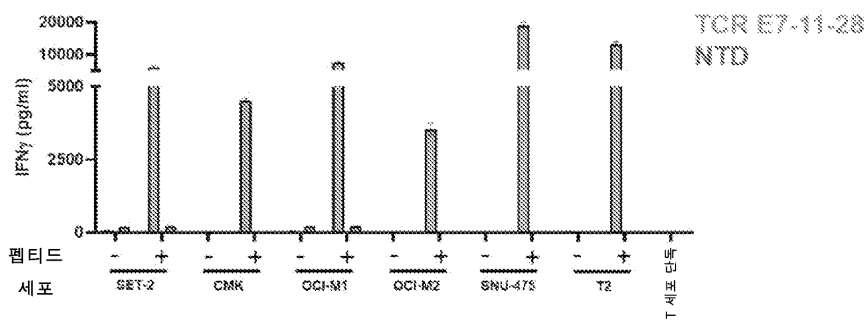
도면11g



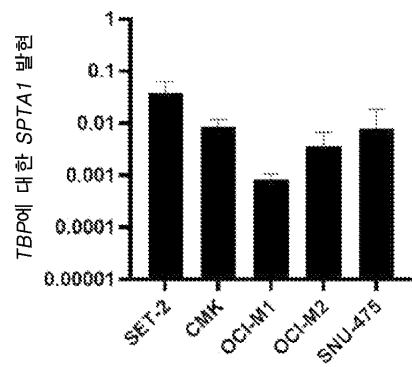
도면11h



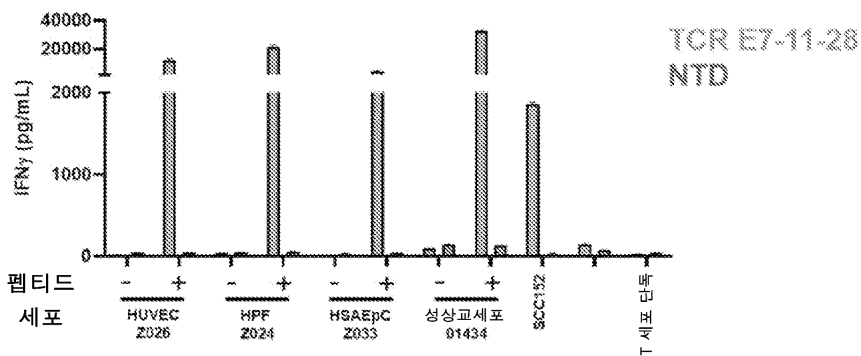
도면11i



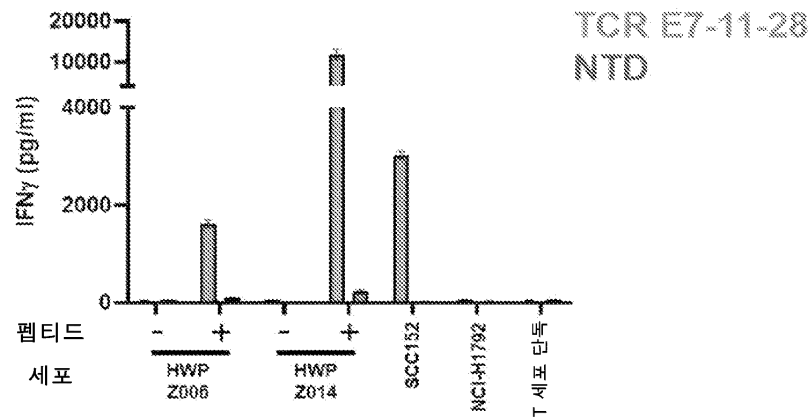
