

(52) CPC특허분류

A61K 38/1774 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

(72) 발명자

크란츠, 테이비드 엠.

미국, 일리노이 61821, 샘페인, 2202 오도넬 드라
이브

슈미트, 토마스 엠.

미국, 워싱턴 98107, 시애틀, 4426 1번 애비뉴 엔
더블유

그린버그, 필립 디.

미국, 워싱턴 98040, 머서 아일랜드, 6510 82번 애
비뉴 에스이

명세서

청구범위

청구항 1

T 세포 클론으로부터 유래된 V α 및 V β 을 포함하는 T 세포 수용체, 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 상기 T 세포 수용체는 웨티드 WT1 및 HLA-A2 분자의 복합체에 결합하고, 상기 T 세포 수용체는 서열 번호: 1에 기재된 V β 아미노산 서열 및 서열 번호: 2에 기재된 V α 아미노산 서열을 포함하는, T 세포 수용체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

청구항 1의 T 세포 수용체를 발현하는, 속주 세포.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 세포는 인간 T 세포인, 속주 세포.

청구항 4

야생형 T 세포 수용체로부터 유래된 V α 및 V β 를 포함하는 변형된 T 세포 수용체, 또는 이의 항원 결합 단편으로서,

상기 V α , V β , 또는 그 둘 모두는, 상기 야생형 T 세포 수용체와 비교하여, 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)에 돌연변이를 포함하고, 상기 변형된 T 세포 수용체는 상기 야생형 T 세포 수용체보다 높은 친화도로 상기 웨티드 WT1 및 상기 HLA-A2 분자의 복합체에 결합하는, 변형된 T 세포 수용체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 변형된 T 세포 수용체가 서열 번호: 3에 기재된 V β 아미노산 서열 및 서열 번호: 4에 기재된 V α 아미노산 서열을 포함하는, 변형된 T 세포 수용체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 변형된 T 세포 수용체가 서열 번호: 5에 기재된 아미노산 서열을 갖는 상기 단쇄 T 세포 수용체를 포함하는, 변형된 T 세포 수용체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

청구항 4에 있어서, 서열 번호: 4에 기재된 V α 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 V α 및 서열 번호: 3에 기재된 V β 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 V β 를 포함하는, 변형된 T 세포 수용체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

청구항 4에 있어서, 상기 변형된 T 세포 수용체가 CDR1 α 29, CDR1 α 30, CDR1 α 31, CDR3 β 95, CDR3 β 97, CDR3 β 103, 및 CDR3 β 104 중 하나 이상에서의 아미노산 치환을 포함하는, 변형된 T 세포 수용체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

청구항 4에 있어서, 상기 변형된 T 세포 수용체가 TCR V β 쇄 돌연변이 S95T, S97N, I103Y, 및 N104L; 및 TCR V α 쇄 돌연변이 V29D, S30L, 및 Q31G의 아미노산 돌연변이 중 하나 이상을 포함하는, 변형된 T 세포 수용체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

청구항 4에 있어서, 상기 변형된 T 세포 수용체는 나노몰(nanomolar) 또는 그보다 높은 친화도로 상기 웨티드 WT1과 상기 HLA-A2 분자의 복합체에 결합하고, 상기 변형된 T 세포 수용체는 10^{-6} M 이하의 K_D 값으로 상기 복합체에 결합하는, 변형된 T 세포 수용체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

청구항 4에 있어서, 가용성 형태인, 변형된 T 세포 수용체, 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 12

상기 WT1 항원을 발현하는 암 세포를 표적으로 하는 치료제(therapeutic agent)로서,

상기 치료제는 청구항 10의 변형된 T 세포 수용체를 포함하는, 치료제.

청구항 13

상기 WT1 항원을 발현하는 암 세포를 표적으로 하는 치료제로서,

상기 치료제는 청구항 4의 변형된 T 세포 수용체를 발현하는 인간 T세포를 포함하는, 치료제.

청구항 14

청구항 12의 치료제를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 WT1 항원을 발현하는 암이 있는 대상체의 치료 방법.

청구항 15

청구항 13의 치료제를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 WT1 항원을 발현하는 암이 있는 대상체의 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호-참조

[0002]

본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2013년 11월 22일자 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/907,887호의 이점을 주장하며, 상기 가출원은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0003]

연방 정부 후원 연구 또는 개발에 관한 진술

[0004]

본 개시내용은 미국 국립 보건원(National Institute of Health)에 의해 수여된 보조금 번호 R01 GM55767 및 T32 GM070421 하에 미국 정부 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 개시내용에 특정 권리를 가진다.

[0005]

서열 목록에 관한 진술

[0006]

본 출원과 관련된 서열 목록은 서류 사본 대신 텍스트 양식으로 제공되며, 이는 본 명세서에서 참조로 포함된다. 서열 목록을 포함하는 텍스트 파일의 파일명은 IMMU_003_02W0_ST25.txt이다. 텍스트 파일은 18 KB로서, 이는 2014년 11월 21일 작성된 것이며, 이는 EFS-Web를 통해 전자 제출되었다.

[0007]

본 개시내용은 시험관내 기술에 의해 조작된, 고-친화도의 TCR을 포함하는 윌름스(Wilms') 종양 항원 (WT1)에 대한 T 세포 수용체(TCR)뿐만 아니라, 변형된 TCR 및 단쇄 TCR의 제조 방법, 및 치료, 진단 및 영상화 방법을 위한 그에 상응하는 TCR의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0008]

T 세포 수용체 (TCR) 및 항체는 상이한 부류의 항원 (리간드)을 인식하도록 진화된 분자이다 (문헌 [Murphy(2012), xix, 868 p.]). TCR은 항원 제시 세포 (APC) 또는 임의의 유핵 세포 (예컨대, 인체 내 모든 인간 세포, 단, 적혈구 세포 제외)의 표면 상의 주조직적합 복합체 (MHC)의 생성물과 관련하여 제시된 항원성 웨티드 인식을 담당하는 항원-특이 분자이다. 그에 반해, 항체는 전형적으로는 가용성 또는 세포-표면 항원을 인식하지만, MHC에 의해 항원이 제시되어야 하는 것을 필요로 하지는 않는다. 이러한 시스템은 T 세포에 이의 TCR을 통하여, 세포내에서 짧은 웨티드로 프로세싱되고, 세포내 MHC 분자에 결합하고, 웨티드-MHC 복합체 (pepMH C)로서 표면으로 전달되는, 세포에 의해 발현되는 세포내 항원 (바이러스 단백질 포함)의 전체 어레이를 인식하

는 잠재적인 능력을 부여한다. 상기 시스템을 통해 실제로 임의의 외래 단백질 (예컨대, 돌연변이화된 암 항원 또는 바이러스 단백질) 또는 비정상적으로 발현된 단백질은 T 세포에 대한 표적으로서의 역할을 할 수 있다 (문헌 [Davis and Bjorkman (1988) *Nature*, 334, 395-402]; [Davis et al. (1998) *Annu Rev Immunol*, 16, 523-544]; [Murphy (2012), xix, 868 p.]에서 리뷰).

[0009] TCR과 pepMHC의 상호작용은 결합 친화도 (또는 해리 속도)에 따라 다양한 상태의 활성화로 T 세포를 유도할 수 있다. TCR 인식 과정은 다양한 래퍼토리의 TCR을 제공함으로써 T 세포가 정상적인 건강한 세포와, 예컨대, 바이러스를 통해 형질전환된 것 또는 악성 종양을 구별할 수 있게 하며, 여기서 하나 이상의 TCR이 MHC 분자에 결합된 외래 웨პ티드에 대하여 T 세포 활성을 자극시키기 위한 역치보다 높은 결합 친화도로 존재할 확률은 높다 (문헌 [Manning and Kranz (1999) *Immunology Today*, 20, 417-422]).

[0010] 현재까지, 시험관내 배양에 의해 확인된 인간 또는 마우스 T 세포로부터 단리된 야생형 TCR은 상대적으로 낮은 결합 친화도를 가지는 것으로 나타났다 ($K_d=1\text{-}300 \mu\text{M}$) (문헌 [Davis et al. (1998) *Annu Rev Immunol*, 16, 523-544]). 흥선에서 발생된 T 세포는 자가-pepMHC 리간드에 대해 음성적으로 선별되며 (내성 유도), 이로써 너무 높은 친화도를 가지는 T 세포는 결실된다는 것이 상기 내용에 대한 설명의 일부인 것으로 보인다 (문헌 [Starr et al. (2003) *Annu Rev Immunol*, 21, 139-76]). 이와 같이 상대적으로 저친화도를 보상하기 위해, T 세포는 세포 표면 분자 CD4 및 CD8이 MHC 분자 (각각 부류 II 및 부류 I)에 결합하여 신호전달 활성을 매개하는데 있어서 TCR과 상승 작용을 하는 공동-수용체 시스템을 진화시켰다. CD8은 특히 이 과정에서 효과적이는데, 이를 통해서 친화도가 매우 낮은 (예컨대, $K_d=300 \mu\text{M}$) TCR은 강력한 항원-특이 활성을 매개할 수 있다.

[0011] 시험관내에서, 유도 진화는 특이적인 pepMHC에 대하여 더 높은 친화도를 가지는 TCR을 생성하는데 사용되어 왔다. 사용되어 왔던 3가지 상이한 디스플레이 방법은 효모 디스플레이 (문헌 [Holler et al. (2003) *Nat Immunol*, 4, 55-62]; [Holler et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5387-92]), 파지 디스플레이 (문헌 [Li et al. (2005) *Nat Biotechnol*, 23, 349-54]), 및 T 세포 디스플레이 (문헌 [Chervin et al. (2008) *J Immunol Methods*, 339, 175-84])이다. 3가지 접근법 모두에서, 공정은 야생형 TCR의 정상적인, 저친화도를 보이는 TCR을 조작하거나, 변형시켜 TCR의 돌연변이체의 친화도가 동족 pepMHC (T 세포가 그에 대해 특이적인 것인 원래의 항원)에 대해 증가된 친화도를 가지도록 하는 것인 단계를 포함한다. 따라서, 야생형 TCR은 하나 이상의 CDR 중 돌연변이 유발된 라이브러리를 제조하기 위한 주형으로서 사용되었고, 친화도가 더 높은 돌연변이체는 동족 웨პ티드-MHC 항원에의 결합에 의해 선별되었다.

[0012] 본 개시내용에는, 효모 디스플레이에 의해 조작된 빌름스 종양-1 (WT1)에 대해 특이적인, 야생형 T 세포 수용체 및 고친화도의 T 세포 수용체가 기술되어 있다. WT1은 종양 억제제 및 발암유전자, 둘 모두로서 작용하는 것으로 기술되었던 전사인자이다. WT1은 다양한 고형 종양 뿐만 아니라 백혈병에서도 높은 수준으로 발현한다 (Sugiyama et al. (2010) *Japanese Journal of Clinical Oncology* 40(5) 377-387). 그것은 백신 노력의 표적이 되어왔고, 다양한 입양 T 세포는 야생형 T 세포 수용체를 갖는 T 세포를 사용하여 접근한다.

[0013] WT1은 미국 국립보건원에 의한 상위 75개 암 항원의 우선순위 리스트중 1번을 랭크했다 (문헌 [Cheever et al. (2009) *Clin Cancer Res*, 15, 5323-5337]). 따라서, 제제, 예컨대 특히 이 암 항원을 표적으로 하는, 치료제를 확인할 필요성이 남아있다. 본 발명은 사용될 수 있는 시험관내 조작된, 고친화도의 TCR을, 예컨대 생체내 표적 전달을 위한 가능성 형태로 또는 입양 T 세포 셋팅에서 T 세포로 도입된 유전자로서 제공한다.

발명의 요약

본 발명은 친화도가 개선된 WT1 항원에 결합되는 시험관내 조작된 T 세포 수용체 (TCR) 및 WT1 항원에 대한 야생형 T 세포 수용체에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 야생형 T 세포 수용체의 서열 및 이들의 효모, 파지, 또는 포유동물 세포의 표면 상에 라이브러리의 디스플레이를 통해 선별된 돌연변이를 안정화시키고 친화시키는 방법; 친화도가 증가된 항원에의 결합에 대해 이들 라이브러리로부터 선별된 TCR 단백질; 및 시험관내에서 선별된 TCR 유도체의 치료학적, 진단학적, 또는 영상화 적용을 위한 용도에 관한 것이다.

[0016] 본 발명의 한 측면은 T 세포 클론으로부터 유래된 $V\alpha$ 및 $V\beta$ 을 포함하는 T 세포 수용체, 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이며, 여기서 T 세포 수용체는 웨პ티드 WT1 및 HLA-A2 분자의 복합체에 결합하고, T 세포 수용체는 서열 번호: 1에 기재된 $V\beta$ 아미노산 서열 및 서열 번호: 2에 기재된 $V\alpha$ 아미노산 서열을 포함한다. 일 실 시형태에서, T 세포 수용체를 발현하는 숙주 세포가 개시된다. 추가 실시형태에서, 숙주 세포는 인간 T 세포이다.

- [0017] 본 발명의 한 측면은 야생형 T 세포 수용체로부터 유래된 V α 및 V β 를 포함하는 변형된 T 세포 수용체, 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 여기서 V α , V β , 또는 그 둘 모두는 야생형 T 세포 수용체와 비교하여, 하나 이상의 상보성 결정 영역 (CDR)에 돌연변이를 포함하고, 여기서 변형된 T 세포 수용체는 WT1/HLA-A2(HLA-A2로서 공지된 MHC 생성물에 결합됨, WT1 웨티드 RMFPNAPYL (서열 번호: 6))로서 공지된 웨티드/MHC 항원에 결합된다.
- [0018] 일 실시형태에서, T 세포 수용체는 서열 번호: 1에 기재된 V β 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 V β 를 포함하며, 여기서 T 세포 수용체는 WT1/HLA-A2으로의 결합에 의한 활성을 매개한다.
- [0019] 다른 실시형태에서, 변형된 T 세포 수용체는 서열 번호: 3에 기재된 V β 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 V β 를 포함하며, 여기서 변형된 T 세포 수용체는 (K_A 값) 10^6 M초과의 친화도로 WT1/HLA-A2에 결합된다.
- [0020] 다른 실시형태에서, T 세포 수용체는 서열 번호: 2에 기재된 V α 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 V α 를 포함하며, 여기서 T 세포 수용체는 WT1/HLA-A2으로의 결합에 의한 활성을 매개한다.
- [0021] 다른 실시형태에서, 변형된 T 세포 수용체는 서열 번호: 4에 기재된 V α 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 V α 를 포함하며, 여기서 변형된 T 세포 수용체는 (K_A 값) 10^6 M초과의 친화도로 WT1/HLA-A2에 결합된다.
- [0022] 일 실시형태에서, T 세포 수용체는 서열 번호: 5에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단쇄 T 세포 수용체이다.
- [0023] 일 실시형태에서, T 세포 수용체는 서열 번호: 3에 기재된 아미노산 서열의 S95T, S97N, I103Y, N104L로부터 선별된 CDR3 β 에 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다.
- [0024] 다른 실시형태에서, T 세포 수용체는 서열 번호: 4에 기재된 아미노산 서열의 V29D, S30L, 및 Q31G로부터 선별된 CDR1 α 에 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다.
- [0025] 일 실시형태에서, 변형된 T 세포 수용체는 돌연변이체 T 세포 수용체의 효모 디스플레이 라이브러리의 시험관내 선별에 의해 생성된다.
- [0026] 다른 실시형태에서, 변형된 T 세포 수용체는 이의 표적 항원에 결합되는 가용성 단백질로서 발현된다.
- [0027] 다른 실시형태에서, 야생형 또는 변형된 T 세포 수용체는 입양 T 세포를 위하여 T 세포 내에서 발현된다.
- [0028] 본 발명의 한 측면은 WT1 항원을 발현하는 암 세포를 표적으로 하는 치료제를 제공하며, 여기서 치료제는 본원에 기술된 변형된 T 세포 수용체를 포함한다. 일 실시형태로, 치료제는 WT1 항원을 발현하는 암 세포를 표적으로 하며, 여기서 치료제는 본원에 기술된 변형된 T 세포 수용체를 발현하는 인간 T 세포를 포함한다. 일 실시형태는 본원에 기술된 치료제를 투여하는 단계를 포함하는, WT1 항원을 발현하는 암을 가진 대상체의 치료 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 현 연구에서의 다양한 WT1/HLA-A2 특이적 T 세포 수용체의 정렬된 아미노산 서열을 나타낸다. WT1 P22는 WT1/HLA-A2에 의하여 자극된 인간 T 세포 클론으로부터 단리된 야생형 서열을 나타낸다. 다른 TCR 서열을 더 높은 표면 수준 및 더 높은 친화도를 위하여 효모 디스플레이 방법에 의하여 단리하였다. 사각형 내 강조된 CDR3 β 및 CDR1 α 내의 아미노산 잔기는 효모 디스플레이에 의한, 고친화도를 위하여 단리된 TCR 내의 돌연변이였다. V β 쇄에 대하여 나타난 서열은 상부로부터 하부까지 서열 번호: 1, 21, 21, 3, 및 3에 상응한다. 묘사된 링커 서열은 서열 번호: 8이다. V α 쇄에 대하여 나타난 서열은 상부로부터 하부까지 서열 번호: 2, 22, 4, 2, 및 4에 상응한다.
- 도 2a는 TCR:pepMHC 복합체 (A6; PDB:1A07)의 측면도를 보여주는 3차원 다이어그램이다. α -쇄 및 β -쇄의 가변 (V) 및 불변 (C) 영역이 표시되어 있다. 제시되어 있는 구조에는 TCR의 C α 영역은 포함되어 있지 않다. HLA-A2 (α 1, α 2, α 3, 및 β 2m)은 회색으로 표시되어 있고, Tax 웨티드 (LLFGYPVYV; 서열 번호: 7)는 검은색으로 표시되어 있다. 본 발명에서 검사한 A6 TCR 및 WT1 TCR은 모두 V α 2 세그먼트 (또한 IMGT 명명법을 근거로 하여 TRAV12로서 언급함)을 사용한다.

도 2b는 웨티드-MHC (Tax/HLA-A2) 상의 TCR (CDR) 풋프린트의 하향식(top-down) 도면을 보여주는 3차원 다이아그램이다. 본 기재내용에 사용된 WT1 TCR에 대한 어떠한 결정 구조도 기술되어 있지 않지만, α 2 MHC 나선 및 웨티드의 N-말단 단부 위에 위치한 $V\alpha$ 영역 및 α 1 MHC 나선형 및 웨티드의 C-말단 단부 위에 위치한 $V\beta$ 영역이 있는, 이러한 대각선의 도킹 배향은 실제로 현재까지 모든 복합체에서 관찰되었다.

도 3은 웨티드:HLA-A2에 대한 개선된 친화도를 위한 단쇄 TCR의 조작 방법을 나타내는 다이아그램이다. 고친화도 TCR을 조작하는데 사용되는 일반적인 방법이 제시되어 있다.

도 4는 단쇄 T 세포 수용체 단편 ($V\alpha$ -링커 $V\beta$ 또는 $V\beta$ -링커- $V\alpha$)을 조작하기 위한 효모-디스플레이 시스템의 개략도이다.