도면11j



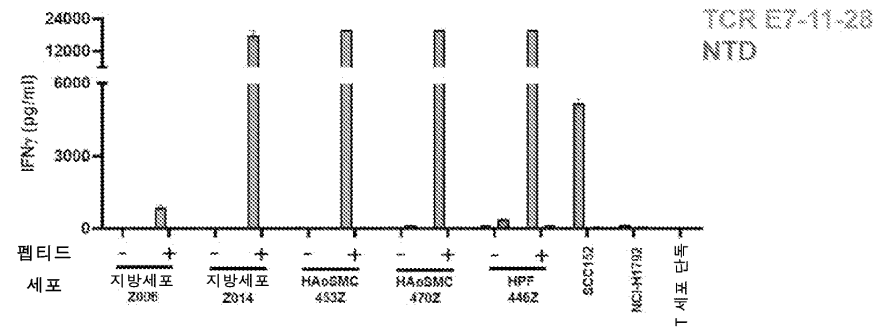
도면12a



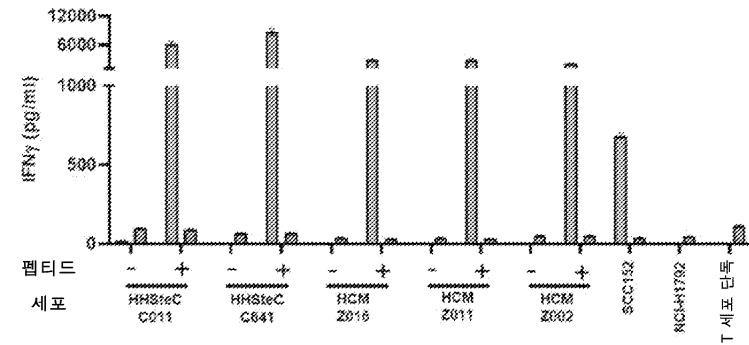
도면12b



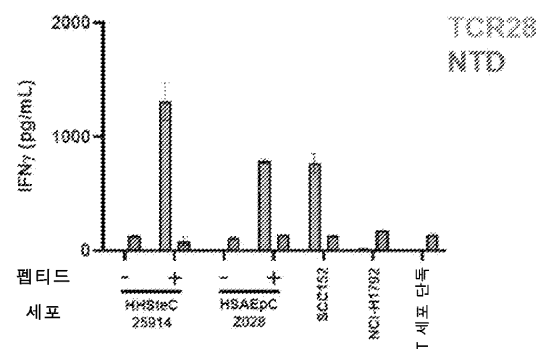
도면12c