도 5a 및 도 5b는 $V\beta$ 3의 형태 에피토프를 인식하는 항체에 의한 분류후 WT1 단쇄 TCR 실수유발(error prone) 라이브러리의 유세포 분석 히스토그램을 보여주는 것이다. WT1 실수유발 라이브러리는 총 3회의 분류 동안, Therma hVb3.1 FITC IgG 및 BC hVb3.2 FITC IgM 항체, AlexaFluor 647 염소 항-마우스 IgG 및 염소 항-마우스 IgM APC, 둘 모두의 1:10 희석에 이어서, 차례로 분류하였다. 각각의 분류 후 분취량의 효모 세포를 Therma hVb3.1 FITC IgG, AlexaFluor 647 염소 항-마우스 IgG의 1:10 희석액과 함께 인큐베이트시켰다. 회색은 오로지 2차 항체로만 염색한 효모 세포를 나타낸다 (도 5a). 3^{번째} 분류 후, 단리된 안정한 클론 WT1 D13을 Therma hVb3.1 FITC IgG, AlexaFluor 647 염소 항-마우스 IgG의 1:10 희석액으로 염색한다 (도 5b).

도 6a 및 도 6b는 WT1:HLA.A2에 의한 분류후 WT1 단쇄 TCR D13 CDR1 α 라이브러리의 유세포 분석 히스토그램을 나타낸다. WT1 D13 CDR1 α 라이브러리는 총 5개의 분류 동안, 100-200 nM WT1:HLA-A2 이량체 (다이머X; BD 파르미겐으로부터 입수)에 이어서, APC-접합된 염소 항-마우스 2차 항체를 이용하여 분류하였다. 그 다음에, 각각의 분류 후 분취량의 효모 세포를 100 nM WT1:HLA-A2 이량체 (다이머X; BD 파르미겐으로부터 입수)에 이어서, APC-접합된 염소 항-마우스 2차 항체를 이용하여 분류하였다. 회색은 오로지 2차 항체로만 염색한 효모 세포를 나타낸다 (도 6a). 5^{번째} 분류 후, 단리된 클론 WT1 D13.1을 100 nM WT1:HLA-A2 이량체 (다이머X; BD 파르미겐으로부터 입수)에 이어서, APC-접합된 염소 항-마우스 2차 항체를 이용하여 분류하였다 (도 6b).

도 7a 및 도 7b는 WT1:HLA.A2에 의한 분류후 WT1 단쇄 TCR D13.1 조합된 CDR3 라이브러리의 유세포 분석 히스토그램을 나타낸다. WT1 D13.1 조합된 CDR3 라이브러리는 총 3개의 분류 동안, 10-100 nM WT1:HLA-A2 이량체 (다이머X; BD 파르미겐으로부터 입수)에 이어서, APC-접합된 염소 항-마우스 2차 항체를 이용하여 분류하였다. 그 다음에, 각각의 분류 후 분취량의 효모 세포를 100 nM WT1:HLA-A2 이량체 (다이머X; BD 파르미겐으로부터 입수)에 이어서, APC-접합된 염소 항-마우스 2차 항체를 이용하여 분류하였다. 회색은 오로지 2차 항체로만 염색한 효모 세포를 나타낸다 (도 7a). 3^{번째} 분류 후, 단리된 클론 WT1 D13.1.1을 100 nM WT1:HLA-A2 이량체 (다이머X; BD 파르미겐으로부터 입수)에 이어서, APC-접합된 염소 항-마우스 2차 항체를 이용하여 분류하였다 (도 7b).

도 8a 및 도 8d는 WT1:HLA-A2 단량체에 대한 고친화도 TCR, WT1 D13.1.1의 결합 특성을 나타낸다. 도 8a는 2차로서 형광 표지된 항-Ig 항체에 이어, 다양한 농도의 WT1:HLA-A2 이량체로 염색한, 고친화도 scTCR WT1 D13.1.1을 보여주는 유세포 분석 히스토그램이다. 도 8b는 SA-PE (1:100) 2차에 이어서, 다양한 농도의 비오티닐화된 (biotinylated) WT1:HLA-A2 단량체로 염색한, 고친화도 scTCR WT1 D13.1.1의 유세포 분석 히스토그램을 나타낸다. 도 8c는 WT1:HLA-A2 이량체 농도에 대한 도시된 도 7a의 히스토그램의 평균 형광 강도(MFI)를 나타내는 선 그래프이다. 도 8d는 WT1:HLA-A2 단량체 농도에 대한 도시된 도 8b의 히스토그램의 평균 형광 강도(MFI)를 나타내는 선 그래프이다.

도 9a 및 도 9e는 이.콜라이에 발현된 가용성 고친화도 TCR WT1 D13.1.1의 결합을 나타낸다. 도 9a 내지 도 9d는 비오틴-표지된 WT1-D13.1.1 TCR으로의 인큐베이션에 이어서, 웨티드 없음 (도 9a), 음성 대조군 웨티드 Tax (도 9b), 음성 대조군 웨티드 MART-1 (도 9c), 또는 웨티드 WT1 (도 9d)으로 우선 인큐베이트된 인간 T2 (HLA-A2+) 세포의 유세포 분석을 나타내는 일련의 히스토그램이다. 도 9e는 WT1-D13.1.1 TCR가 적어도 260 nM의 최소 친화도 (K_D)을 갖는다 (이러한 범위 내에서 과소평가된 친화도 내의 유세포분석에서의 세포 세정으로서)는 것을 보여주는 적정을 도시한다.

도 10a 및 10b는 마우스 T 세포 내 야생형 P22, D13.1, D13.0.1 및 D13.1.1 TCR의 활성을 나타낸다. 단리된 마우스 CD8 (도 10a) 및 CD4 (도 10b) T 세포를 P22, D13.1, D13.0.1 및 D13.1.1 TCR (변형된 TCR은 $V\beta$ 영역 내 D13 "안정화" 돌연변이:로 형질도입하였다. F48S 및 D51G를 함유한다). 형질도입된 T 세포를 이후 HLA-A2+ APC

및 다양한 농도의 WT1 펩티드 24시간의 인큐베이션 후에, IFN- γ 농도를 표준 ELISA를 사용하여 측정하였다.

도 11은 CD8 T 세포 내 고 친화도 TCR WT1 D13.1.1가 WT1 구조적 유사 인간 펩티드의 패널에 대해 활성을 나타내지 않았다는 것을 보여준다. WT1 구조적 유사 펩티드를, WT1 펩티드의 9개 잔기 각각에서 보존적 돌연변이를 갖는 펩티드에 대한 인간 프로테오솜의 검색을 통하여 결정하였다 (서열 번호: 6). 고친화도로 HLA-A2에 결합하도록 예측된 10개의 펩티드를 이후 합성하였다. 펩티드 번호 1-10은 서열 번호: 25-34에 각각 상응한다. 마우스 CD8 T 세포를 단리하고 D13.1.1 TCR (V β 영역 내 D13 안정화 돌연변이, F48S 및 D51G 비함유)로 형질도입하고, 각각의 펩티드 및 HLA-A2+ APC로 24시간동안 인큐베이트하였다.

도 12a 및 도 12b는 WT1-특이적 TCR의 예시적인 치료학적 적용을 도시한 다이아그램이다. 도 12a는 가용성 치료학적 생성물로서 사용하기 위한 TCR 양식의 5가지 예를 도시한 것이다: 1) V α -V β 배향 또는 V β -V α 배향의 단쇄 TCR (여기서, 돌연변이화된, 고친화도 V 도메인은 별표로 표시); 2) 프레임 내에서 항체의 불변 영역 도메인과 융합된 단쇄 TCR; 3) 프레임 내에서 경쇄 또는 중쇄의 불변 영역에 융합된 면역글로불린 융합체; 4) 약물에 직접 커플링된 단쇄 TCR (또는 2 및 3에 제시된 면역글로불린 융합체); 및 5) 이중특이적 제제를 생성하기 위하여 프레임 내에서 단쇄 Fv (VL-링커-VH)와 함께 연결된 단쇄 TCR. 도 12b는 인간 T 세포로의 입양 T 세포 요법을 위하여 사용될 수 있는, 효모 디스플레이에 의해 단리된 고친화도의 가변 도메인 (V) 또는 야생형 TCR V 도메인을 이용하는 세포 기반 요법의 두 가지 예를 도시한다. TCR은 입양 T 세포 요법에 의한 발현을 위하여 포유동물 세포 백터 내로 다음과 같이 클로닝된다: 1) 키메라 항원 수용체 내 단쇄 수용체 (CAR) 및 2) 전장 α 및 β TCR.

서열의 간단한 설명

서열 번호: 1은 WT1/HLA-A2에 결합된 TCR (P22)의 야생형 V β 영역의 아미노산 서열이다.

서열 번호: 2은 WT1/HLA-A2에 결합된 TCR (P22)의 야생형 V α 영역의 아미노산 서열이다.

서열 번호: 3은 WT1/HLA-A2에 대해 고친화도로 결합된 TCR (D13.1.1)의 변형된 V β 영역의 아미노산 서열이다.

서열 번호: 4는 WT1/HLA-A2에 대해 고친화도로 결합된 TCR (D13.1.1)의 변형된 V α 영역의 아미노산 서열이다.

서열 번호: 5는 WT1/HLA-A2에 대해 고친화도로 결합된 단쇄 TCR (WT1-D13.1.1)의 아미노산 서열이다.

서열 번호: 6은 WT-1 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호: 7은 Tax 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호: 8은 링커의 아미노산 서열이다.

서열 번호: 9는 프라이머 스플라이스 4L의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호: 10은 WT1-D13 CDR1 α 라이브러리의 PreSOE #1을 생성하는데 사용되는 역 프라이머(reverse primer)의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호: 11은 WT1-D13 CDR1 α 라이브러리의 PreSOE #2를 생성하는데 사용되는 역 프라이머(reverse primer)의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호: 12는 프라이머 T7의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호: 13은 WT1-D13.1 CDR3 β 1 라이브러리의 PreSOE #1을 생성하는데 사용되는 역 프라이머(reverse primer)의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호: 14는 WT1-D13.1 CDR3 β 1 라이브러리의 PreSOE #2를 생성하는데 사용되는 전방 프라이머(forward primer)의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호: 15는 WT1-D13.1 CDR3 β 2 라이브러리의 PreSOE #1을 생성하는데 사용되는 역 프라이머(reverse primer)의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호: 16은 WT1-D13.1 CDR3 β 2 라이브러리의 PreSOE #2를 생성하는데 사용되는 전방 프라이머(forward primer)의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호: 17은 WT1-D13.1 CDR3 α 1 라이브러리의 PreSOE #1을 생성하는데 사용되는 역 프라이머(reverse primer)의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호: 18은 WT1-D13.1 CDR3 α1 라이브러리의 PreSOE #2를 생성하는데 사용되는 전방 프라이머(forward primer)의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호: 19는 WT1-D13.1 CDR3 α2 라이브러리의 PreSOE #1을 생성하는데 사용되는 역 프라이머(reverse primer)의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호: 20은 WT1-D13.1 CDR3 α2 라이브러리의 PreSOE #2를 생성하는데 사용되는 전방 프라이머(forward primer)의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호: 21은 WT1/HLA-A2에 대해 고친화도로 결합된 TCR (D13)의 변형된 Vβ 영역의 아미노산 서열이다.

서열 번호: 22는 WT1/HLA-A2에 대해 고친화도로 결합된 TCR (D13)의 변형된 Vα 영역의 아미노산 서열이다.

서열 번호: 23은 인플루엔자 A 웨티드의 아미노산 서열이다.

서열 번호: 24는 변이체 인플루엔자 A 웨티드의 아미노산 서열이다.

서열 번호: 25 내지 34는 WT1 변이체 웨티드의 아미노산 서열이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030]

하기 설명은 본 개시내용의 이해를 돋기 위한 것이다, 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0031]

일반적으로, 본원에서 사용되는 용어 및 어구는 이의 관련 기술분야에 알려져 있는 의미를 가지며, 이는 당해 분야의 기술자에게 공지된 표준 교재, 저널 참고 문헌 및 맥락을 참조함으로써 살펴볼 수 있다. 하기 정의는 본 개시내용의 맥락에서의 그들의 구체적인 용도를 명확하게 하기 위해 제공된다.

[0032]

본원에서 사용되는바, "연결된(linked)"이라는 것은 공유 또는 비-공유 회합될 수 있는, 두 기 사이의 회합을 의미한다. 기들은 다양한 길이의 웨티드 쇄, 비-아미노산 화학기 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 수단을 사용하여 연결될 수 있다. 링커 영역은 단백질 또는 웨티드의 두 작용성 또는 구조적 도메인을 작동가능하게 연결시키는 아미노산 서열일 수 있다.

[0033]

본원에서 사용되는바, "화학치료제"라는 용어는 암 세포, 암 세포 집단, 종양 또는 다른 악성 조직의 성장, 증식, 또는 확산을 감소시키거나, 방해할 수 있는 임의의 물질을 의미한다. 상기 용어는 또한 임의의 항종양제 또는 항암제를 포함하는 것으로 한다.

[0034]

본원에서 사용되는바, "유효량"이라는 용어는 약제학적으로 유효량 또는 치료학적 유효량과 같은 맥락을 포함하는 것으로 한다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 유효량은 유익한 상태, 유익한 결과, 스크리닝 검정에서 기능적 활성, 또는 임상 병증의 증진을 달성할 수 있다.

[0035]

본원에서 사용되는바, "암 세포"라는 용어는 관련 기술분야에서 광범위하게 이해되는 바와 같은 정의를 포함하고자 한다. 일 실시형태에서, 본 용어는 인간 또는 동물에서 암의 임상적 병증의 원인이 될 수 있는, 비정상적으로 조절된 세포를 의미한다. 일 실시형태에서, 본 용어는 배양된 세포주, 또는 인체 또는 동물 신체 내에 존재하거나, 또는 그로부터 유래된 세포를 의미할 수 있다. 암 세포는 관련 기술분야에서 이해되는 것과 같은 매우 다양한 분화된 세포, 조직, 또는 기관 유형의 것일 수 있다. 암 세포의 특정 예로는 유방암, 결장암, 피부암, 난소암, 백혈병, 폐암, 간암, 고환암, 식도암, 및 다른 유형의 암을 포함한다.

[0036]

본원에서 사용되는바, "치료하는(treating)" 또는 "치료(treatment)"는 바람직하게는 임상 결과를 포함한, 유용하거나 바람직한 결과를 수득하기 위한 접근법을 의미한다. 치료는 질환 또는 병증 증상의 완화, 또는 질환 또는 병증 진행의 지연을 의미할 수 있다.

[0037]

본원에서 사용되는바, "예방(prevention)" 또는 "예방하는(protecting)"은 질환 또는 병증의 개시 또는 재발 가능성을 예방, 억제, 또는 감소시키기 위한 접근법을 의미한다. 그것은 또한 질환 또는 병증의 발생 또는 재발 가능성의 예방, 억제, 또는 감소를 의미하며, 또한 질환 또는 병증의 개시 또는 재발 전에 질환 또는 병증의 세기, 효과, 증상 및/또는 부담의 감소를 포함한다.

[0038]

본원에서 사용되는바, "세포 성장을 억제하는" 또는 "세포 증식을 억제하는"은 세포의 성장 속도를 감소시키거나 멈춤을 의미한다. 예를 들어, 종양 세포의 성장을 억제함으로써 종양 크기의 증가 속도를 느리게 할 수 있다. 다른 실시형태에서, 종양은 동일한 크기로 머물거나 크기가 감소, 즉 퇴행할 수 있다. 특별한 실시형태에서, 세포 성장 또는 세포 증식의 속도는 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도

70%, 적어도 80% 또는 적어도 90%까지 억제된다.

[0039] "야생형(wild type)" 및 "wt"라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 이는 항원에 대한 특이성을 가지는, 천연적으로 발생된 또는 비-변형된 TCR, 예컨대, 원래의 또는 모체 T 세포 클론으로부터 단리된 가변 영역을 암호화하는 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 TCR과 관련하여 사용된다.

[0040] 아미노산 서열을 제공하는 도 및 표에서, 야생형은 "wt"로 표시된다. 상단 서열 아래 제공된 서열에서, 대시(-) 표시는 아미노산이 wt 또는 정렬 중 상단 서열에 제시된 것과 동일하다는 것을 의미한다. 문자는 상기 위치에서 상단 서열로부터 치환이 이루어졌다는 것을 나타낸다.

[0041] 본원에서 사용되는바, "변형된(modified)", "변이체," "돌연변이체," "돌연변이화된" 및 "유래된(derived)" T 세포 수용체라는 용어는 원래 또는 야생형 T 세포에 비하여 하나 이상의 돌연변이를 갖는 가변 영역의 TCR 서열을 의미한다. 변형된 TCR의 예로는 더 높은 친화도를 가지는 TCR을 포함한다.

[0042] 코돈 서열은 단백질의 아미노산 서열, 또는 기능적인 RNA, 예컨대, tRNA 또는 rRNA를 암호화하는 유전자 또는 cDNA의 일부이다.

[0043] 보체 또는 상보성 서열은 왓슨 크릭(Watson-Crick) 염기쌍 형성 법칙에 따라 뉴클레오티드의 또 다른 서열과 수소 결합 이중체를 형성하는 뉴클레오티드의 서열을 의미한다.

[0044] 하류(downstream)란 DNA 또는 RNA 중의 상대적인 위치를 의미하고, 이는 가닥의 3' 단부쪽 영역이다.

[0045] 발현이란 유전자의 구조 RNA (rRNA, tRNA) 또는 메신저 RNA (mRNA)로의 전사, 및 이어서, mRNA의 단백질로의 번역을 의미한다.

[0046] 서열이 동일 유기체에서 동일한 배열로 함께 천연적으로 발생된 것이 아닌 한, 유기체가 다른 종인지 여부와는 상관없이, 서열이 별개의 유기체로부터 유래된 것이라면, 두 핵산 서열은 서로 이종성이다.

[0047] 상동성이란 두 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 동일성 정도를 의미한다.

[0048] 구체적으로 예시된 TCR 서열과 기능적으로 등가인 아미노산 서열은 단일 또는 다중 아미노산 치환에 의해, 아미노산의 부가 및/또는 결실에 의해 변형되었거나, 또는 하나 이상의 아미노산이 화학적으로 변형되었지만, 그럼에도 불구하고, 본 개시내용의 세포 결합 또는 가용성 TCR 단백질의 결합 특이성 및 고친화도 결합 활성을 유지하는 아미노산 서열이다. 기능적으로 등가인 뉴클레오티드 서열은 구체적으로 예시된 세포 결합 또는 가용성 TCR 단백질과 실질적으로 동일한 생물학적 활성을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 것이다. 본 개시내용과 관련하여, 가용성 TCR 단백질은 천연 세포 결합 TCR의 일부를 포함하지 않고, 용액 중에서 안정적이다 (즉, 본원에 기술된 바와 같이 단백질 용액을 위한 표준 조건하에서 처리되었을 때, 일반적으로는 용액에서 응집되지 않음).

[0049] "단리된"이라는 용어는 인공적으로 천연 상태로부터 변경된 조성물, 화합물, 물질, 또는 분자를 의미한다. 예를 들어, 자연적으로 발생된 조성물 또는 물질이 이의 원래의 환경으로부터 변이되었거나 또는 제거되었다면, 또는 그 둘 모두가 이루어졌다면, 단리된 것이다. 상기 용어가 본원에서 사용되는 바와 같이, 예를 들어, 살아있는 동물 중에 자연적으로 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 단리된 것이 아니지만, 이의 자연 상태의 공존하는 물질로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 단리된 것이다.

[0050] 핵산 작제물은 천연적으로 발생된 유전자로부터 단리되었거나, 다르게는 자연상에는 존재하지 않는 방식으로 조합되고, 병치된 핵산 세그먼트를 함유하도록 변형된 핵산 분자이다.

[0051] 핵산 분자는 3'-5'-포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드를 함유하는 단일 또는 이중 가닥 선형 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[0052] 연결 특성이, 서로 비교하여 두 서열의 정상적인 기능에 영향을 주는 서열의 능력을 방해하지 않는다면, 두 DNA 서열은 작동가능하게 연결되어 있는 것이다. 예를 들어, 프로모터가 암호화 서열의 전사에 영향을 줄 수 있다면, 프로모터 영역은 암호화 서열에 작동가능하게 연결된 것이다.

[0053] 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산의 선형 중합체이다.

[0054] "프로모터"라는 용어는, 일반적으로 길이가 80-120 염기쌍이고, 유전자의 개시 부위의 상류에 위치하는 것으로서, RNA 폴리머라제가 그에 결합하여 올바른 전사를 개시할 수 있는, 시스-작용 DNA 서열을 의미한다. 전사 조절을 작동/비작동시키고/거나, 하류 암호화 서열의 발현을 증진 (증가)시키는 추가의 전사 조절 서열이 희합되어 있을 수 있다.

- [0055] 재조합 핵산 분자, 예를 들어, 재조합 DNA 분자는 2개 이상의 비상동성 DNA 분자의 결합을 통해 시험관내에서 형성된 신규한 핵산 서열 (예를 들어, 적어도 1개의 클로닝 부위로 클로닝된 외래 DNA의 하나 이상의 삽입체를 함유하는 재조합 플라스미드)이다.
- [0056] "형질전환(transformation)" 및 "형질감염(transfection)"이라는 용어는 세포의 계놈의 대상체 세포의 계놈 내로의 흡수 및 통합을 유도하는, 상이한 유전자형의 또 다른 세포로부터의 정제된 재조합 DNA의 외부 적용에 의한 세포의 계놈의 지정된 변형을 의미한다. 박테리아에서, 재조합 DNA는 전형적으로 박테리아 염색체 내로 통합되지 않고, 대신 플라스미드로서 자율적으로 복제된다. "형질전환된" 또는 "형질감염된"이라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 예를 들어, T 세포는 입양 T 세포 처리 전에 본원에 기술된 변형되거나 고친화도의 TCR을 암호화하는 DNA 서열로 형질감염될 수 있다.
- [0057] 상류란 DNA 또는 RNA 중 임의 부위의 5'측 상의 것을 의미한다.
- [0058] 벡터는 숙주 세포에서 자율적으로 복제할 수 있고, 외래 DNA를 수용할 수 있는 핵산 분자이다. 벡터는 외래 DNA의 삽입을 위해 사용될 수 있는 제한 엔도뉴클레아제에 대한 하나 이상의 독특한 인식 부위인 그 자신의 복제 기점, 및 대개 선별 가능한 마커, 예컨대, 항생제 저항성을 암호화하는 유전자, 및 종종 삽입된 DNA의 발현을 위한 인식 서열 (예컨대, 프로모터)을 보유한다. 일반 벡터는 플라스미드 벡터 및 파지 벡터를 포함한다.
- [0059] 고친화도 T 세포 수용체 (TCR)는 표적 리간드에 대하여 야생형 TCR보다 더 강력하게 결합하는 조작된 TCR이다. 고친화도의 일부 예로는 표적 리간드에 대한 평형 결합 상수가 약 10^{-6} 내지 10^{-12} M 및 그 안의 모든 개별 값 및 범위를 포함한다. 이 범위는 야생형의 친화도인 10^{-4} 내지 10^{-6} M로 보고된 값 내지 유도 진화에 의해 단리된 값 (약 10^{-12} M) 사이인 친화도를 포함한다.
- [0060] 시토카인은 다른 세포에 영향을 주는 세포에 의해 제조된 단백질, 웨티드 또는 당단백질이다.
- [0061] 포유동물로는 인간 및 비-인간 포유동물 모두를 포함한다.
- [0062] 유전자 코드의 축퇴성에 기인하여 기능상 등가인 다수의 뉴클레오티드 서열이 동일한 아미노산 서열을 암호화한다는 것은 당해 분야의 기술자에 의해 이해될 것이다.
- [0063] T 세포 수용체
- [0064] T 세포 수용체 (TCR)는 T 세포의 표면 상에서 쌍을 형성하여 이종이량체 수용체를 형성하는 2개의 쇄 ($\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$)로 구성된다. $\alpha\beta$ TCR은 체내 대부분의 T 세포 상에서 발현되며, 이는 MHC-제한 항원의 인식에 관여하는 것으로 알려져 있다. 현재 $\alpha\beta$ TCR의 분자 유전학적 성질, 구조, 및 생화학적 성질이 철저하게 연구되고 있다. α 및 β 쇄는 각각 2개의 도메인: 세포막 중의 단백질을 고정시키고, CD3 신호전달 기구의 불변 서브유니트와 회합하는 불변 도메인 (C), 및 6개의 루프를 통해 항원 인식을 부여하는 것으로서, 상보성 결정 영역(CDR)이라고 명명되는 가변 도메인 (V)으로 구성된다. 각각의 V 도메인은 3개의 CDR을 가진다. 이들 CDR은 주조직 적합 복합체에 의해 암호화된 단백질에 결합된 항원성 웨티드 사이의 복합체 (pepMHC)와 상호작용한다 (문헌 [Davis and Bjorkman (1988) Nature, 334, 395-402]; [Davis et al. (1998) Annu Rev Immunol, 16, 523-544]; [Murphy (2012), xix, 868 p.]).
- [0065] TCR의 분자 유전학을 통해, 조합되어 V 도메인의 암호화 영역을 형성하는 다중 유전자 사이의 유전자 재조합 과정이 밝혀졌다. 초기 과정은, 중쇄 및 경쇄 유전자가 재배열됨으로써 B 세포-유래 항체가 보이는 엄청난 다양성을 생성하는 항체 발생과 유사하다 (문헌 [Tonegawa (1988) In Vitro Cell Dev Biol, 24, 253-65]). T 세포의 경우, α 쇄 V 도메인은 (인간에서 약 75개 중) 한 V 영역에서 (인간에서 약 61개 중) 한 연결 (J) 유전자 세그먼트로의 재배열에 의해 형성된다 (도 5.8, 문헌 [Janeway, 제8 판]). β 쇄 V 도메인은 (인간에서 약 52개 중) 한 V 영역에서 (인간에서 2개 중) 한 다양성 (D) 유전자, 이어서, (인간에서 13개 중) 한 연결 (J) 유전자 세그먼트로의 재배열에 의해 형성된다 (도 5.8, 문헌 [Murphy (2012), xix, 868 p.]). $V\alpha J\alpha$ 및 $V\beta D\beta J\beta$ 유전자 재배열의 접합부는 각 쇄의 CDR3 루프를 암호화하고, 이들은 $\alpha\beta$ TCR의 엄청난 다양성에 기여하는데, 이론상의 한계는 10^{15} 개의 상이한 TCR을 초과하고 (문헌 [Davis and Bjorkman (1988) Nature, 334, 395-402]), 전체적으로는 단지 약 10^{11} 개의 T 세포만이 존재하기 때문에 인간에서는 달성가능한 다양성을 훨씬 초과한다 (문헌 [Mason (1998) Immunol Today, 19, 395-404]). 초기 루프는 V 유전자 내에서 암호화되고, TCR에서는 생체내 체세포 돌연변이가 일어나지 않는바, 각 쇄의 가능한 CDR1 및 CDR2 다양성은 V 유전자의 개수로 표현된다. 비록 CDR3 루프와 비교하여, CDR1 및 CDR2 루프의 다양성이 상대적으로 제한되기는 하지만, 웨티드 항원 및/또는 MHC

생성물에 기초하여 특정 V 영역에 대한 선택이 이루어지는 예가 다수 존재한다.

[0066] 부류 I MHC 생성물은 길이가 8 내지 10개의 아미노산인 웨프티드에 결합하고, 그들은 체내 모든 유핵 세포 상에서 발현된다 (문헌 [Rock and Goldberg (1999) Annu Rev Immunol, 17, 739-79]에 의해 리뷰). 항체-항원 상호작용의 결합 에너지는 모두 외래 항원에 집중되는 반면, TCR-웨프티드:MHC의 결합 에너지 중 상당부는 자가-MHC 분자로 지정된다 (문헌 [Manning and Kranz (1999) Immunology Today, 20, 417-422]). 실제로, 더욱 최근의 연구를 통해 제안되었는 바, CDR1 및/또는 CDR2 루프의 특정 잔기는 진화되어 MHC 나선 상의 특정 잔기와 상호작용함으로써 MHC에 대해 기본 친화도를 제공하는데, 이는 MHC-제한 과정을 설명하는 것이다 (문헌 [Garcia et al. (2009) Nat Immunol, 10, 143-7]; [Marrack et al. (2008) Annu Rev Immunol, 26, 171-203]).

[0067] 1) (CD8 공동-수용체가 없는) CD4 헬퍼 T 세포의 활성을 구동시키기 위해, 또는 2) 세포의 직접적인 표적화를 위해 사용될 수 있는 가용성 TCR을 발생시키기 위해, "효과기" 분자 (예컨대, 이중특이성 단백질을 형성하는 항-CD3 항체와 같은 항체 Fc 부위, 독성 약물, 또는 항체 scFv)를 부착시킴으로써 (소위 더 높은 친화도를 가지는 TCR이라고 불리는) 웨프티드-MHC 항원 (부류 I)에 대하여 정상 범위를 초과하는 친화도를 가지는 TCR을 사용하는 것이 관심의 대상이 되고 있다 (문헌 [Ashfield and Jakobsen (2006) IDrugs, 9, 554-9]; [Foote and Eisen (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97, 10679-81]; [Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92]; [Molloy et al. (2005) Curr Opin Pharmacol, 5, 438-43]; [Richman and Kranz (2007) Biomol Eng, 24, 361-73]). 이러한 접근법을 통해서는 또한 그로써 이의 T 세포가 잠재적인 종양 항원에 대하여 적절한 특이성 및 결합 친화도를 가지는 TCR을 발현하지 않음으로써 (부분적으로는 흥선 및 말초적 내성 과정에 기인하여) 일부 암 환자가 직면한 문제들을 극복할 수 있었다. 예를 들어, 현재 300개가 넘는 MHC-제한, T 세포-정의된 종양 항원이 확인되었다 (cancerimmunity.org/peptide/) (문헌 [Boon and Old (1997) Curr Opin Immunol, 9, 681-3]; [Cheever et al. (2009) Clin Cancer Res, 15, 5323-37]). 이를 종양 항원으로는 돌연변이화된 웨프티드, 분화 항원, 및 과다발현된 항원을 포함하는데, 이들 모두는 요법에 대한 표적으로서의 역할을 한다. 현재까지 기술된 암 항원들 대다수는 오직 MHC 분자와 관련하여 세포 표면에서만 표적화될 수 있는 세포내 단백질로부터 유래된 것이기 때문에, TCR은 이런 부류의 항원을 인식하도록 진화된 것인 바, 이는 치료제에 대한 이상적인 후보 물질이 된다.

[0068] 유사하게, TCR은 감염된 세포에서 천연적으로 프로세싱되고, 세포 표면 상의 MHC 분자에 의해 디스플레이된 바이러스 단백질로부터 유래된 웨프티드를 검출할 수 있다. HIV 및 HTLV 중 바이러스 계놈으로부터 유래된 웨프티드를 포함한, 다수의 바이러스 항원 표적은 지난 25년간에 걸쳐 확인되었다 (예컨대, 문헌 [Addo et al. (2007) PLoS ONE, 2, e321]; [Tsomides et al. (1994) J Exp Med, 180, 1283-93]; [Utz et al. (1996) J Virol, 70, 843-51]). 그러나, 이들 질환을 앓는 환자에는 감염된 세포의 결합 및 파괴를 위해 최적인 TCR이 없을 수도 있다. 최종적으로, TCR은 고도로 특이적인 과정에서 자가면역 표적의 수용체 길항제로서, 또는 국소 면역 세포 반응을 면역억제시키는 전달제로서 사용될 수 있으며, 이로써 일반적인 면역 억제를 피할 수 있다 (문헌 [Molloy et al. (2005) Curr Opin Pharmacol, 5, 438-43]; [Stone et al. (2012) Protein Engineering]).

변형된 T 세포 수용체

[0069] 유도 진화는 특이적인 pepMHC에 대하여 더 높은 친화도를 가지는 TCR을 생성하는데 사용되어 왔다. 사용되어 왔던 3가지 상이한 디스플레이 방법은 효모 디스플레이 (문헌 [Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62]; [Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92]), 파지 디스플레이 (문헌 [Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54]), 및 T 세포 디스플레이 (문헌 [Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84])이다. 3가지 접근법 모두에서, 과정은 야생형 TCR의 정상적인, 저친화도를 보이는 TCR을 조작하여 TCR의 돌연변이체가 특이적인 pepMHC (즉, T 세포가 그에 대해 특이적인 것인 원래의 항원)에 대해 증가된 친화도를 가지도록 하는 단계를 포함한다. 따라서, 야생형 TCR은 하나 이상의 CDR에 돌연변이 유발된 라이브러리를 제조하기 위한 주형으로서 사용되었고, 이어서, 더 높은 친화도를 가지는 돌연변이체는 동족 웨프티드-MHC 항원에 의해 결합에 의해 선별되었다. 초기 시험관내 유도 진화는 야생형 친화도보다 단지 몇 배 더 높은 친화도를 조작하기 위하여 필요하다고 관련 분야에 잘 알려져 있다.

[0070] 효모 디스플레이를 통해 관심의 대상이 되는 단백질이 Aga2-융합체로서 표면 상에서 발현될 수 있다 (문헌 [Boder and Wittrup (1997) Nat. Biotech., 15, 553-557]; [Boder and Wittrup (2000) Methods Enzymol, 328, 430-44]). 이 시스템은 더 높은 친화도를 가지는 TCR, 단체 항체, 페브로넥틴, 및 다른 단백질을 조작하는 데 성공적으로 사용되어 왔다. 효모 디스플레이 시스템에서, TCR은 V β -링커-V α 또는 V α -링커-V β 형태의 안정화된 단체 단백질로서 (문헌 [Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72];

[Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92]; [Kieke et al. (1999) Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 5651-6]; [Richman et al. (2009) Mol Immunol, 46, 902-16]; [Weber et al. (2005) Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 19033-8]), 또는 2쇄 이종이량체로서 (문헌 [Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72]; [Richman et al. (2009) Mol Immunol, 46, 902-16]) 디스플레이되었다. 상기 시스템: 2C (MHC 부류 I 제한) 및 3.L2 (MHC 부류 II 제한)를 사용하여 2개의 마우스 TCR이 더 높은 고친화도를 가지도록 조작되었다 (문헌 [Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92]; [Weber et al. (2005) Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 19033-8]). 최근에는 또한 IMGT 명명법에 의하여 TCRA12로 또한 알려진, V α 2로 불리우는 인간 V α 영역의 이례적인 안정성을 이용함으로써 (scTv 또는 scTCR로 명명되는) 인간 TCR 단쇄 V α V β 단편이 개발되었다 (문헌 [Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72]). 이러한 경우, 단쇄 양식의 시험관내에서 조작된 고친화도 T 세포 수용체를 사용하여, 효모의 표면 상에서, 및 이. 콜라이(*E. coli*)로부터의 가용성 형태, 둘 모두로 안정한 단백질로서 발현될 수 있는 인간 안정화된 scTv 단편 (V β -링커-V α)을 단리시켰다. 상기 TCR은 2개의 안정화된 인간 scTv 단편, 인간 T 세포 림프영양성 바이러스 Tax 단백질로부터 유래된 펩티드에 특이적인 A6 scTv, 및 인간 면역결핍 바이러스 Gag 단백질로부터 유래된 펩티드 (펩티드: SL977-85)에 특이적인 868 scTv를 포함하였다. 이들 TCR 모두는 V α 2 유전자 (IMGT: TRAV12 패밀리)를 사용하였지만, 그들은 TCR이 단리된 원래의 T 세포 클론으로부터 유래된 CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β , 및 CDR3 β 잔기를 가졌다. 따라서, 이들 scTCR의 더 높은 친화도를 가지는 돌연변이체들은 각각 그들의 동족 펩티드-MHC 항원에 대한 그들의 원래의 (모체) TCR로부터 유래되었다.

[0072]

2번째 시스템인 파지 디스플레이에서, 관심의 대상이 되는 단백질을 바이러스 코트 단백질의 N-말단에 융합시킨다 (문헌 [Scott and Smith (1990) Science, 249, 386-90]). 상기 방법을 사용하여 A6, 868, 및 1G4 (MHC 부류 I 제한)로 명명되는 것을 포함한, 다양한 TCR이 더 높은 고친화도를 가지도록 조작되었다 (문헌 [Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54]; [Sami et al. (2007) Protein Eng Des Sel, 20, 397-403]; Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med, 14, 1390-5]). α 및 β 쇄의 쌍 형성을 촉진시키기 위해 두 C 도메인 사이의 비-천연 디설파이드 결합 도입에 의해 이들 TCR의 파지 디스플레이를 할 수 있었다. 따라서, 이 시스템은 이의 동족 펩티드-MHC에 대한 조작을 위해 원래의 T 세포 클론으로부터 유래된 전장의 (V α C α /V β C β) 이종이량체 단백질을 이용한다.

[0073]

TCR 조작을 위한 것으로 보고된 세 번째 시스템은 포유동물 세포 디스플레이이다 (문헌 [Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84]; [Kessels et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 14578-83]). 이 시스템은 TCR α 및 β 쇄를 TCR-음성 T 세포 하이브리도마 내로 도입하는데 레트로바이러스 백터를 사용한다. 한 연구에서 (문헌 [Kessels et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 14578-83]), 선택된 돌연변이체 TCR은 동족 펩티드와 구조상 매우 유사한 펩티드 (ASNENMDAM 대 ASNENMETM, 각각 서열 번호 23 및 24)에 결합하는 것으로 나타났다. 다른 연구에서, 돌연변이체 TCR의 친화도는 동족 pepMHC에 대해 증가된 것으로 나타났다 (문헌 [Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84]). 상기의 더 높은 친화도를 가지는 TCR은 또한 동족 펩티드의 구조상 유사한 변이체에 대해 더 높은 고친화도를 보인다는 것이 많은 연구를 통해 밝혀졌다 (예컨대, 문헌 [Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62]). 포유동물 세포 디스플레이 시스템에서, 도입된 TCR은 CD3 서브유니트와 복합체를 형성한, 이의 천연 입체형태로 표면 상에서 발현되었고, 이를 통해 완전히 기능적인 T 세포 (신호전달 적격)가 허용되었다. 이에 따라 이의 천연 숙주내 전장의 이종이량체 TCR이 본 방법을 사용하여 조작되었다.