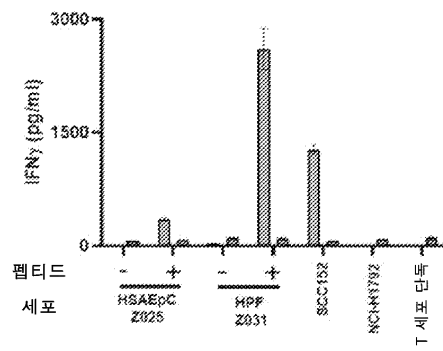
도면12d



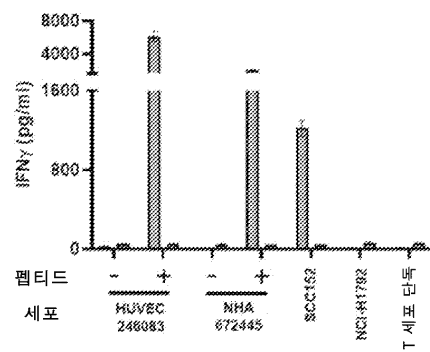
도면12e



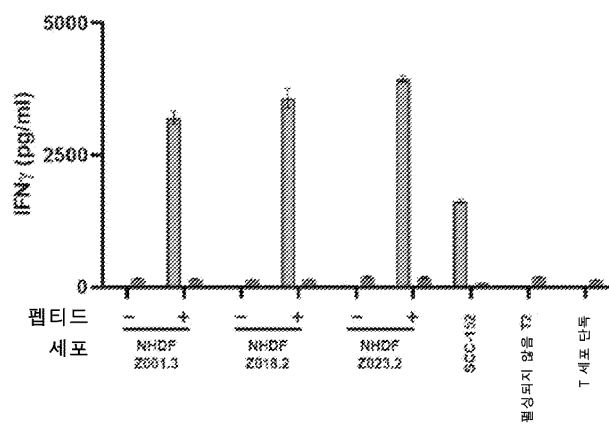
도면12f



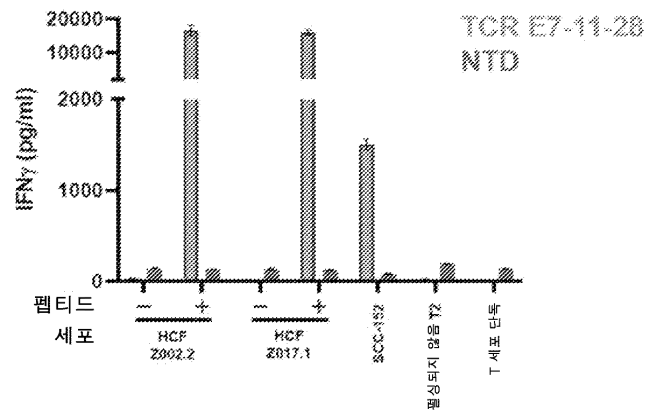
도면12g



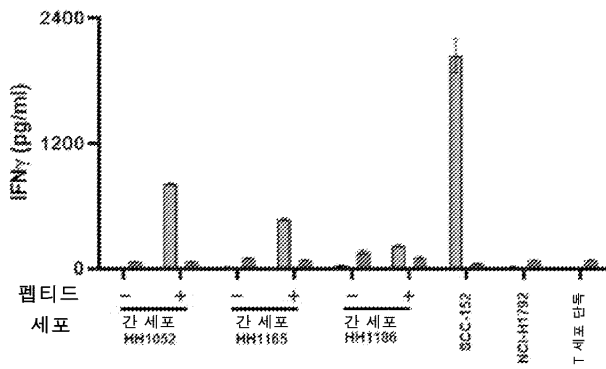
도면12h



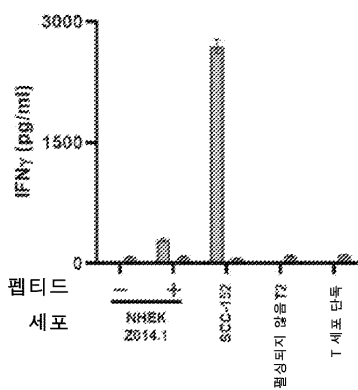
도면12i



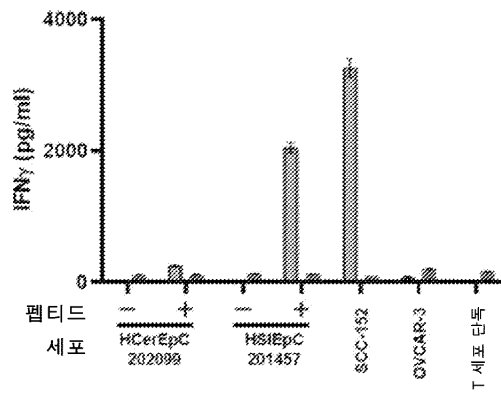
도면12j