[0074]

WT1/HLA-A2에 결합하는 고친화도 TCR

[0075]

본 발명은 잘 알려진 암 항원 WT1/HLA-A2에 대한 다양한 고친화도의 TCR 및 야생형 TCR을 제공하는 것이다. 특정 실시형태에서, 조작된 TCR은 생체내에서 표적화된 전달을 위해 가용성 형태로, 또는 입양 전달 방법 또는 치료에서 T 세포에 의해 재조합적으로 발현되는 바와 같이 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 단쇄 V α V β 형태의 TCR (scTCR) 스캐폴드가 제조될 수 있고, TCR이 결합하는 위치 (예컨대, 종양)에 효과기 분자를 전달하기 위하여 페이로드, 예컨대, 시토카인, 독소, 방사성 동위 원소, 화학치료제, 또는 약물 (항체-약물 접합체와 유사)과 함께 사용될 수 있다. TCR은 또한 예컨대, WT1을 발현하는 암 세포에 대한 반응을 매개하기 위한 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 및/또는 자연살 (NK) 세포의 입양 전달과 같은 세포 요법에서 사용될 수 있다. 본원에서 제공하는 scTCR 스캐폴드는 또한 검출가능한 기, 예컨대, 방사성 동위 원소 또는 형광성 모이어티에의 공유 결합, 예를 들어, TCR의 아민-반응성 또는 슬프히드릴-반응성 아미노산 측쇄를 통한 공유 결합에 의해 예컨대, 신생물 또는 바이러스 관련 세포-표면 항원의 확인을 통한 예컨대, 악성 또는 바이러스 감염 세포의 진단을 위해 사용될 수 있다.

- [0076] 일 실시형태에서, 본원에 기술된 scTCR 단백질은 효모, 과자, 또는 포유동물 세포의 표면 상에 디스플레이될 수 있고, WT1 항원에 대하여 보다 더 높은 친화도를 가지는 TCR을 조작하는 테 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 본원에 기술된 scTCR 단백질은, 예를 들어, 원핵 세포, 예컨대, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 아스페질러스 니거(*Aspergillus niger*), 아스페질러스 피쿠움(*Aspergillus ficuum*), 아스페질러스 아와모리(*Aspergillus awamori*), 아스페질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*), 트리코데마 리제이(*Trichoderma reesei*), 뮤코르 미에헤이(*Mucor miehei*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 또는 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 곤충 세포 (예컨대, 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*)), 세포주, 예컨대, 차이니즈 햄스터 난소 세포주 (CHO)를 포함한 포유동물 세포, 또는 식물 종 (예컨대, 카놀라, 대두, 옥수수, 감자, 보리, 호밀, 밀), 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 단백질 발현 공급원에서 발현될 수 있고, 다양으로 제조될 수 있다. TCR은 또한 예를 들어, 단지 일례로, 세포 표면상의 특이적인 웨პ티드/MHC를 검출하는 테 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 개시된 scTCR 유전자는 DNA 작제물 내에서 암호화된 적합한 웨პ티드 서열의 사용에 의해 신호전달 도메인에 대한 유전자에 연결될 수 있고, 표적화된 세포를 제거할 수 있는 T 세포 내로 도입될 수 있다. 상기 작제물은 키메라 항원 수용체 (CAR)로 명명되었으며, 이는 현재 scTCR을 포함하는 CAR의 사용을 포함한, 관련 기술분야에서 널리 사용되고 있다.
- [0077] 제공된 단쇄 V α V β TCR 단백질에서, 가변 알파 및 가변 베타 쇄는 관련 기술분야에 공지된 것을 포함한, 임의의 적합한 웨პ티드 링커를 사용하여 예컨대, 항체 Fv 연결부로 연결되어 있다 (문헌 [Bird et al. (1988) Science, 242, 423-426]; [Holliger et al. (1993) Proc Natl Acad Sci U S A, 90, 6444-8]; [Hoogenboom (2005) Nat Biotechnol, 23, 1105-16]; [Turner et al. (1997) J Immunol Methods, 205, 43-54]). 일 실시형태에서, 구조: V α -L-V β 또는 V β -L-V α (여기서, L은 V β 를 V α 에 연결하는 링커 웨პ티드이고, V β 는 TCR 가변 β 영역이고, V α 는 TCR 가변 α 영역임)를 가지는 가용성 인간 단쇄 TCR이 제공된다.
- [0078] 일 실시형태에서, V β 가 3군의 TCR 가변 β 영역이고, V α 가 2군의 TCR 가변 α 영역인 V β V α TCR은 WT1 D13.1.1이라고 명명된다 (문헌 [Utz, U., et al., 1996])(문헌 [Aggen, D.A., et al., 2011]).
- [0079] 일 실시형태에서, 링커 웨პ티드는 5개 이상의 리신 잔기를 포함한다. 일 실시형태에서, 링커 웨პ티드는 5 내지 30개의 아미노산을 포함한다. 일 실시형태에서, 링커 웨პ티드는 GSADDAAKKDAAKKDGKS (서열 번호: 8)의 아미노산 서열을 가진다. 일 실시형태에서, 제공된 sc V β V α TCR은 불변 영역을 함유하지 않는다. sc V β V α TCR이라는 용어가 본원에 사용될 때, sc V β V α TCR은 또한 그 용어도 관련 기술분야에서 이해되고 사용되는바, 상기 용어도 포함하는 것으로 이해하여야 한다. 따라서, V β 및 V α 쇄는 링커를 통해 임의의 형태로 서로 연결될 수 있다.
- [0080] 본 개시내용의 한 측면에서, 본 개시내용의 V β V α TCR은 약 10^{-6} M 내지 10^{-12} M 사이의 평형 결합상수 K_D로 리간드에 특이적으로 결합한다. 본 개시내용의 상기 측면의 일 실시형태에서, 리간드는 웨პ티드/MHC 리간드이다. 일 실시형태에서, 본 개시내용의 V β V α TCR은 정상적인 야생형 TCR의 친화도와 비교하여 리간드에 대하여 증진된 친화도를 가진다.
- [0081] 생물학적 활성 기
- [0082] 생물학적 활성 기를 포함하는, 본원에 기술된 V β V α TCR 단백질이 또한 제공된다. 본원에서 사용되는바, "생물학적 활성 기"는 생물계에서 측정가능한 또는 검출가능한 효과를 일으키는 기이다. 일 실시형태에서, 생물학적 활성 기는 항-종양제, 예컨대, 이것으로 제한하는 것은 아니지만, 혈관신생 억제제, 효소 억제제, 미세소관 억제제, DNA 인터컬레이터 또는 가교결합제, DNA 합성 억제제; 시토카인, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, IL-2, IL-15, GM-CSF, IL-12, TNF- α , IFN- γ 또는 LT- α (문헌 [Schrama et al. (2006) Nat Rev Drug Discov, 5, 147-59]; [Wong et al. (2011) Protein Eng Des Sel, 24, 373-83]); 항-염증성 기, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, TGF- β , IL-37, IL-10 (문헌 [Nold et al. (2010) Nat Immunol, 11, 1014-22]; [Stone et al. (2012) Protein Engineering]), 방사성 동위 원소, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, ⁹⁰Y 또는 ¹³¹I (문헌 [Reichert and Valge-Archer (2007) Nat Rev Drug Discov, 6, 349-56]); 독소, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 슈도모나스 외독소 A, 디프테리아 독소, 또는 리신의 A 쇄 (문헌 [Pastan et al. (2006) Nat Rev Cancer, 6, 559-65]; [Schrama et al. (2006) Nat Rev Drug Discov, 5, 147-59]); 약물, 또는 항체, 예컨대, 단쇄 Fv로부터 선택된다.
- [0083] 본 개시내용의 상기 측면의 일 실시형태에서, 생물학적 활성 기는 (예컨대, 용어 "항체 약물 접합체"에서) 대개 약물로 지칭되는 세포독성 분자이다. 본원에서 사용되는바, "세포독성"이란 세포에 독성인 것을 의미한다. 세포

독성 분자의 예로는 독소루비신, 메토트렉세이트, 미토마이신, 5-플루오로우라실, 듀오카르마이신, 아우리스타틴, 메이탄신, 칼리키아미신 및 상기 분자의 유사체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다 (문헌 [Jarvis (2012) Chemical and Engineering News, 90, 12-18]; [Litvak-Greenfeld and Benhar (2012) Adv Drug Deliv Rev]; [Ricart and Tolcher (2007) Nat Clin Pract Oncol, 4, 245-55]). 세포독성 분자가 완전한 세포 사멸을 유발할 필요는 없으며, 오히려, 측정가능하거나 검출가능할 정도로 세포 활성을 감소시키거나, 성장을 억제시켜야 한다.

- [0084] 일 실시형태에서, 본원에 기술된 TCR은 프로드력을 약물로 전환시킬 수 있는 효소에 연결된다. 이는 예를 들어, TCR에 의해 표적화되는 위치 (예컨대, 종양 부위)에서 활성 형태의 약물이 생성되도록 함으로써 유용하다.
- [0085] 일 실시형태에서, 생물학적 활성 기는 링커를 통해 단쇄 TCR에 결합되며, 이는 표준 화학 반응을 통해, 예컨대, TCR의 유리 아민 기, 또는 슬프히드릴 기를 이용하여 달성될 수 있다.
- [0086] 또 다른 실시형태에서, TCR은 단쇄 항체 단편 (scFv)에 부착됨으로써 이중특이성 제제를 생성한다. 종양 항원에 대한 하나의 scFv, 및 T 세포의 CD3 분자에 대한 것을 함유하는 이중특이성 항체는 현재 진료소에서 성공적으로 사용되고 있다 (문헌 [Bargou et al. (2008) Science, 321, 974-7]). 추가로, CD3에 대한 TCR 및 scFv를 포함하는 이중특이성 작용제 또한 보고된 바 있다 (문헌 [Liddy et al. (2012) Nat Med, 18, 980-7]).
- [0087] 검출가능한 기를 포함하는, 본원에 기술된 단쇄 V β V α TCR이 또한 제공된다. 일 실시형태에서, 검출가능한 기는 분광법 또는 효소 기반 방법에 의해 검출될 수 있는 것이다. 일 실시형태에서, 검출가능한 기는 형광성 기, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 플루오레세인, R-피코에리트린 (PE), PE-Cy5, PE-Cy7, 텍사스 레드(Texas red), 또는 알로피코시아닌 (APC); 방사성 표지된 기, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 125I, 32P, 99m Tc; 흡수기, 또는 검출가능한 생성물을 생성하는 특성을 가지는 효소, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 또는 알칼리성 포스파타제이다.
- [0088] 관련 기술분야에 공지되어 있는 바와 같이, 생물학적 활성 기, 검출가능한 기 또는 TCR에 부착되는 다른 기는 가용성 웹티드 링커를 사용하여, 또는 화학적 접합에 의해 부착될 수 있고, TCR에 공유적으로, 또는 비공유적으로 부착될 수 있다. 치료학적 유효 분자에 연결된 변형된 TCR 유효량을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 암의 치료 또는 예방법에 사용하기 위한 인간 TCR이 또한 본원에 제공된다. 특별한 실시형태에서, 포유동물은 인간이다. 다른 실시형태에서, 포유동물은 반려 동물 (예컨대, 개, 고양이, 토끼, 설치류, 말), 또는 가축 (예컨대, 소, 말, 돼지)이다.
- [0089] 본원에 기술된 단쇄 TCR (scTCR), 및 E. coli에서 단쇄 TCR을 제조하는 방법이 또한 제공된다. 본원에 기술된 scTCR 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 또한 제공된다.
- [0090] T 세포의 표면 상의 활성 TCR을 생성하는 신호전달 도메인에 연결된 본원에 기술된 sc V α V β TCR 또한 제공한다. 일 실시형태에서, 상기 scTCR은 TCR을 벡터로 클로닝하는 단계, 벡터를 환자의 T 세포 내로 도입하는 단계, 및 T 세포를 다시 환자 내로 입양 전달하는 단계를 포함하는 포유동물에서 질환 상태를 치료하는 방법에서 사용될 수 있다.
- [0091] 변형된 TCR 폴리웹티드 및 폴리뉴클레오티드
- [0092] 본 개시내용은 단쇄 T 세포 수용체 (scTCR)를 암호화하는 적어도 1개의 DNA 세그먼트를 포함하는 DNA 벡터를 고려한다.
- [0093] 관련 분야의 기술자는 본원에 기술된 검정법과 함께 표준 돌연변이유발 기술을 통해 변형된 TCR 서열을 수득할 수 있고, 그들을 특정 결합 친화도 및/또는 특이성에 대해 시험할 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 유용한 돌연변이유발 기술로는 제한 없이, 신규한 유전자 합성법, 올리고뉴클레오티드 지정 돌연변이유발법, 영역-특이 돌연변이유발법, 링커-스캐닝 돌연변이유발법, 및 PCR에 의한 부위 지정 돌연변이유발법을 포함한다 (예컨대, 문헌 [Sambrook et al. (1989) and Ausubel et al. (1999)] 참조).
- [0094] 변형된 TCR 암호화 서열을 수득할 때, 생물학적 활성의 순서 또는 감소 없이, 특정의 아미노산 치환, 부가, 결실, 및 번역 후 변형에 의해 TCR 유래 단백질을 변형시킬 수 있다는 것을 통상의 기술자는 이해할 것이다. 특히, 보존적 아미노산 치환, 즉, 유사한 크기, 전하, 극성 및 입체형태의 또 다른 아미노산을 한 아미노산으로 치환하여도, 단백질 기능이 유의적으로 변경될 가능성은 없다는 것이 잘 알려져 있다. 단백질의 구성 요소인 20 종의 표준 아미노산은 광범위하게 하기와 같이 4개의 보존적 아미노산 군으로 분류될 수 있다: 비극성 (소수성)

군은 알라닌, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판 및 발린을 포함하고; 극성 (비하전된, 중성) 군은 아스파라긴, 시스테인, 글루타민, 글리신, 세린, 트레오닌 및 티로신을 포함하고; 양으로 하전된 (염기성) 군은 아르기닌, 히스티딘 및 리신을 포함하고; 음으로 하전된 (산성) 군은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 단백질 중의 한 아미노산으로 같은 군 내의 또 다른 아미노산을 치환하여도, 단백질 생물학적 활성에 역효과를 미칠 가능성은 없다.

[0095] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 scTCR은 가변 도메인의 임의 영역 또는 영역들에 추가의 돌연변이를 포함할 수 있으며, 이를 통해 단백질은 안정화될 수 있다. 일 실시형태에서, 하나 이상의 추가의 돌연변이는 CDR1, CDR2, HV4, CDR3, FR2, 및 FR3 중 하나 이상에 존재한다. 돌연변이유발에 사용되는 영역은 유도 진화에 의해 결정될 수 있으며, 여기서 결정 구조 또는 문자 모델은 관심의 대상이 되는 리간드 (예를 들어, 항원)와 상호작용하는 TCR의 영역을 생성하는 데 사용된다. 다른 예에서, 가변 영역은 scTCR과 리간드 사이에 원하는 상호작용이 이루어지도록 조작하기 위해 아미노산을 부가하거나, 결실시킴으로써 재성형화될 수 있다.

[0096] 본 발명의 폴리펩티드는 변형된 TCR, 및 이의 항원-결합 단편 (예컨대, scTCR), 및 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함한다. "폴리펩티드," "단백질" 및 "펩티드" 및 "당단백질"이라는 용어는 상호교환적으로 사용되며, 임의의 특정 길이로 제한되지 않는 아미노산의 중합체를 의미한다. 상기 용어는 변형, 예컨대, 미리스틸화, 황산화, 당화, 인산화, 및 신호 서열의 부가 또는 결실을 배제시키지 않는다. "폴리펩티드" 또는 "단백질"이라는 용어는 각 쇄가 펩티드 결합에 의해 공유적으로 연결되어 있는 아미노산을 포함하는 것인, 하나 이상의 아미노산 쇄를 의미하며, 여기서 상기 폴리펩티드 또는 단백질은 천연 단백질, 즉, 자연적으로 발생된 및 구체적으로 비-재조합 세포에 의해, 또는 유전적으로 조작된, 또는 재조합 세포에 의해 제조된 단백질의 서열을 가지는, 펩티드 결합에 의해 비-공유적으로 및/또는 공유적으로 함께 연결된 복수 개의 쇄를 포함할 수 있고, 천연 단백질의 아미노산 서열을 가지는 문자, 천연 서열의 하나 이상의 아미노산으로부터의 결실, 그에의 부가, 및/또는 이의 치환을 가지는 문자를 포함할 수 있다. "폴리펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 구체적으로 본 개시내용의 변형된 TCR, 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 변형된 TCR, 또는 이의 항원 결합 단편의 하나 이상의 아미노산으로부터의 결실, 그에의 부가, 및/또는 이의 치환을 가지는 서열을 포함한다. 따라서, "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 ("단량체"로 불리는) 하나의 아미노산 쇄, 또는 ("다량체"로 불리는) 복수 개의 아미노산 쇄를 포함할 수 있다.

[0097] 본원에서 지칭되는 "단리된 단백질"이라는 용어는 대상체 단백질이 (1) 전형적으로는 자연상에서 그와 함께 발견되는 다른 단백질 중 적어도 일부를 함유하지 않거나, (2) 같은 공급원으로부터의, 예컨대, 같은 종으로부터의 다른 단백질을 본질적으로 함유하지 않거나, (3) 다른 종으로부터의 세포에 의해 발현되거나, (4) 자연상에서 그와 함께 회합되어 있는 폴리뉴클레오티드, 지질, 탄수화물, 또는 다른 물질 중 적어도 약 50%로부터 분리되어 있거나, (5) 자연상에서 "단리된 단백질"이 회합되어 있던 단백질 중 일부와 (공유 또는 비공유 상호작용에 의해) 회합되어 있지 않거나, (6) 자연상에서 그와 회합되어 있지 않은 폴리펩티드와 (공유 또는 비공유 상호작용에 의해) 작동가능하게 회합되어 있거나, 또는 (7) 자연상에는 존재하지 않는다는 것을 의미한다. 상기 단리된 단백질은 게놈 DNA, cDNA, mRNA 또는 다른 RNA에 의해 암호화될 수 있거나, 합성 기원의 것일 수 있거나, 또는 이의 임의 조합의 것일 수 있다. 특정 실시형태에서, 단리된 단백질은 이의 용도 (치료학적, 진단학적, 예방학적 연구 등)를 방해하는 이의 천연 환경에서 발견되는 단백질, 또는 폴리펩티드, 또는 다른 오염 물질을 실질적으로 함유하지 않는다.

[0098] 특별한 실시형태에서, 대상체 변형된(subject modified) TCR은 a) 본원에 기술된 변형된 TCR의 알파 쇄 가변 영역과 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한 또는 적어도 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 가지는 TCR 알파 쇄 가변 영역; 및 b) 본원에 기술된 변형된 TCR의 베타 쇄 가변 영역과 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한 또는 적어도 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 가지는 TCR 베타 쇄 가변 영역을 가질 수 있다.

[0099] 특별한 실시형태에서, 변형된 TCR은 a) i. 본원에 기술된 선택된 TCR의 알파 쇄 CDR1 영역의 아미노산 서열과 동일한 CDR1 영역; ii. 선택된 TCR의 알파 쇄 CDR2 영역의 아미노산 서열과 동일한 CDR2 영역; 및 iii. 선택된 TCR의 알파 쇄 CDR3 영역의 아미노산 서열과 동일한 CDR3 영역을 포함하는 TCR 알파 쇄 가변 영역; 및 b) i. 선택된 TCR의 베타 쇄 CDR1 영역의 아미노산 서열과 동일한 CDR1 영역; ii. 선택된 TCR의 베타 쇄 CDR2 영역의 아미노산 서열과 동일한 CDR2 영역; 및 iii. 선택된 TCR의 베타 쇄 CDR3 영역의 아미노산 서열과 동일한 CDR3 영역을 포함하는 베타 쇄 가변 영역을 포함할 수 있고, 여기서 TCR은 WT1 항원에 특이적으로 결합한다. 추가의 실시형태에서, 변형된 TCR, 또는 이의 항원 결합 단편은 V 알파 및 V 베타 영역의 CDR 영역 중에 최대 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 제외하면, 선택된 변형된 TCR과 동일한 알파 쇄 및 베타 쇄를 포함하는 것인 변이체 변형된 TCR이다. 이와 관련하여, 선택된 변이체 변형된 TCR의 CDR 영역 중에 1, 2,

3, 4, 5, 6, 7, 8개, 또는 특정 실시형태에서, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 이상의 아미노산 치환이 존재할 수 있다. 치환은 V 알파 및/또는 V 베타 영역 중 CDR 중에 존재할 수 있다 (예컨대, 문헌 [Muller, 1998, Structure 6:1153-1167] 참조).

[0100] 일 실시형태에서, 변형된 TCR, 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 다른 관련된 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 변형된 TCR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 변이체일 수 있다. 폴리뉴클레오티드 변이체는 본원에 기술된 변형된 TCR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열과 실질적으로 동일할 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 본원에 기술된 방법 (예컨대, 하기 기술되는 바와 같이, 표준 파라미터를 사용하는 BLAST 분석법)을 사용하여 참조 폴리뉴클레오티드 서열, 예컨대, 본원에 기술된 TCR을 암호화하는 서열과 비교하여 적어도 70%의 서열 동일성, 바람직하게, 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 관련 기술분야의 기술자는 코돈 축퇴성, 아미노산 유사성, 리딩 프레임 위치 결정 등을 고려함으로써 두 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 단백질의 상응하는 동일성을 측정하기 위해 상기 값은 적절히 조절될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0101] 전형적으로, 폴리뉴클레오티드 변이체는, 바람직하게는 변이체 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 TCR의 결합 친화도가 본원에 구체적으로 기술된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 TCR와 비교하여 실질적으로 감소되지 않도록 하나 이상의 치환, 부가, 결실 및/또는 삽입을 함유할 것이다.

[0102] 폴리뉴클레오티드 서열을 비교하여, 하기 기술되는 바와 같이, 최대로 일치하도록 정렬되었을 때, 두 서열 중의 뉴클레오티드 서열이 동일하다면, 두 서열은 "동일하다"라고 말할 수 있다. 두 서열 사이의 비교는 전형적으로 비교창(comparison window)에 걸쳐 서열을 비교하여 서열 유사성의 국부 영역을 확인하고 비교함으로써 수행된다. 본원에서 사용되는바, "비교창"이란, 두 서열이 최적으로 정렬된 후, 서열이 동일한 개수의 연속하는 위치의 참조 서열과 비교될 수 있는 것인, 적어도 약 20개의 연속하는 위치, 보통 30 내지 약 75개, 40 내지 약 50 개의 세그먼트를 의미한다.

[0103] 생물정보학 소프트웨어의 레이저진(Lasergene) 슈트 (DNASTAR, 인코퍼레이티드(DNASTAR, Inc.: 미국 위스콘신주 매디슨)) 중 맥얼라인(Megalign) 프로그램을 이용함으로써 디플트 파라미터를 사용하여 비교를 위해 최적의 서열 정렬을 수행할 수 있다. 상기 프로그램은 하기 참고 문헌에 기술되어 있는 수개의 정렬 계획을 구현한다: 문헌 [Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358]; [Hein J., Unified Approach to Alignment and Phylogenies, pp. 626-645 (1990)]; [Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., CABIOS 5:151-153 (1989)]; [Myers, E.W. and Muller W., CABIOS 4:11 -17 (1988); Robinson, E.D., Comb. Theor 11:105 (1971)]; [Santou, N. Nes, M., Mol. Biol. Evol. 4:406-425 (1987)]; [Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA (1973)]; [Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730 (1983)].

[0104] 대안적으로, 비교를 위한 최적의 서열 정렬은 문헌 [Smith and Waterman, Add. APL. Math 2:482 (1981)]의 국부 동일성 알고리즘에 의해, 문헌 [Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]의 동일성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌 [Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)]의 유사성 검색 방법에 의해, 상기 알고리즘(제네티克斯 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group: GCG: 미국 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575)의 위스콘신 제네티克斯 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package)의 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, 및 TFASTA)의 전산화 실행에 의해, 또는 검사에 의해 수행될 수 있다.

[0105] 서열 동일성(%) 및 서열 유사성을 측정하는 데 적합한 알고리즘의 한 바람직한 예는 각각 문헌 [Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 (1977)] 및 [Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]에 기술되어 있는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이다. 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 사이의 서열 동일성(%)을 측정하는데, 예를 들어, 본원에 기술된 파라미터를 사용하여 BLAST 및 BLAST 2.0이 사용될 수 있다. BLAST 분석 수행용 소프트웨어는 국립 생명공학 정보 센터 (National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 입수 가능하다. 예시적인 일례에서, 뉴클레오티드 서열의 경우, 파라미터 M (한 쌍의 매칭 잔기에 대한 보상 점수; 항상 >0) 및 N (미스매칭 잔기에 대한 패널티 점수; 항상 <0)을 사용하여 누적 점수를 계산할 수 있다. 누적 정렬 점수가 이의 최대 달성을 넘으로부터 X 양만큼 하락하였을 때; 1회 이상의 음의 점수화 잔기 정렬 누적에 기인하여 누적 점수가 0 이하가 되었을 때; 또는 양 서열의 단부에 도달되었을 때, 각 방향에서 워드 히트

확장은 중단된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T 및 X가 정렬의 감도 및 속도를 결정한다. (뉴클레오티드 서열의 경우) BLASTN 프로그램은 디폴트로서 워드 길이 (W) = 11, 기대치 (E) = 10, 및 BLOSUM62 점수화 매트릭스 (문헌 [Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)] 참조) 정렬, (B) = 50, 기대치 (E) = 10, M = 5, N = -4 및 양 가닥 모두 비교를 사용한다.

[0106] 특정 실시형태에서, "서열 동일성(%)"은 적어도 20개 위치의 비교창에 걸쳐 최적으로 정렬된 두 서열을 비교함으로써 측정되며, 여기서 비교창 중의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적의 정렬을 위해 (부가 또는 결실을 포함하지 않는) 참조 서열과 비교하여 20% 이하, 보통 5 내지 15%, 또는 10 내지 12%의 부가 또는 결실 (즉, 캡)을 포함할 수 있다. 상기 백분율(%)은 동일한 핵산 염기가 두 서열 모두에 존재하는 위치의 개수를 측정하여 매칭되는 위치의 개수를 수득하고, 매칭되는 위치의 개수를 참조 서열 중 위치의 총 개수 (즉, 창 크기)로 나누고, 그 값에 100을 곱하여 서열 동일성(%)을 수득함으로써 계산된다.

[0107] 유전자 코드의 축퇴성의 결과로서 본원에 기술된 바와 같은 TCR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 다수 존재한다는 것을 관련 분야의 통상의 기술자는 이해할 것이다. 이를 폴리뉴클레오티드 중 일부는 예컨대, 동일한 항원에 결합하는 변형된 TCR을 암호화하는 천연 또는 원래의 폴리뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 서열과 최소의 서열 동일성을 보유한다. 그럼에도 불구하고, 코돈 사용의 차이에 기인하여 다른 폴리뉴클레오티드도 본 개시내용에 의해 명확하게 고려된다. 특정 실시형태에서, 포유동물 발현을 위해 코돈 최적화된 서열이 구체적으로 고려된다.

[0108] 클로닝, DNA 단리, 증폭 및 정제를 위한 표준 기술, DNA 리가제, DNA 폴리머라제, 제한 엔도뉴클레아제 등을 포함하는 효소 반응을 위한 표준 기술, 및 각종 분리 기술은 관련 분야의 기술자에 의해 공지되고, 통상 사용되는 것이다. 다수의 표준 기술이 문헌 [Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York]; [Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York]; [Wu (ed.) (1993) Meth. Enzymol. 218, Part I]; [Wu (ed.) (1979) Meth Enzymol. 68; Wu et al. (eds.) (1983) Meth. Enzymol. 100 and 101]; [Grossman and Moldave (eds.) Meth. Enzymol. 65]; [Miller (ed.) (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York]; [Old and Primrose (1981) Principles of Gene Manipulation, University of California Press, Berkeley]; [Schleif and Wensink (1982) Practical Methods in Molecular Biology]; [Glover (ed.) (1985) DNA Cloning Vol. I and II, IRL Press, Oxford, UK]; [Hames and Higgins (eds.) (1985) Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, UK]; 및 [Setlow and Hollaender (1979) Genetic Engineering: Principles and Methods, Vols. 1-4, Plenum Press, New York]에 기술되어 있다. 사용된 약어 및 명칭은 관련 기술 분야에서 표준인 것으로 간주되며, 본원에서 인용된 것과 같은 전문 저널에서 보편적으로 사용된다.

[0109] 뉴클레오티드 서열 사이의 상동성은 DNA 하이브리드화 분석에 의해 측정될 수 있으며, 여기서 이중 가닥 DNA 하이브리드의 안정성은 염기쌍 형성 발생 정도에 따라 달라진다. 고온 및/또는 낮은 염 함량 조건이 하이브리드의 안정성을 감소시키며, 이는 선택된 상동성 정도보다 더 낮은 것을 가지는 서열의 어닐링을 막기 위해 달라질 수 있다. 예를 들어, G-C 함량이 약 55%인 서열의 경우, 40-50°C, 6 X SSC (염화나트륨/나트륨 시트레이트 완충제) 및 0.1% SDS (나트륨 도데실 술페이트)인 하이브리드화 및 세척 조건은 약 60-70%의 상동성을 나타내고, 50-65°C, 1 X SSC 및 0.1% SDS인 하이브리드화 및 세척 조건은 약 82-97%의 상동성을 나타내며, 52°C, 0.1 X SSC 및 0.1% SDS인 하이브리드화 및 세척 조건은 약 99-100%의 상동성을 나타낸다. 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 비교하기 위한 (및 상동성 정도를 측정하기 위한) 광범위한 컴퓨터 프로그램 또한 이용가능하며, 상업적으로 이용가능한 소프트웨어 및 무료 소프트웨어 모두의 공급처를 제공하는 목록은 문헌 [Ausubel et al. (1999)]에서 살펴볼 수 있다. 쉽게 이용할 수 있는 서열 비교 및 다중 서열 정렬 알고리즘은 각각 베이직 로컬 얼라인먼트 서치 툴(Basic Local Alignment Search Tool: BLAST) (문헌 [Altschul et al., 1997]) 및 ClustalW 프로그램이다. BLAST는 인터넷 상의 ncbi.nlm.nih.gov에서 이용가능하고, ClustalW 버전은 www2.ebi.ac.uk에서 이용 가능하다.

[0110] 산업상 미생물 균주 (예컨대, 아스페질러스 니거, 아스페질러스 피쿠움, 아스페질러스 아와모리, 아스페질러스 오리재, 트리코데마 리제이, 뮤코르 미에헤이, 클루이베로마이세스 랙티스, 피치아 파스토리스, 사카로마이세스 세레비지아에, 에스케리키아 콜라이, 바실러스 서브틸리스 또는 바실러스 리케니포르미스), 곤충 (드로소필라), 포유동물 (예컨대, 차이니즈 햄스터 난소 세포주, CHO), 또는 식물 종 (예컨대, 카놀라, 대두, 옥수수, 감자, 보리, 호밀, 밀)이 TCR 단백질의 재조합적 제조를 위한 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 고친화도 TCR 단백질 또는 가용성 단백질의 이종성 발현에서 제1 단계는, TCR 또는 가용성 TCR 암호화 서열 및 제

어 서열, 예컨대, 프로모터, 인핸서, 및 종결 인자를 포함하도록 발현 작제물을 조립하는 것이다. 다른 서열, 예컨대, 신호 서열 및 선별가능한 마커 또한 포함시킬 수 있다. TCR의 세포외 발현을 달성하기 위해, 발현 작제물은 분비 신호 서열을 포함할 수 있다. 실시형태에서, 세포질 발현을 원하는 경우, 발현 작제물 상에서 신호 서열은 포함되지 않는다. 실시형태에서, 프로모터 및 신호 서열은 숙주 세포에서 작용성이며, TCR 또는 가용성 TCR 단백질의 발현 및 분비를 위해 제공된다. 전사 종결 인자는 효율적인 전사를 보장하기 위해 포함될 수 있다. 발현 또는 단백질 정제를 증진시키는 보조 서열 또한 발현 작제물에 포함될 수 있다.

[0111] 본 개시내용에 따라 각종 프로모터 (전사 개시 조절 영역)가 사용될 수 있다. 적절한 프로모터의 선택은 제안된 발현 숙주에 따라 달라질 수 있다. 선택된 숙주에서 작용을 하는 한, 이종성 공급원으로부터의 프로모터도 사용될 수 있다.

[0112] 프로모터 선택은 또한 펩티드 또는 단백질 제조의 원하는 효율 및 수준에 따라 달라진다. 유도성 프로모터, 예컨대, tac는 종종 이. 콜라이에서 단백질 발현 수준을 극적으로 증가시키기 위해 사용된다. 단백질의 과다발현은 숙주 세포에 유해할 수 있다. 그 결과, 숙주 세포 성장은 제한될 수 있다. 유도성 프로모터 시스템을 사용함으로써 유전자 발현 유도 이전에 숙주 세포를 허용되는 밀도도 배양할 수 있으며, 이로써 더 쉽게 보다 높은 생산 수율을 얻을 수 있다.

[0113] 본 개시내용에 따라 각종 신호 서열이 사용될 수 있다. TCR 암호화 서열과 상동성이 신호 서열이 사용될 수 있다. 대안적으로, 발현 숙주에서의 효율적인 분비 및 프로세싱을 위해 선택되거나 디자인된 신호 서열 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 적합한 신호 서열/숙주 세포 쌍으로는 B. 서브틸리스(*B. subtilis*)에서의 분비를 위해 B. 서브틸리스 *sacB* 신호 서열, 및 사카로마이세스 세레비지아에 α -메이팅 인자 또는 피. 파스토리스(*P. pastoris*) 분비를 위해 피. 파스토리스 산 포스파타제 *phoI* 신호 서열을 포함한다. 신호 서열은 신호 펩티다제 절단 부위를 암호화하는 서열을 통해, 또는 하류 TCR 서열의 정확한 리딩 프레임을 보장하는 브릿지인, 보통 10개 미만의 코돈으로 이루어진 짧은 뉴클레오티드 브릿지를 통해 단백질 암호화 서열에 직접 연결될 수 있다.

[0114] 진핵성 단백질 발현 시스템의 경우, 전사 및 번역을 증진시키는 요소가 확인되었다. 예를 들어, 이종성 프로모터의 양측 상에 콜리플라워 모자이크 바이러스 (CaMV) 프로모터 1,000 bp를 배치함으로써 식물 세포에서 전사 수준은 10 내지 400배만큼 상승시킬 수 있다. 발현 작제물은 또한 적절한 번역 개시 서열을 포함하여야 한다. 적절한 번역 개시를 위해 코작(Kozak) 컨센서스 서열을 포함하도록 발현 작제물을 변형시키면, 번역 수준은 10배만큼 증가될 수 있다.

[0115] 선택성 마커가 흔히 사용되는데, 이는 발현 작제물의 일부이거나, 또는 그로부터 분리된 것일 수 있으며 (예컨대, 발현 벡터가 보유하는 것일 수 있으며), 이로써, 마커는 관심의 대상이 되는 유전자와 상이한 부위에 통합될 수 있다. 그 예로 항생제에 대한 저항성을 부여하는 마커 (예컨대, E. 콜라이 숙주 세포의 경우, bla가 암피실린에 대한 저항성을 부여하고, *nptII*가 매우 다양한 원핵 및 진핵 세포에 카나마이신 저항성을 부여함), 또는 숙주가 최소 배지 상에서 성장할 수 있도록 허용하는 마커 (예컨대, HIS4는 *P. 파스토리스* 또는 His-S. 사카로마이세스 세레비지아에(*S. cerevisiae*)가 히스트딘의 부재하에서 성장할 수 있게 함)를 포함한다. 선별가능한 마커는 마커의 독립된 발현을 허용하는 그 자신의 전사 및 번역 개시 및 종결 조절 영역을 가진다. 마커로서 항생제 저항성이 사용되는 경우, 선별을 위한 항생제의 농도는 항생제에 따라 달라질 것이며, 이는 일반적으로 배지 1 mL당 항생제 10 내지 600 μ g 범위이다.

[0116] 공지된 재조합 DNA 기술을 사용하여 발현 작제물을 조립한다 (문헌 [Sambrook et al. 1989]; [Ausubel et al., 1999]). 제한 효소 분해 및 결찰은 DNA의 두 단편을 연결시키는데 사용되는 기초 단계이다. DNA 단편의 단부는 결찰 이전에 변형이 필요할 수 있으며, 이는 오버행을 충전시키거나, 뉴클레아제 (예컨대, ExoIII)를 이용하여 단편(들)의 말단부를 결실시키거나, 부위 지정 돌연변이 유발법에 의해서, 또는 PCR에 의해 새 염기 쌍을 부가함으로써 달성될 수 있다. 선택된 단편의 연결을 용이하게하기 위하여 폴리링커 및 어댑터가 사용될 수 있다. 발현 작제물은 전형적으로 제한, 결찰, 및 이. 콜라이의 형질전환으로 이루어진 라운드를 사용하는 단계로 조립된다. 발현 작제물을 작제하는데 적합한 다수의 클로닝 벡터가 관련 기술분야에 공지되어 있고 (λ ZAP 및 pBLUESCRIPT SK-1, 스트라타진(Stratagene: 미국 캘리포니아주 라호야); pET, 노바젠 인코포레이티드(Novagen Inc.: 미국 위스콘신주 매디슨)-문헌 [Ausubel et al., 1999]에서 인용), 특별한 선택은 본 개시내용에는 중요하지 않다. 클로닝 벡터 선택은 발현 작제물을 숙주 세포 내로 도입하기 위해 선택되는 유전자 전달 시스템에 의해 영향을 받게 될 것이다. 각 단계 종료시, 생성된 작제물을 제한, DNA 서열, 하이브리드화 및 PCR 분석에 의해 분석할 수 있다.