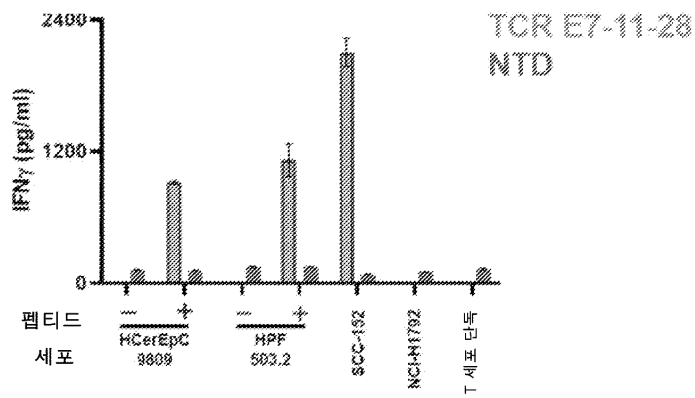
도면12k



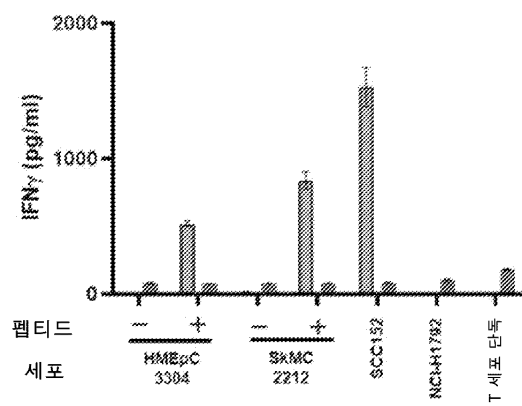
도면12l



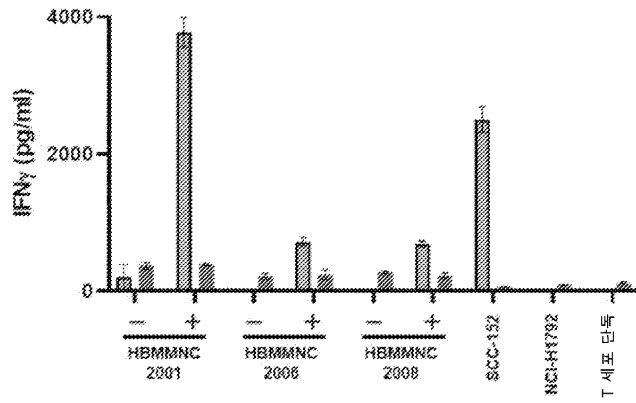
도면12m



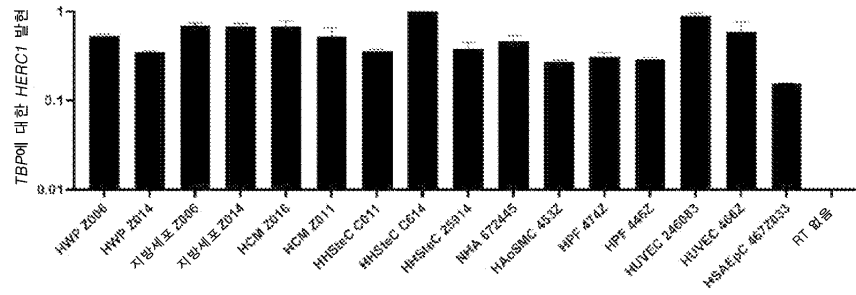