- [0118] 발현 작제물을 선형 또는 환형의 클로닝 벡터 작제물로서 숙주 내로 형질전환시킬 수 있거나, 클로닝 벡터로부터 제거하여 그대로, 또는 전달 벡터 상에 도입하여 사용할 수 있다. 전달 벡터는 선택된 숙주 세포 유형에서 발현 작제물의 도입 및 유지를 용이하게한다. 발현 작제물은 다수의 공지된 유전자 전달 시스템들 중 임의의 것 (예컨대, 자연적 능력, 화학적으로 매개되는 형질전환, 프로토플라스트 형질전환, 전기천공, 바이오리스틱 형질 전환, 형질감염, 또는 접합)에 의해 숙주 세포 내로 도입된다 (문헌 [Ausubel et al., 1999]; [Sambrook et al., 1989]). 선택된 유전자 전달 시스템은 사용되는 숙주 세포 및 벡터 시스템에 따라 달라진다.
- [0119] 예를 들어, 프로�토플라스트 형질전환 또는 전기천공에 의해 발현 작제물을 에스. 세레비지아에 세포 내로 도입 할 수 있다. 에스. 세레비지아에의 전기천공을 쉽게 달성할 수 있으며, 이를 통해 스페로플라스트 형질전환과 견줄만한 형질전환 효율을 얻을 수 있다.
- [0120] 리간드 결합 부위 이외의 부위에서 TCR 단백질과 특이적으로 반응하는 단일클론 또는 다중 클론 항체, 바람직하게는 단일클론 항체는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있고, 다수는 상업적으로 이용가능하다. 예컨대, 문헌 [Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories]; [Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., Academic Press, New York]; 및 [Ausubel et al. (1999) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York.]을 참조할 수 있다.
- [0121] 특별한 표적 리간드에 특이적인 세포 결합 형태 또는 가용성 형태의 TCR이 예를 들어, 생물학적 샘플 (예컨대, 세포, 조직 샘플, 생검 물질, 체액 등)을 스크리닝하거나, 또는 시험 샘플 중 표적 리간드의 존재를 검출하기 위한 진단학적 프로브로서 유용하다. 빈번하게, 검출가능한 신호를 제공하는 물질을 공유적으로 또는 비공유적으로 연결함으로써 TCR을 표지화한다. 적합한 표지로는 방사성 핵종, 효소, 기질, 보조 인자, 억제제, 형광성 작용제, 화학발광성 작용제, 자기 입자 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 추가로, TCR을 제2 결합 분자에 대한 리간드에 커플링시킬 수 있으며: 예를 들어, TCR은 비오티닐화시킬 수 있다. 이어서, 표적 세포 또는 분자에 결합된 TCR의 검출은 검출가능한 스트렙트아비딘 (형광성, 방사성, 화학발광성, 또는 다른 검출가능한 분자가 부착되어 있거나, 또는 이용가능한 발색 기질이 존재하는 효소에 부착되어 있는 스트렙트아비딘)의 결합에 의해 수행할 수 있다. scTCR에 공유적으로 결합시키고자 하는 상기 표지 및/또는 독성 화합물의 용도를 기술하는 미국 특허로는 제3,817,837호; 제3,850,752호; 제3,927,193호; 제3,939,350호; 제3,996,345호; 제4,277,437호; 제4,275,149호; 제4,331,647호; 제4,348,376호; 제4,361,544호; 제4,468,457호; 제4,444,744호; 제4,640,561호; 제4,366,241호; RE 35,500; 제5,299,253호; 제5,101,827호; 제5,059,413호를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0122] 표지화된 TCR은 모니터링 장치 또는 사용된 표지에 적절한 방법을 사용하여 검출할 수 있다. 표지가 형광성 모이어티일 경우, 형광 현미경 또는 형광 활성화 세포 분류가 사용될 수 있고, 표지가 방사성 핵종일 경우, 예를 들어, 감마 계수, 자가방사선술 또는 액체 섬광 계수가 사용될 수 되, 단, 방법은 분석되는 샘플 및 사용되는 방사성 핵종에 적절하여야 한다. 추가로, 본원에서 언급된 바와 같이, MHC 성분의 부재하에서 표적 리간드에 대한 결합 부위의 일부가 아닌 TCR의 일부를 인식하는 검출가능한 문자 또는 입자가 존재할 경우, 사용되는 2차 검출 문자 또는 입자가 존재할 수 있다. 관련 기술분야에는 동일 반응계내 진단학적 영상화를 위해 유용한 화합물이 공지되어 있다; 예컨대, 미국 특허 제5,101,827호; 제5,059,413호 참조. 생체내 요법 및/또는 영상화에 유용한 방사성 핵종으로는 ¹¹¹인듐, ⁹⁷루비듐, ¹²⁵요오드, ¹³¹요오드, ¹²³요오드, ⁶⁷갈륨, ⁹⁹테크네튬을 포함한다. 독소는 그중에서도 디프테리아 독소, 리신 및 아주까리 독소를 포함하되, 단, 일단 TCR-독소 복합체가 세포에 결합하고 나면, 독성 모이어티는 내재화됨으로써 이의 세포독성 효과를 발휘할 수 있다. 면역독소 기술은 관련 기술 분야에 잘 알려져 있고, 적합한 독성 문자로는 제한 없이, 화학치료 약물, 예컨대, 빈데신, 항엽산제, 예컨대, 메토트렉세이트, 시스플라틴, 미토마이신, 안트라사이클린, 예컨대, 다우노마이신, 다우노루비신 또는 아드리아마이신, 및 세포독성 단백질, 예컨대, 리보솜 불활성화 단백질 (예컨대, 디프테리아 독소, 포크위드 항바이러스 단백질, 아브린, 리신, 슈도모나스 외독소 A 또는 이의 재조합 유도체를 포함한다. 일반적으로, 예컨대, 문헌 [Olsnes and Pihl (1982) Pharmac. Ther. 25:355-381] 및 [Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Eds. Baldwin and Byers, pp. 159-179, Academic Press, 1985]을 참조하라.
- [0123] TCR 문자의 일반 구조, 및 웨პ티드:주조직적합 복합체에의 결합을 포함한, 그를 제조하고 사용하는 방법이 개시되어 있다. 예를 들어 PCT/US98/04274; PCT/US98/20263; WO99/60120을 참조하라.
- [0124] 약제학적 조성물 및 치료제

[0125]

특별한 표적 리간드에 특이적인 TCR은 특별한 항원과 관련된 질환, 예를 들어, 신생물 질환 또는 장애, 예컨대 암을 앓는 것으로 여겨지는, 인간을 포함한, 동물 및 포유동물을 치료하는 데 유용하다. 본원에 기술된 방법에 따라 치료될 수 있는 암 유형의 예는 윌름즈 종양(Wilm's tumor), 방광암, 유방암, 대장암, 직장암, 식도암, 위암, 간세포 암종, 신장암, 백혈병, 간암, 폐암, 럼프종, 흑색종, 신경아세포종, 비-소세포 폐 암종, 구강암, 골육종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신장암(renal cancer), 피부암, 소세포 폐암종, 및 고환암을 포함하지만, 이것으로 제한되지 않는다.

[0126]

본원에 제시된 물질을 사용하여 치료학적 생성물을 제조할 수 있다. 유효량의 치료학적 생성물은 대상체에서 측정가능한 효과를 발휘하는 최소 용량이다. 치료학적 생성물은 관련 분야의 통상의 기술자에 의해 쉽게 제조된다. 일 실시형태에서, 본 개시내용의 scTCR은 환자에게 직접 투여된다. 일 실시형태에서, 본 개시내용의 scTCR은 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, PEG에 또는 면역글로불린 불변 영역에 연결된다. 본 실시형태는 혈청 제거를 연장시킨다. 일 실시형태에서, scTCR은 약물을 표적 세포, 예컨대, 암 세포로 전달하기 위해 화학치료제 또는 약물에 연결된다. 일 실시형태에서, scTCR은 생물학적 효과기 분자, 예컨대, 시토카인에 연결된다 (문헌 [Tayal and Kalra (2008) Eur J Pharmacol, 579, 1-12]). 일 실시형태에서, scTCR은 항-종양 활성을 가지는 시토카인, 예컨대, IL-2, IL-12, 또는 TNF α 에 연결된다 (문헌 [Wong et al. (2011) Protein Eng Des Sel, 24, 373-83]). 일 실시형태에서, scTCR은 면역억제성 시토카인, 예컨대, IL-10 또는 IL-13에 연결된다 (문헌 [Stone et al. (2012) Protein Engineering]). 일 실시형태에서, scTCR은 이중특이성 작용제 형태를 위해 또 다른 항원 결합 분자에 연결된다 (문헌 [Miller et al. (2010) Protein Eng Des Sel, 23, 549-57]; [Thakur and Lum (2010) Curr Opin Mol Ther, 12, 340-9]). 일 실시형태에서, 이중특이성 분자는 T 세포 및 이 환된 세포에 가교결합하는, 항-CD3과 같이 단쇄 Fv에 연결된 scTCR로 구성된다 (문헌 [Bargou et al. (2008) Science, 321, 974-7]; [Liddy et al. (2012) Nat Med, 18, 980-7]). 일 실시형태에서, scTCR은 키메라 항원 수용체를 형성하기 위해 CD3과 같은 TCR 신호전달 도메인에 연결된다 (문헌 [Porter et al. (2011) N Engl J Med, 365, 725-33]; [Sadelain et al. (2009) Curr Opin Immunol, 21, 215-23]; [Stroncek et al. (2012) J Transl Med, 10, 48]). 상기 투여 방법 및 예컨대, 정맥내로 투여하는 것과 같은 다른 투여 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 유용한 투여량은 관련 분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다.

[0127]

scTCR 조성물은 관련 기술분야에 공지된 수단 중 임의의 것에 의해 제형화될 수 있다. 그들은 전형적으로 액체 용액 또는 혼탁제로서 특히 정맥내, 복강내, 또는 활막 투여 (경로는 특별한 질환에 의해 결정됨)용 주사제로서, 또는 비내 또는 경구용 투여를 위한 제형으로서 제조될 수 있다. 주사 또는 기타 투여 전에 액체 형태의 용액 또는 혼탁제로 적합한 고체 형태 또한 제조될 수 있다. 제제는 또한 예를 들어, 유화될 수 있거나, 단백질(들)/펩티드(들)이 리포솜 내로 캡슐화될 수 있다.

[0128]

활성 성분은 종종 임의적인 약제학적 첨가제, 예컨대, 약제학적으로 허용되고, 활성 성분과 혼화성인 부형제 또는 담체와 혼합된다. 적합한 부형제로는 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등, 및 이의 조합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 주사제, 에어로졸 또는 비강용 제형 중 scTCR의 농도는 보통 0.05 내지 5 mg/ml 범위이다. 특별한 유효 투여량을 선택하는 것은 공지되어 있고, 관련 분야의 통상의 기술자에 의해 과도한 실험 없이 수행된다. 유사한 투여량이 다른 점막 표면에 투여될 수 있다.

[0129]

또한, 원하는 경우, scTCR을 포함할 수 있는 백신은 최소량의 약제학적 첨가제, 예컨대, 보조 물질, 예컨대, 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 및/또는 백신의 효과를 증강시키는 애주번트를 포함할 수 있다. 효과적일 수 있는 애주번트의 예로는 수산화알루미늄; N-아세틸-무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 (thr-MDP); N-아세틸-노르-무라밀-L-알라닐-D-이소글루타민 (CGP 11637, 노르-MDP로도 지칭됨); N-아세틸무라밀-L-알라닐-D-이소글루타민-L-알라닌-2-(1'-2'-디팔미토일-sn-글리세로-3히드록시포스포릴옥시)-에틸아민 (CGP 19835A, MTP-PE로 지칭됨); 및 2% 스쿠알렌/트윈® 80 에멀젼 중 박테리아로부터 추출된 3가지 성분 : 모노포스포릴 지질 A, 트레할로스 디마이콜레이트 및 세포벽 골격 (MPL+TDM+CWS)을 함유하는 RIBI를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 관련 기술분야에 공지되어 있는 바와 같은 상기 추가 제형 및 투여 형태가 또한 사용될 수 있다.

[0130]

본 개시내용의 scTCR, 및/또는 1차 구조가 TCR 가변 영역과 유사하고 (동일성 90% 초과), 표적 리간드에 대하여 고친화도를 유지하는 결합 단편이 중성 또는 염 형태로서 백신으로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염으로는 무기산, 예컨대, 염산 또는 인산; 및 유기산, 예컨대, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 또는 말레산과 형성되는 (펩티드의 유리 아미노 기와 형성되는) 산부가 염을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 유리 카르복실기와 형성되는 염은 또한 무기 염기, 예컨대, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 수산화제2철, 및 유기 염기, 예컨대, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노-에탄올, 히스티딘, 및 프로카인으로부터 유도될 수 있다.

- [0131] 치료학적 용도를 위한 scTCR은 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 예방학상 및/또는 치료학적 효과적인 양 및 방식으로, 및 투여 제형과 혼화성인 방식으로 투여된다. 투여량은 일반적으로 1회 용량당 약 100 내지 20,000 μg 의 단백질 범위, 더욱 일반적으로, 1회 용량당 약 1000 내지 10,000 μg 의 단백질 범위이다. 예를 들어, 표적 리간드가 결합하는 세포를 검출하기 위해, 영상화에서 사용하기 위한 표지화된 scTCR을 사용하는 유사 조성물은 유사한 방식으로 투여될 수 있다. 투여되어야 하는 활성 성분의 정확한 양은 의사 또는 수의사의 판단에 따라 달라질 수 있고, 각 개체에 대해 특별할 수 있지만, 상기 측정은 상기 의사의 기술 범위 내에 있다.
- [0132] TCR 생성물은 단일 용량으로; 2회 투약 스케줄로, 예를 들어, 2 내지 8주 간격으로; 또는 다중 투약 스케줄로 제공될 수 있다. 다중 투약 스케줄은, 치료의 1차 과정이 1 내지 10회 이상의 별개의 투약에 이어서, 반응을 유지시키고/거나, 그를 강화시키는데 요구되는 바와 같이 순차적인 시간 간격으로 투여되는 다른 투약을 포함할 수 있는 것이다.
- [0133] 기술되거나 예시된 화합물의 모든 제형 또는 성분의 조합은 달리 언급되지 않는 한, 본 기재내용을 실행하는데 사용될 수 있다. 물질의 특정 명칭은 관련 기술분야의 통상의 기술자가 동일한 물질을 상이하게 명명할 수 있다고 알려져 있기 때문에, 예시인 것으로 하고자 한다. 화합물이 본원에 기술되어 화합물의 특별한 이성체 또는 에난티오머가, 예를 들어, 화학식으로 또는 화학명으로 명시되지 않은 경우에, 그 기술은 개별적으로 또는 임의의 조합으로 기술된 그 화합물의 각 이성체 및 에난티오머를 포함하고자 한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 구체적으로 예시된 것들이 아닌 다른 방법, 표적 리간드, 생물학적 활성기, 출발 물질 및 합성법이 과도한 실험에 의하지 않고 본 기재내용의 실행시 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 범위, 예를 들어, 온도 범위, 시간 범위 또는 조성 범위가 명세서에 제시되어 있으면 언제나, 그 범위에 포함된 모든 개별값뿐만 아니라, 모든 중간 범위 및 서브 범위는 본 기재내용에 포함시키고자 한다.
- [0134] 정확한 제제, 투여 경로 및 투여량은 환자의 상태를 고려하여 개별 의사에 의해 선택될 수 있다 (예컨대, 문헌 [Fingl et. al., in The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1975, Ch. 1 p. 1] 참조).
- [0135] 주치의는 독성, 또는 기관 기능 장애에 기인하여 투여를 종료, 중단, 또는 조정하는 방법 및 그러한 시기를 알 수 있다는 것에 주의하여야 한다. 역으로, 주치의는 또한 임상 반응이 적절하지 않을 경우 (독성 제외)에는 치료를 더 높은 수준으로 조정하는 것을 알 것이다. 관심의 대상이 되는 장애 관리에서 투여 용량의 크기는 치료하고자 하는 병증의 중증도 및 투여 경로에 따라 달라질 것이다. 병증의 중증도는 예를 들어, 부분적으로는 표준 예후 평가 방법에 의해 평가될 수 있다. 추가로, 용량 및 아마도 투약 빈도 또한 개별 환자의 연령, 체중, 및 반응에 따라 달라질 것이다. 상기에서 논의된 것과 견줄만한 프로그램이 또한 수의학에서도 사용될 수 있다.
- [0136] 치료되는 구체적인 병증 및 선택된 표적 방법에 따라, 상기 작용제는 전신으로 또는 국소적으로 제형화되어 투여될 수 있다. 제형화 및 투여 기술은 문헌 [Alfonso and Gennaro (1995)]에서 살펴볼 수 있다. 적합한 경로로는, 예를 들어, 경구, 직장, 경피, 질, 경첨막, 또는 장 투여; 근육내, 피하, 또는 골수내 주사 뿐만 아니라, 경막내, 정맥내, 또는 복강내 주사를 포함한, 비경구적 전달을 포함할 수 있다.
- [0137] 주사용인 경우, 본 개시내용의 작용제는 수용액 중에서, 바람직하게는, 생리학상 혼화성인 완충제, 예컨대, 행크스 용액, 링커액, 또는 생리 식염수 완충제 중에서 제형화될 수 있다. 경첨막 투여용인 경우, 투과되는 장벽에 적절한 침투제가 제형에 사용된다. 상기 침투제는 일반적으로 관련 기술분야에 공지되어 있다.
- [0138] 본 개시내용의 실시를 위해 개시된 본원의 화합물을 전신 투여에 적합한 투여 형태로 제형화하기 위한 약제학적 으로 허용가능한 담체의 용도가 본 개시내용의 범주 내에 포함된다. 담체 및 적합한 제조 실행을 적절히 선택함에 따라 본 개시내용의 조성물, 특히, 용액으로 제형화된 조성물은 비경구적으로, 예컨대, 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있다. 적절한 화합물은 관련 기술분야에 잘 알려진 약제학적으로 허용가능한 담체를 사용하여 경구 투여용으로 적합한 투여 형태로 제형화될 수 있다. 상기 담체를 통해 본 개시내용의 화합물은 치료하고자 하는 환자에 의해 경구적으로 섭취되는 정제, 환제, 캡슐제, 용액, 젤제, 시럽제, 슬러리, 혼탁제 등으로서 제형화될 수 있다.
- [0139] 세포내로 투여되도록 의도되는 작용제는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 주지된 기술을 사용하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 상기 작용제는 리포솜 내로 캡슐화된 후, 상기 기술된 바와 같이 투여될 수 있다. 리포솜은 수성 내부가 있는 구형 지질 이중층이다. 리포솜 형성시 수용액 중에 존재하는 모든 분자는 수성 내부 내로 혼입된다. 리포솜 내용물은 외부 미세환경으로부터 보호될 뿐만 아니라, 리포솜이 세포막과 융합되기 때문에, 이는 세포 세포질로 효율적으로 전달된다. 추가로, 소형 유기 분자는 이의 소수성에 기인하여 세포내로 직접 투여될 수 있다.

- [0140] 본 개시내용에서 사용하기에 적합한 약제학적 조성물은 활성 성분이 의도하는 목적을 달성하는 데 효과적인 양으로 함유되어 있는 조성물을 포함한다. 유효량 결정은 특히, 본원에 제공된 상세한 개시내용에 비추어 관련 기술분야의 통상의 기술자의 능력 범위 내에 잘 포함되어 있다.
- [0141] 활성 성분 이외에도, 상기 약제학적 조성물은 활성 화합물이 약제학적으로 사용될 수 있는 제제로의 가공을 용이하게 하는 부형제 및 보조제를 포함하는 적합한 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유할 수 있다. 경구 투여용으로 제형화된 제제는 정제, 당의정, 캡슐제, 또는 용액 형태일 수 있고, 이는 서방출용으로 제형화된 것, 또는 약제학적이 소장 또는 대장에 도달하였을 때에만 오직 방출되도록 제형화된 것을 포함한다.
- [0142] 본 개시내용의 약제학적 조성물은 그 자체가 공지된 방식으로, 예컨대, 종래 혼합, 용해, 과립화, 당의정 차폐, 부양, 유화, 캡슐화, 포획화 또는 동결건조 공정에 의해 제조될 수 있다.
- [0143] 비경구 투여용의 약제학적 제형은 수용성 형태로 활성 화합물의 수용액을 포함한다. 추가로, 활성 화합물의 용액은 적절한 오일성 주사 용액으로서 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클로는 지방 오일, 예컨대, 참깨 오일, 또는 합성 지방산 에스테르, 예컨대, 에틸 올레아이트 또는 트리글리세리드, 또는 리포솜을 포함한다. 수성 주사 용액은 용액의 점성을 증가시키는 물질, 예컨대, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨, 또는 텍스트란을 함유할 수 있다. 임의로, 용액은 또한 적합한 안정제, 또는 고도로 농축된 용액을 제조할 수 있도록 화합물의 용해도를 증가시키는 작용제를 함유할 수 있다.
- [0144] 경구용 약제학적 제형은, 활성 화합물을 고체 부형제와 함께 혼합하고, 임의로 생성된 혼합물을 분쇄시키고, 필요할 경우, 정제 또는 당의정 코어를 수득하기 위해 적합한 보조제를 첨가한 후, 과립제 혼합물을 가공할 수 있다. 적합한 부형제는 특히 충전제, 예컨대, 락토스, 수크로스, 만니톨, 또는 소르비톨을 포함한, 당; 셀룰로스 제제, 예컨대, 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트라가칸트 검, 메틸 셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 및/또는 폴리비닐피롤리돈 (PVP)이다. 원하는 경우, 봉해제, 예컨대, 가교결합된 폴리비닐 피롤리돈, 아가, 또는 알긴산, 또는 이의 염, 예컨대, 알긴산 나트륨이 첨가될 수 있다.
- [0145] 당의정 코어에 적합한 코팅제가 제공된다. 이러한 목적을 위해, 임의로 아라비아 검, 탈크, 폴리비닐 피롤리돈, 카르보폴 엘, 폴리에틸렌 글리콜, 및/또는 이산화티타늄, 래커 용액, 및 적합한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 함유할 수 있는 농축된 당 용액이 사용될 수 있다. 식별을 위해, 또는 활성 화합물 용량의 상이한 조합을 특정 규명하기 위해 정제 또는 당의정 코팅제에 염료 또는 색소가 첨가될 수 있다.
- [0146] 경구적으로 사용될 수 있는 약제학적 제제는 젤라틴으로 제조된 압입(push-fit) 캡슐제뿐만 아니라, 젤라틴 및 가소화제, 예컨대, 글리세롤 또는 소르비톨로 제조된 연질, 밀봉된 캡슐제를 포함한다. 압입 캡슐제는 충전제, 예컨대, 락토스, 결합제, 예컨대, 전분 및/또는 윤활제, 예컨대, 탈크 또는 마그네슘 스테아레이트, 및 임의로 안정제를 함유할 수 있다. 연질 캡슐제에서, 활성 화합물은 적합한 액체, 예컨대, 지방 오일, 액체 파라핀, 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜 중에 용해되거나 혼탁될 수 있다. 또한, 안정제가 첨가될 수 있다.
- [0147] 치료 방법
- [0148] 고친화도의 TCR 및 고친화도의 TCR을 포함하는 약제학적 조성물은, 예를 들어, 암, 종양, 악성 종양, 또는 신생물 질환이나 장애를 갖는 환자를 치료하는데 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 암이 있는 환자의 치료 방법은 본원에 기술된 고친화도의 TCR을 투여함을 포함한다. 일 실시형태에서, 고친화도의 TCR은 WT1에 대해 특이적이다. 일 실시형태에서, TCR은 서열 번호: 3로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V β 를 포함한다. 다른 실시형태에서, TCR은 서열 번호: 4로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V α 를 포함한다. 일 실시형태에서, 고친화도의 TCR은 서열 번호: 5로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 단쇄 TCR이다. 다른 실시형태에서, 고친화도의 TCR은 치료제, 예를 들어, 화학치료제와 함께 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 고친화도의 TCR은 생물학적 활성 기에 접합된다.
- [0149] 본 발명의 다른 측면은 본원에 기술된 야생형 TCR 및 고친화도의 TCR을 발현하는 T 세포를 투여함을 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에 대한 T 세포의 입양 전달 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, T 세포는 WT1에 대해 특이적인 TCR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 의해 형질감염시켰다. 일 실시형태에서, TCR은 서열 번호: 3로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V β 를 포함한다. 다른 실시형태에서, TCR은 서열 번호: 4로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V α 를 포함한다. 일 실시형태에서, 고친화도의 TCR은 서열 번호: 5로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 단쇄 TCR이다.

- [0150] 실시예
- [0151] 하기 실시예는 본 개시내용의 비-제한적인 예를 추가로 기술한다.
- [0152] 실시예 1
- [0153] 웨티드/HLA-A2 항원에 대한 더 높은 친화도를 위한 TCR의 조작
- [0154] 개선된 친화도 및 안정성을 위한 단쇄 TCR을 발견하거나, 또는 생성하는데 사용되는 일반적인 방법이 도 3에 제시되어 있다. 본 공정은 예시된 바와 같이 6단계를 포함한다:
- [0155] 1) 디스플레이를 위한 단쇄 TCR 양식으로서의, P22와 같은 T 세포 클론으로부터의 V α 및 V β 을 클로닝하는 것 (도 1내 나타난 서열, 서열 번호: 1에 기재된 아미노산을 포함하는 V β 및 서열 번호: 2에 기재된 아미노산을 포함하는 V α). V 영역은 HLA-A2로의 복합체 내에서 HLA-A2-제한된 항원성 웨티드 WT1 (서열 번호: 6)를 인식한다. 본 발명에서, 클론 P22으로부터의 TCR V 영역 유전자 (예컨대, Dossett et al. (2009) Mol Ther. 17(4), 742 참조)를 단쇄 양식 (V β -링커-V α)으로서 클로닝하여, 효모 표면 상에서의 발현을 위해 효모 디스플레이 벡터로 도입시켰다(도 4).
- [0156] 2) 실수유발 라이브러리의 생성 및 항-V β 항체에 의한 안정화된 변이체를 위한 FAC 또는 자기 비드 선별. 단쇄 V α 및 V β TCR은 종종 안정화된 불변 영역의 손실로 인하여 불안정하기 때문에, 실수유발 돌연변이 유발 라이브러리는 이것으로 제한되지는 않지만, 파지 및 포유동물 디스플레이를 포함한 다른 디스플레이가 사용될 수 있음에도 불구하고, 효모 표면 상에서 안정하게 발현될 수 있도록 하는 안정화된 돌연변이를 선별하기 위하여 생성한다. 파지 디스플레이 벡터 및 클로닝을 통해 10^{11} 의 라이브러리 크기를 수득한 반면에, 효모 디스플레이 벡터 및 상동성 재조합 단계를 통해 10^{10} 의 라이브러리 크기를 수득하였다 (문헌 [Benatuil et al. (2010) Protein Eng Des Sel, 23, 155-9]). 변이체를 선별하는 데 각종 방법이 사용되었는데, 이는 고정된 리간드에의 친화도 기반 결합 (파지 디스플레이) 또는 항원을 이용하는 자기 입자 선별 (효모 디스플레이), 또는 표지화된 웨티드-MHC 항원을 이용하는 형광 활성화 세포 분류 (효모 디스플레이)를 포함하였다. 풀딩된 에피토프를 인식하는 TCR V β 에 대한 항체를 이용함으로써, 형광 활성화 세포 분류(FACS) 또는 자기 비드 선별이 본 실시예에서 항체 결합이 개선된 변이체를 단리시키기 위해 사용된다.
- [0157] 3) 실수유발 라이브러리로의 선별로부터 단리된 scTCR 클론은 열 안정성에 대해 평가하고, 안정화된 변이체는 친화도 성숙에 대한 주형을 위해 선택하여, 서열화한다. 전형적으로, 효모 표면 수준 증가, 및 용액에서의 더 큰 안정성에 기여하는 단일-부위 돌연변이가 확인된다.
- [0158] 4) 안정화된 scTCR 서열은, 이것으로 제한되는 것은 아니지만, CDR1 β , CDR2 α , CDR2 β 및 HV4를 포함한 다른 영역이 또한 사용될 수 있음에도 불구하고, CDR 라이브러리의 생성을 위한 주형으로서, 대개는 CDR1 α , CDR3 α , CDR3 β 에서 사용된다. 본 기재내용에서, 이것으로 제한되는 것은 아니지만, 파지 디스플레이를 사용한 패닝 (panning) 또는 포유동물 디스플레이를 사용한 자기 선별 또는 FACS가 사용될 수 있음에도 불구하고, 자기 비드 선별 및/또는 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 사용함으로써, 효모 디스플레이된 변이체는 CDR 라이브러리로부터 웨티드:MHC에 대한 개선된 결합을 위해 선별된다.
- [0159] 5) CDR 라이브러리의 선별로부터 단리된 scTCR 클론은 그들이 조작된 웨티드:MHC에 대한 특이적인 결합에 대해 평가한다. 플라스미드는 효모 클론으로부터 구제되어 서열화된다.
- [0160] 6) 추가의 친화도 개선이 필요하다면, 단계 5에서 선별된 scTCR 클론은, 이것으로 제한되는 것은 아니지만, CDR1 β , CDR2 α , CDR2 β 및 HV4를 포함한 다른 영역이 또한 사용될 수 있음에도 불구하고, 돌연변이가 선별되지 않은 다른 루프 또는 영역에서, 예컨대 CDR1 α , CDR3 α , CDR3 β 에서 추가의 라이브러리 생성을 위한 주형으로서 사용될 수 있다. 이를 단계 각각의 예가 하기에 추가로 기술된다.
- [0161] 실시예 2
- [0162] TAX:HLA.A2와의 복합체에서 V α 2를 사용하는, 인간 TCR A6의 분석
- [0163] TCR은 모두 유사한 Ig-폴드 및 도킹 각도를 채택하고, pepMHC의 TCR 인식은 CDR 루프 상에서 특정 잔기에 의해 전적으로 매개한다 (문헌 [Garcia et al. (2009) Nat Immunol, 10, 143-7]; [Marrack et al. (2008) Annu Rev Immunol, 26, 171-203]; [Rudolph et al. (2006) Annu Rev Immunol, 24, 419-66]). WT1 TCR에 대한 결정 구조가 본 기재시 이용가능하지 않음에도 불구하고, WT1 P22 TCR의 동일한 V α 2 도메인을 사용한, A6:Tax 웨티드

드:HLA-A2 복합체 (PDB: 1A07)의 구조 (문헌 [Garboczi et al. (1996) Nature, 384, 134-141])가 제시되고 있다. 복합체의 측면도에서는 6개의 CDR을 포함하는 가변 도메인의 단부가 Tax:HLA.A2 분자 상에 도킹되고, 결합 부위의 중심 영역은 펩티드 Tax 상에 위치하는 것으로 나타났다 (도 2a). 결정 구조는 불변 영역이 전장 자체물의 안정화를 돋지만, 불변 영역 α 를 포함하지 않는다. 상기 기술된 단계 2에서 선별된 안정화된 돌연변이는 종종 프레임워크 영역에서, 예컨대 V α /V β 계면에서 선별되거나, 또는 여기서 C α /V α 또는 C β /V β 계면의 접합이 전장 TCR에서 일어난다.

[0164] 6개의 CDR 루프를 제외한, TCR이 "제거된" Tax:HLA.A2 복합체의 하향식 단면도가 제시되어 있다 (도 2b). 이 도면에는 TCR이 펩티드-MHC 상에 대각선 방향의 위치를 선택하는 것으로 나타나 있으며, 이러한 관찰 결과는 현재 모든 TCR:펩티드-MHC 구조에서 관찰되었다. 이러한 배향으로, 주로 MHC 분자의 나선과 함께 상호작용하는 CDR1 및 CDR2 루프로부터 다양한 잔기가 존재하는 반면에, 두 CDR3 루프는 펩티드 상에 배치되어 있다. 단계 4 및 6에서 친화도 성숙을 위해, 다른 영역이 사용될 수 있음에도 불구하고, 이를 루프는 종종 친화도 성숙 라이브러리의 생성을 위해 표적이 된다.

실시예 3

WT1 TCR의 효모 디스플레이

[0167] 개선된 안정성 (단계 2) 또는 개선된 친화도 (단계 5)에 대한 선별을 수행하기 위하여, TCR 돌연변이체의 라이브러리가 형태 에피토프 또는 펩티드:MHC 리간드를 각각 인식하는 항체에 대한 결합에 대해 스크리닝될 수 있는 디스플레이 시스템을 사용할 필요가 있다. 더 높은 친화도를 위해 TCR을 조작하는데 3개의 디스플레이 시스템이 사용되었으며, 이는 상기 공정에 사용될 수 있었다: 효모 디스플레이, 파지 디스플레이, 및 T 세포 (포유동물 세포) 디스플레이. 대체 디스플레이 방법, 예컨대, 리보솜, RNA, DNA, 및 CIS 디스플레이 또한 상기 공정에 적합할 수 있다. 이러한 모든 경우에서, 항원에 대해 친화도가 낮은 야생형 TCR을 시스템으로 클로닝하고, 이를 펩티드:MHC 리간드에 대한 개선된 안정성 및 친화도를 가지는 TCR을 조작하기 위한 주형으로서 사용하였다. 이를 시스템 중 임의의 것이 본원에 기술된 접근법에 적용될 수 있었고, 여기서 단일 TCR은 라이브러리 및 결합 특성이 개선된 TCR의 선별을 위한 주형으로서 사용된다.

[0168] 본 실시예에서, 효모 디스플레이를 플랫폼으로서 사용하였다 (도 4). WT1 TCR은 실수유발 돌연변이유발을 통해 돌연변이를 안정화시키기 위한 주형으로서 사용되었고, 선별로부터 단리된 안정화된 클론은 친화도 성숙을 위한 주형으로서 사용되었다.

실시예4

안정화된 WT1 TCR, WT1-D13의 실수유발 라이브러리 조제 및 선별

[0171] WT1 실수유발 라이브러리는 앞서 기술한 바와 같이, (문헌 [Richman et al. (2009) Methods Mol Biol 504, 323-350])주형으로서의 P22로 불리우는 WT1-반응성 세포주를 이용하여 생성하였다. 선형화된 pCT302 벡터, WT1 실수유발 PCR 생성물, 및 적격 EBY 100 효모 세포를 조합함으로써 인간 WT1 실수유발 scTCR 라이브러리를 효모 디스플레이 벡터내로 도입시켰다. 생성된 라이브러리는 전기천공 후 분취량의 효모를 제한 회석법으로 플레이팅하여 판단하였고, 약 2.3×10^7 개의 독립된 클론을 함유하였다. 라이브러리는 표 1에 따라 FACS를 통해, 인간 hV β 3, 항-hV β 3.1 FITC IgG (Thermo Scientific) 및 항-hV β 3 FITC IgM (Beckman Coulter)를 인식하는 항체에 대한 결합에 대해 선별하였다.

표 1

분류 조건

분류	조건
1	씨모 사이언티픽(Thermo Scientific) hV β 3.1 FITC (1:10); 알렉사플루오르(AlexaFluor)® 647 염소 항-마우스 IgG (1:100) 및 베크만-코울터(Beckman Coulter) hV β 3 FITC IgM (1:10); 염소 항-마우스 IgM APC (1:4)
2	씨모 사이언티픽(Thermo Scientific) hV β 3.1 FITC (1:10); 알렉사플루오르(AlexaFluor)® 647 염소 항-마우스 IgG (1:100) 및 베크만-코울터(Beckman Coulter) hV β 3 FITC IgM (1:10); 염소 항-마우스 IgM APC (1:4)

3	써모 사이언티픽(Thermo Scientific) hV β 3.1 FITC (1:10); 알렉사플루오르(AlexaFluor)® 647 염소 항-마우스 IgG (1:100) 및 벡만-코울터(Beckman Coulter) hV β 3 FITC IgM (1:10); 염소 항-마우스 IgM APC (1:4)
---	--

[0173] 열변성 연구를 사용하여, 본 발명자는 V β 3 상의 폴딩된 에피토프를 인식하는 이러한 항체를 확인하였다 (데이터는 제시되지 않음). 신호는 AlexaFluor® 647 염소 항-마우스 IgG (Life Technologies) 및 염소 항-마우스 IgM APC (Invitrogen) 2차 항체를 사용하여 증폭시켰다. 3회 반복되는 분류 동안, V β 3-양성 염색 집단이 나타났다 (도 5a). 3^{번째} 분류에 이어서, WT1-D13라 불리우는 클론이 개선된 V β 3 형광을 위하여 단리되었고 (도 5b), 80 ° C까지 가열 시 열 안정성을 나타냈다 (데이터는 제시되지 않음). WT1-D13 클론은 친화도 성숙을 위한 주형으로서 사용되었다.

[0174] 실시예 5

WT1:HLA.A2, WT1.1에 대한 결합이 증진된 WT1 TCR의 CDR1 α 라이브러리 제작 및 선별

[0176] 실수유발 PCR 라이브러리의 선별로부터 단리된 안정화된 WT1-D13 클론은 중복 확장에 의한 스플라이싱(SOE)을 통해 인접한 4개의 잔기가 한 번에 걸쳐 있는 CDR1 α 라이브러리의 생성을 위한 주형으로서 사용되었다 (Horton et al. (1990) Biotechniques, 8, 528-535). 선형화된 pCT302 백터, WT1-D13 CDR1 α 라이브러리 PCR 생성물, 및 적격 EBY100 효모 세포를 조합함으로써 인간 WT1-D13 CDR1 α scTCR 라이브러리를 효모 디스플레이 백터내로 도입시켰다. 생성된 라이브러리는 전기천공 후 분취량의 효모를 제한 회석법으로 플레이팅하여 판단하였고, 약 3.1 X 10⁶개의 독립된 클론을 함유하였다. WT1-D13 CDR1 α 라이브러리를 WT1 (RMFPNAPYL, 서열 번호:6)/HLA.A2/Ig 이량체 (BD 다이머X)에 대한 결합에 대해 표 2에 따라 FACS 분류하였다.

표 2

분류 조건

분류	조건
1	100 nM WT1:HLA.A2 이량체 APC-접합된 염소 항-마우스 2차 항체 (1:100)
2	100 nM WT1:HLA.A2 이량체 APC-접합된 염소 항-마우스 2차 항체 (1:100)
3	100 nM WT1:HLA.A2 이량체 APC-접합된 염소 항-마우스 2차 항체 (1:100)
4	100 nM WT1:HLA.A2 이량체 APC-접합된 염소 항-마우스 2차 항체 (1:100)
5	200 nM WT1:HLA.A2 이량체 APC-접합된 염소 항-마우스 2차 항체 (1:100)

[0178] WT1 (RMFPNAPYL, 서열 번호:6)/HLA-A2/Ig 이량체로의 FACS에 의한 5회의 선별 후, 적절히 양성 염색된 집단이 나타나기 시작했다 (도 6a). 5^{번째} 분류 후 단리된 클론 WT1-D13.1은, WT1 (RMFPNAPYL, 서열 번호:6)/HLA.A2에 대한 적절한 결합 개선을 나타내었으며, 친화도 성숙을 위한 주형으로서 사용되었다 (도 6b).