도면12n



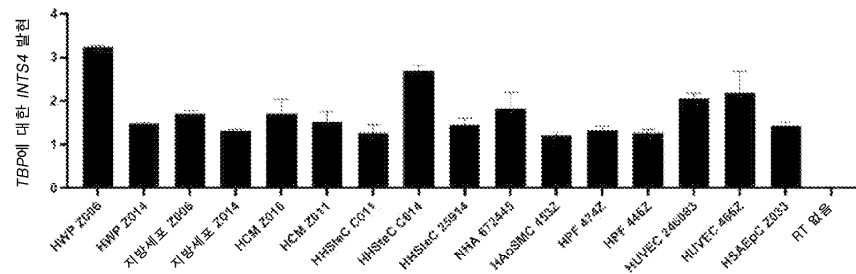
도면12o



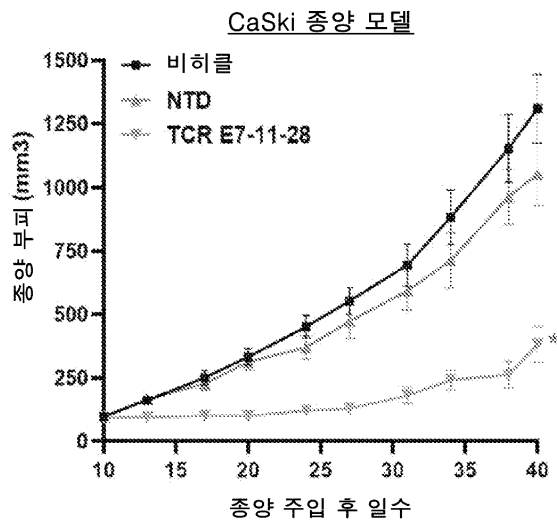
도면12p



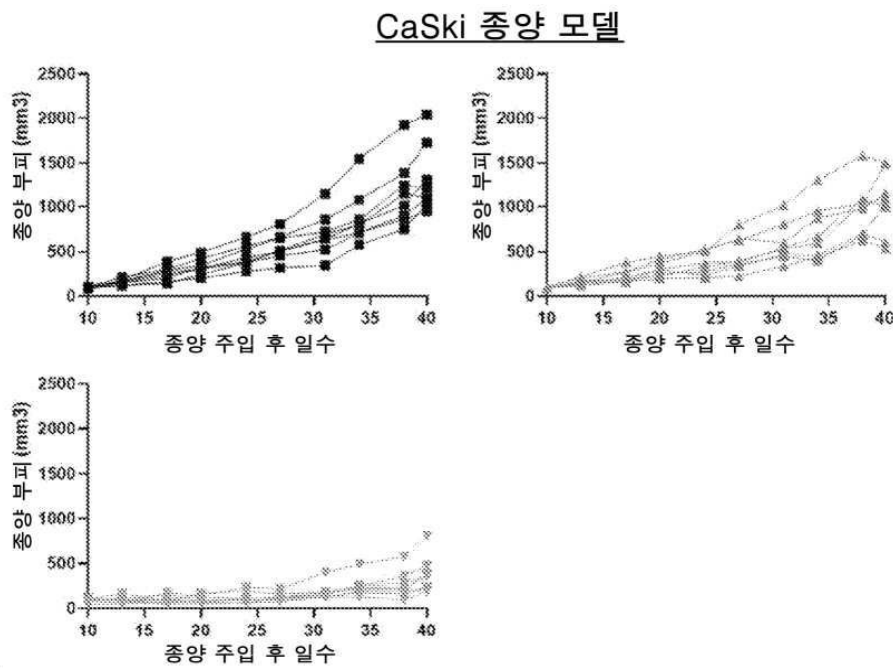
도면12q



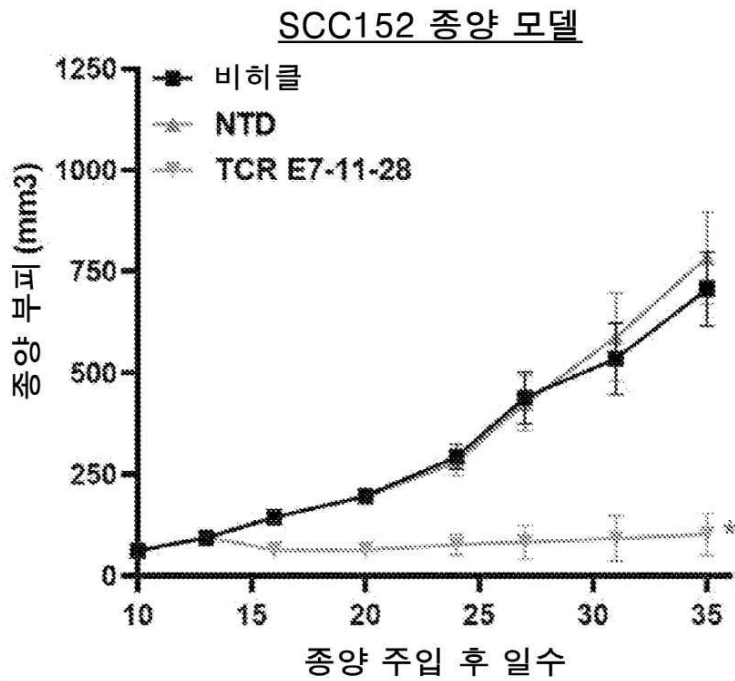
도면13a



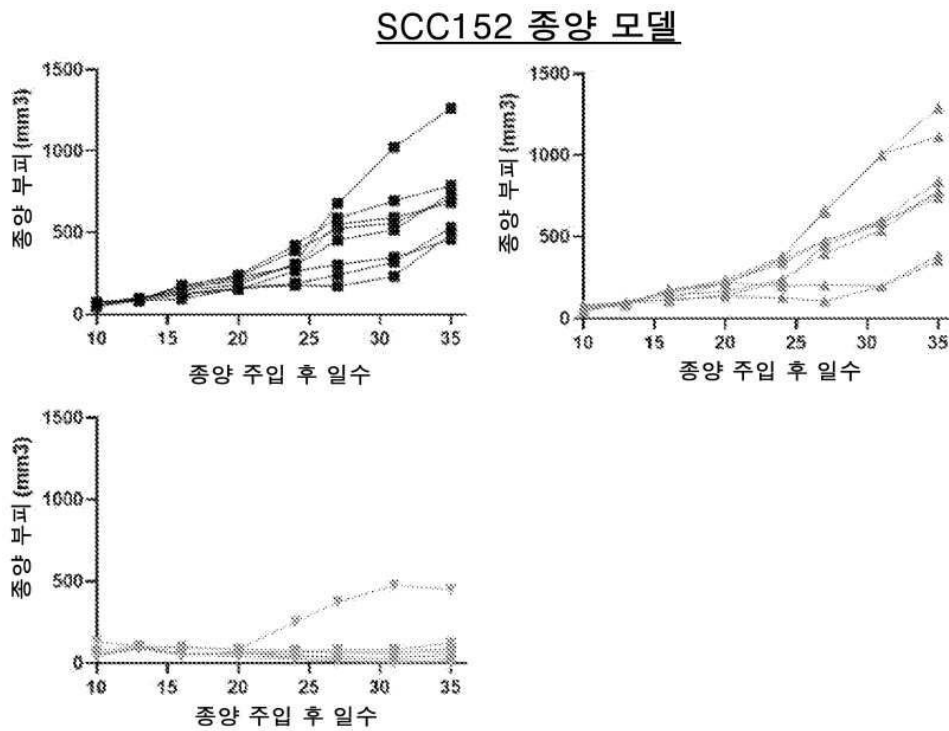
도면13b



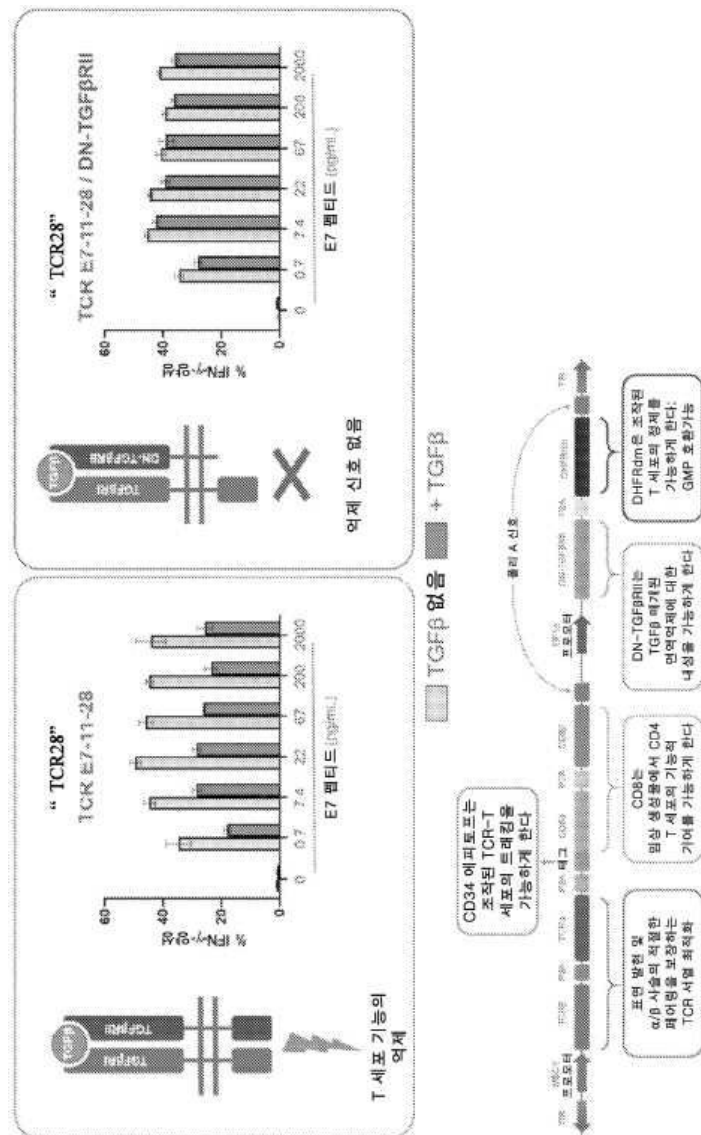
도면13c



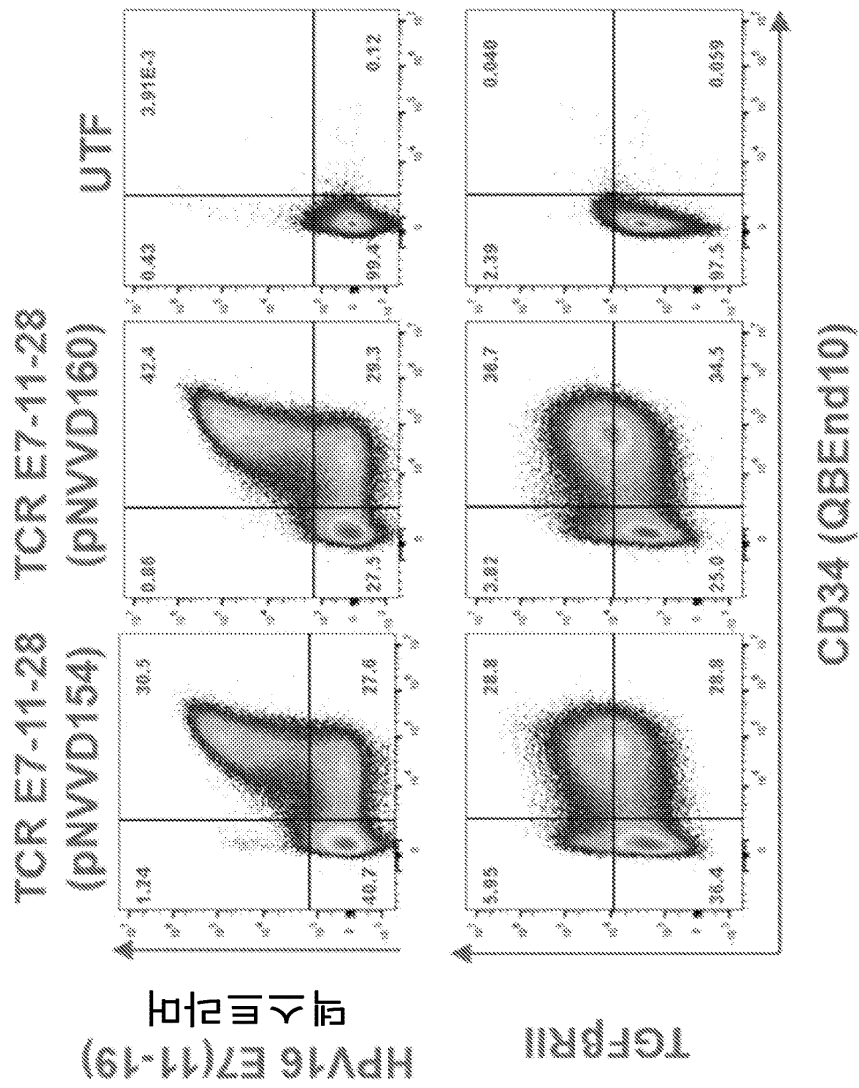
도면13d



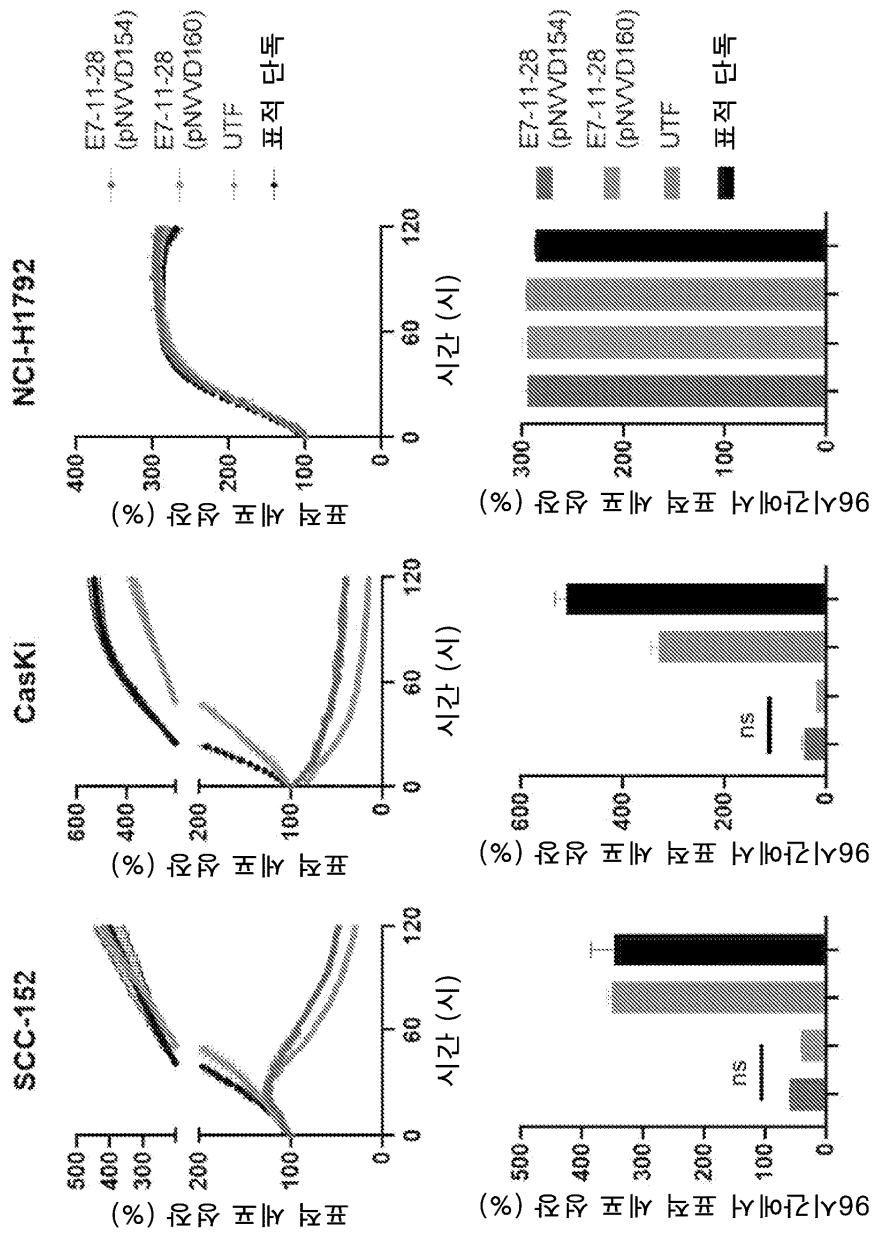
도면14



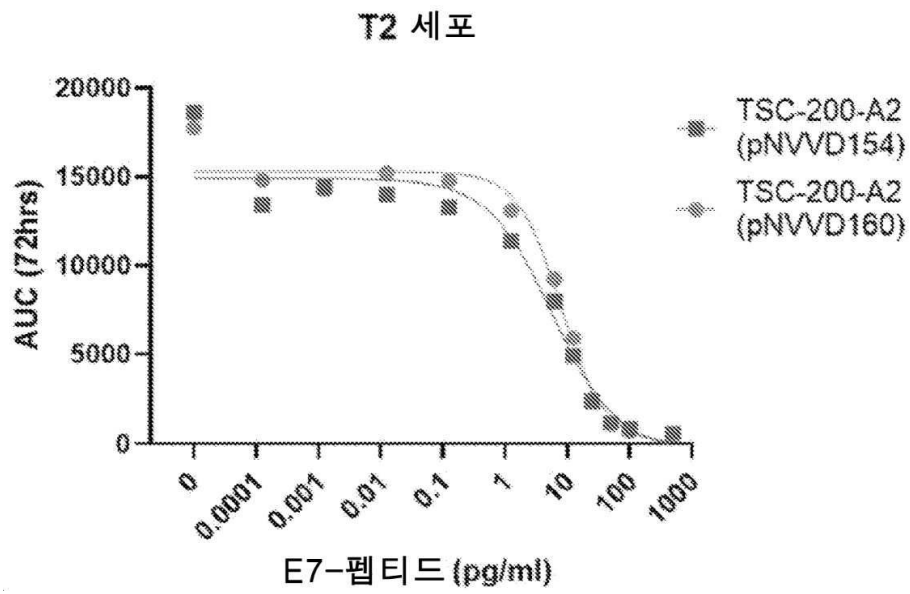
도면15a



도면15b



도면15c



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.