[0179] 실시예 6

WT1:HLA.A2, WT1.1.1에 대한 결합이 증진된 WT1 TCR의 CDR3 라이브러리 제작 및 선별

[0180] WT1 scTCR의 친화도의 추가 개선을 위하여, CDR3 라이브러리를 WT1-D13 CDR1 α 라이브러리로부터 단리된 WT1-D13.1 클론을 주형으로서 사용하여 생성하였다. WT1-D13.1 CDR3 라이브러리는 한 번에 각 CDR3 내에 걸쳐 있는 5개의 인접 코돈을 중복 확장에 의한 스플라이싱(SOE) PCR을 사용하여 생성하였다 (CDR3 β 루프 내의 2개 라이브러리; CDR3 α 루프 내의 2개 라이브러리). 따라서, 선형화된 pCT302 백터, WT1-D13.1 CDR3 PCR 생성물 (즉, CDR3 α 1, CDR3 α 2, CDR3 β 1, 또는 CDR3 β 2 라이브러리), 및 적격 EBY100 효모 세포를 조합함으로써 각 WT1-D13.1 CDR3 라이브러리를 효모 디스플레이 백터내로 도입시켰다. 4개의 생성된 라이브러리를 풀링하였고, 생성된 라이브러리는 전기천공 후 분취량의 효모를 제한 회석법으로 플레이팅하여 측정 시, 약 3.5 X 10⁶ 개의 독립

된 클론을 함유하였다. WT1-D13 CDR3 라이브러리를 WT1 (RMFPNAPYL, 서열 번호:6)/HLA.A2/Ig 이량체 (BD 다이머X)에 대한 결합에 대해 표 3에 따라 FACS 분류하였다.

표 3

분류 조건

[0182]

분류	조건
1	100 nM WT1:HLA.A2 이량체 APC-접합된 염소 항-마우스 2차 항체 (1:100)
2	100 nM WT1:HLA.A2 이량체 APC-접합된 염소 항-마우스 2차 항체 (1:100)
3	10 nM WT1:HLA.A2 이량체 APC-접합된 염소 항-마우스 2차 항체 (1:100)

[0183]

WT1 (RMFPNAPYL, 서열 번호: 8)/HLA-A2/Ig 이량체로의 FACS에 의한 3회의 선별 후, 적절히 양성 염색된 집단이 나타나기 시작했다 (도 7a). 3^{번째} 분류 후 단리된 클론 WT1-D13.1.1은, WT1 (RMFPNAPYL, 서열 번호:8)/HLA.A2에 대한 증가된 결합을 나타내었다 (도 7b).

[0184]

실시예 7

[0185]

고친화도 WT1 TCR, WT1-D13.1.1의 결합 분석

[0186]

CDR3 라이브러리의 선별로부터 단리된 WT1-D13.1.1 클론의 결합을 평가하기 위하여, WT1-D13.1.1을 디스플레이하는 효모를 WT1 (RMFPNAPYL, 서열 번호:6)/HLA.A2 이량체 HLA-A2-Ig 및 *E.coli*로부터 발현 및 정제된 단량체로 적정하였다. WT-1/A2 이량체를 160 pM 내지 500 nM에서 검정하였고 (도 8a), 단량체를 6.4 nM 내지 4 μM에서 검정하였다 (도 8b). 효모 세포를 이후 세정하고 유동 세포측정으로 분석하였다. 평균 형광 강도 (MFI)를 WT-1/HLA-A2 복합체의 농도에 대한 각 히스토그램에 대해 도시하였다. 같은 비선형 회귀 분석을 사용하여 표준화하였고, 25 nM 및 240 nM의 $K_{D,app}$ 값을 이량체 및 단량체 각각에 대하여 측정하였다 (도 8c and 8d). 따라서, WT1-D13.1.1은 나노몰의 친화도를 나타냈다.

[0187]

실시예 8

[0188]

가용성 고친화도 WT1 TCR, WT1-D13.1.1의 결합 분석

[0189]

WT1-D13.1.1 scTv^o 특이적으로 WT1/HLA-A2에 고친화도로 결합한다는 것을 추가로 나타내기 위하여, WT1-D13.1.1 scTv의 가용성 형태를 이콜라이 포함 몸체로부터 발현 및 재풀딩하였고, C-말단 BirA 태그를 통하여 비오티닐화하였다. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72; Zhang et al. (2007) J Exp Med, 204, 49-55). 인간 세포주 T2 (HLA-A2+)를 1 μM Tax, MART-1, 또는 WT1 웨티드와 함께 인큐ベ이트하고, 세정하였다. 비오티닐화된 WT1-D13.1.1 scTv를 웨티드 없이 사전-로딩된 T2 세포 상에서 (도 9a), 음성 웨티드 Tax (4 nM 내지 1 μM) (도 9b), 놀(null) 웨티드 MART-1 (4 nM 내지 1 μM) (도 9c), WT1 (4 nM 내지 1 μM) (도 9d)로 적정하였다. 효모 세포를 이후 세정하고 SA-PE로 인큐베이트하고 유동 세포측정으로 분석하였다. WT1 웨티드로 로딩된 세포만이 WT1-D13.1.1 TCR (도 9a-d)에 의하여 결합되었으며, 이는 가용성 TCR이 WT1에 대해 특이적이라는 것을 나타내었다. WT1 적정의 MFI 대 TCR 농도 도식의 비-선형 회귀는 가용성 TCR이 260 nM의 최소 K_D 값을 나타내는 것을 보여주었다 (도 9e).

[0190]

실시예 9

[0191]

WT1 항원에 대한 개선된 친화도를 위한 단리된 TCR의 서열 분석

[0192]

WT1-특이적 (P22, D13, D13.1, D13.0.1 및 D13.1.1) 단쇄 TCR의 서열을 단리된 플라스미드로부터 결정하였고, 도 1에 나타내었다. P22, D13, D13.1, D13.0.1 및 D13.1.1의 V β 쇄의 아미노산 서열은 서열 번호: 1, 21, 21, 3 및 3에 각각 개시되고, P22, D13, D13.1, D13.0.1 및 D13.1.1의 V α 쇄의 아미노산 서열은 서열 번호: 2, 22, 4, 2, 및 4에 각각 개시된다. 주목할 것은 D13.0.1이 최종 친화도 성숙 scTCR D13.1.1 (서열 번호: 5)로부터의 CDR1 α 돌연변이를 제거함으로써 삭제되었다는 것이다. 도 1에서 밀줄친 위치는 돌연변이를 안정화시키기 위한 실수유발 라이브러리 선별로부터 유발된 돌연변이를 나타낸다. 박스에서의 위치는 CDR 라이브러리로부터

선별된 친화도 증진 돌연변이를 나타낸다.

[0193] 실시예 10

[0194] CD8 및 CD4 T세포에서 WT1-P22, WT1-D13.1, WT1-D13.0.1 및 WT1-D13.1.1 TCR의 시험관내 활성

[0195] T 세포 내 상이한 WT1-특이적 TCR의 활성을 평가하기 위하여, CD8 (도 10a) 및 CD4 (도 10b) T 세포를 AAD 형질전환된 마우스 (이들은 HLA-A2의 $\alpha 1$ 및 $\alpha 2$ 도메인 및 마우스 Db의 $\alpha 3$ 도메인으로 이루어진 하이브리드 그룹 I 유전자를 갖는 마우스 D^b이고; 이들 AAD 마우스는 잭슨 래보러토리즈(Jackson Laboratories)에서 이용가능하다)로부터 단리하였다. 세포를 항-CD3 및 항-CD28으로 커플링된 비드로 활성화하였고, 이후 WT1-P22, WT1-D13.1, WT1-D13.0.1 및 WT1-D13.1.1 TCR (서열은 D13 안정화 돌연변이, V β F48S 및 D51G를 함유하지 않았음)로 형질도입하였다 (다음에 기술됨: Chervin et al., (2013) Gene Ther. 20(6):634-44). T 세포를, 상이한 농도의 웨პ티드 WT1 및 AAD 아세포 (AAD 마우스로부터의 비장 세포의 콘카나빌린(Concanavilin) A 자극에 의하여 제조된)와 함께 인큐베이트하였다. 24시간의 인큐베이션 기간 후에, 상청액을 ELISA를 IFN- γ 농도에 대해 분석하였다. CD8 T 세포는 D13.0.1 및 D13.1.1 TCR에 의한 최대 활성을 나타내었다 (도 10a). CD4 T 세포는 오직 D13.1.1 TCR과 활성화되었고, 이는 D13.1.1이 독립적으로 CD8의 활성을 매개할 수 있다는 것을 보여준다 (도 10b). 기타 HLA-A2 결합 웨პ티드, 예컨대 MART1와의 반응성이 관찰되지 않았다.

[0196] 실시예 11

[0197] CD8 T 세포 내 WT1-D13.1.1 TCR는 WT1에 유사한 인간 웨პ티드에 반응성이 아니다.

[0198] 고친화도 WT1-D13.1.1 TCR의 특이성을 추가로 결정하기 위하여, WT1 웨პ티드와 구조적으로 유사한 웨პ티드로 시험관내 활성을 측정하였다. 프로테오솜 검색을, WT1의 9개 잔기에서의 보존적 돌연변이에 기반하여, WT1 웨პ티드와 구조적으로 유사한 웨პ티드에 대해 수행하였다. 인간 프로테오솜 내 제시된 웨პ티드를 이후 예측 알고리즘을 통하여 HLA-A2에 대한 결합 능력에 대해 평가하였다. 고친화도로 HLA-A2에 결합할 것으로 예상되었던 10개의 웨პ티드 (도 11)을 합성하고, 고친화도의 WT1-D13.1.1 TCR로 형질도입된 활성화된 CD8 T 세포에 대한 능력에 대해 시험하였다. 이러한 웨პ티드 중 어떤 것도 활성을 나타내지 않았으며, 이는 이러한 TCR이 이러한 10개의 구조적 유사 웨პ티드를 제시할 때 특이성을 유지한다는 것을 시사한다.

[0199] 실시예 12

[0200] WT1, WT1-D13.1 및 WT1-D13.1.1 TCR의 치료학적 양식

[0201] 현재, 더 높은 친화도의 TCR이 상응하는 항원을 발현시키는 표적 세포를 위한 다양한 양식으로서 사용될 수 있다고 잘 알려져 있다. 따라서, 상기 제시된 조작 방법으로부터 생성된 TCR은 도 12에 예시된 바와 같이, 가용성 형태로 또는 입양 T 세포 요법을 위한 TCR 유전자 치료에 사용될 수 있음이 명확하다.

[0202] 물질 및 방법

[0203] 항체, 웨პ티드:HLA-A2, MACS 및 유세포 분석 시약

[0204] 효모 표면 발현을 검출하는데 사용되는 항체는: 항-HA 에피토프 태그 (클론 HA.11; 코밴스(Covance)), 항-hV β 3 FITC 항체 (클론 CH92; 벡크만-코울터(Beckman-Coulter)), 항-hV β 3.1 FITC 항체 (클론 8F10; 씨모 사이언티픽(Thermo Scientific), 항-hV β 20 항체 (클론 ELL1.4; 벡크만-코울터), 본 발명자의 실험실에서 생성된 항-V α 2 단클론 항체 (데이터는 제시되지 않음), 염소-항-마우스 IgM APC (라이프 텍놀로지스(Life Technologies)), 염소-항-마우스 IgG F(ab')₂ AlexaFluor® 647 2차 항체 (인비트로겐(Invitrogen)), 스트렙토비딘-피코에리트린(SA:PE, BD 파르미겐), 및 MACS 마이크로비드 (밀테닐 바이오텍(Miltenyl Biotec))를 포함했다.

[0205] HLA-A2 [WT1₁₂₆₋₁₃₄: RMFPNAPYL (서열 번호: 6)]에 결합하는 웨პ티드를 펜실베니아 주립대 의과 대학 마크로몰레큘라 코어 퍼설리티(Macromolecular Core Facility at Penn State University College of Medicine) (미국 펜실베니아주 허시)에서 표준 F-moc (N-(9-플루오레닐)메톡시카르보닐) 화학법에 의해 합성하였다. FACS 및 유세포 분석법 분석을 위해, 재조합 가용성 이량체 HLA-A2:Ig 융합 단백질 (BD™ 다이머X(DimerX))을 사용하였다. 추가적으로, UV 광의 존재하에 다른 HLA.A2-제한 웨პ티드를 UV-절단가능한 웨პ티드로 교환함으로써 생성된 단량체성 HLA.A2-비오틴 시약이 유세포 분석 및 MACS 선별을 위해 사용되었다 (문헌 [Rodenko et al. (2006) Nat Protoc, 1, 1120-1132]; [Toebes et al. (2006) Nat Med, 12, 246-251]).

[0206] 효모 디스플레이 벡터 중 scTv의 클로닝 및 발현

- [0207] Trp 배지에서의 성장을 허용하는 갈락토스-유도성 AGA2 융합체를 포함하는, 효모 디스플레이 플라스미드 pCT302 ($\text{V}\beta\text{-L-V}\alpha$)에서 TCR 가변 영역 단편 (scTv)을 발현시켰다 (문헌 [Boder and Wittrup (2000) Methods Enzymol, 328, 430-444]). scTv 유전자의 유도는 형질전환된 EBY100 효소 세포의 선별 배지 중에서의 정지기까지의 성장, 이어서, 갈락토스-함유 배지로의 이동을 포함하였다. 주형 WT1 단쇄 TCR 유전자는 자체물의 $\text{V}\alpha$ 2-도메인에 F49S 돌연변이를 가지면서 진스크립트 (미국 뉴저지주 피스카타웨이)에 의해 합성하였다 (문헌 [Aggen et al. (2011) Protein Eng Des Sel, 24, 361-372]).
- [0208] WT1 특이적 TCR 유전자를 CTL 클론으로부터 단리시켰고 (문헌 [Phillip Greenberg; 예를 들어, Dossett et al. (2009) Mol Ther. 17(4), 742]으로부터의 WT1에 대한 TCR 유전자), 유전자는 진스크립트에 의해 합성하여, 단쇄 양식 ($\text{V}\beta\text{-링커-}\text{V}\alpha$)으로서 클로닝하였고, 효모 표면상에서의 발현을 위해 효모 디스플레이 벡터내로 도입시켰다. scTv는 링커 영역 GSADDAAKKDAAKKDGS (서열 번호: 8)에 의해 부착된 가변 영역으로 이루어진다 (문헌 [Hoo et al. (1992) Proc Natl Acad Sci USA, 89, 4759-4763]; [Weber et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA, 102, 19033-19038]; [Aggen et al. (2011) Protein Eng Des Sel, 24, 361-372]). scTv는 pCT302의 NheI 및 XhoI 제한 부위로 도입시켰다.
- [0209] 돌연변이화된 scTv 효모 디스플레이 라이브러리의 생성, 디스플레이 및 선별
- [0210] 실수유발 PCR은 앞서 기술한 랜덤 돌연변이를 생성하는데 사용되었다 (문헌 [Richman et al. (2009) Mol Immunol, 46, 902-916]). CDR1 및 3 라이브러리는 한 번에 걸쳐 있는 4-5개의 인접 코돈을 중복 확장에 의한 스플라이싱(SOE) PCR을 사용하여 생성하였다 (문헌 [Horton et al. (1990) Biotechniques, 8, 528-535]).
- [0211] WT1-D13 CDR1 α 라이브러리에 대하여, 하기 프라이머 쌍을 사용하여 프리(pre)-SOE PCR 생성물을 생성하였다: 5' - GGC AGC CCC ATA AAC ACA CAG TAT -3' (스플라이스 4L) (서열 번호:9) 및 5' - ACG ATC GCT ATA GGT GCA GTT CAA TGA TGC AAT AGC ACC TTC CGG GAC ACT TAA TGG GCC GCT - 3'(서열 번호:10), 및 5' - ATT GCA TCA TTG AAC TGC ACC TAT AGC GAT CGT NNS NNS NNS NNS TTC TTT TGG TAT AGA CAG TAC AGT GGC AAA TCC CCG-3'(서열 번호:11) 및 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3' (T7) (서열 번호:12). SOE PCR은 T7 및 스플라이스 4L에 따라 각각 상응하는 프리(pre)-SOE를 사용하여 수행하였다.
- [0212] WT1-D13.1 CDR3 라이브러리에 대하여, 하기 프라이머 쌍을 사용하여 4개의 라이브러리 중 각각에 대하여 프리 (pre)-SOE PCR 생성물을 생성하였다: β 1: 5' - GGC AGC CCC ATA AAC ACA CAG TAT -3' (스플라이스 4L) (서열 번호:9). 및 5' - TGC ACA CAG GTA CAT GGA AGT TTG ATT GGT ACT AGC GCT TTC CAG AAT CAA ACT GAA ACG TTC TTT - 3' (서열 번호:13), 및 5' - AGT ACC AAT CAA ACT TCC ATG TAC CTG TGT GCA NNS NNS NNS NNS GAA CAG TTT TTC GGC CCA GGT ACA AGA TTA ACG GTG-3'(서열 번호:14) 및 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3' (T7) (서열 번호:12); β 2: 스플라이스 4L (서열 번호:9) 및 5' - TGC ACA CAG GTA CAT GGA AGT TTG ATT GGT ACT AGC GCT TTC CAG AAT CAA ACT GAA ACG TTC TTT TTC GGT ACA AGA TTA ACG GTG-3'(서열 번호:15), 및 5' - AGT ACC AAT CAA ACT TCC ATG TAC CTG TGT GCA AGC GAT TCC ATC NNS NNS NNS NNS GGC CCA GGT ACA AGA TTA ACG GTG-3'(서열 번호:16) 및 T7 (서열 번호:12); α 1: 스플라이스 4L (서열 번호:9) 및 5' - GGC GCA CAG GTA AGT GGC GCT ATC TGA CGG TTG GCT ATC ACG GAT TAA CAG AGA GAC ATA CTG GGA - 3' (서열 번호:17), 및 5' - CAA CCG TCA GAT AGC GCC ACT TAC CTG TGC GCC NNS NNS NNS NNS AAT ATG CTG ACC TTC GGT GGC GGT ACT CGC TTA ATG-3'(서열 번호:18) 및 T7 (서열 번호:12); α 2: 스플라이스 4L (서열 번호:9) 및 5' - GGC GCA CAG GTA AGT GGC GCT ATC TGA CGG TTG GCT ATC ACG GAT TAA CAG AGA GAC ATA CTG GGA - 3' (서열 번호:19), 및 5' - CAA CCG TCA GAT AGC GCC ACT TAC CTG TGC GCC GCG AAT AAC GCG NNS NNS NNS NNS TTC GGT GGC GGT ACT CGC TTA ATG-3'(서열 번호:20) 및 T7 (서열 번호:12).
- [0213] NheI 및 XhoI로 분해된 pCT302와 함께 실수유발 또는 SOE PCR 생성물을 전기천공시킴으로써 EBY100 효모에서 상동성 재조합에 의해 효모 라이브러리를 제조하였다 (문헌 [Horton et al. (1990) Biotechniques, 8, 528-535]). 라이브러리를 48시간 동안 갈락토스-함유 배지 (SG-CAA) 중에서 유도하고, 1 mL 1% PBS/BSA로 세척하고, 도 4a, 5a, 6a, 8a 및 9a에 제시된 농도에서 항체 또는 웹티드:MHC 시약으로 염색하였다. 세포를 세척하고 (1 mL, 1% PBS/BSA), FACS 아리아 (BD 바이오사이언스) 고속 분류기를 이용하여 또는 QuadroMACS™ 분리기 (Miltenyl Biotec) 상에서 MACS LS 칼럼을 통해 형광성이 가장 큰 세포를 선별하였다. 단리된 클론의 열 안정성을 시험하기 위하여, 효모는 염색 프로토콜 전에 30분 동안 승온에서 인큐베이션시켰다 (데이터는 제시되지 않음).
- [0214] 고친화도 클론의 단리 및 염색

- [0215] 선별에 이어서, 라이브러리 클론은 제한 회석법으로 플레이팅하여 단리시켰다. 콜로니를 확장시키고, 48시간 동안 갈락토스-함유 배지 (SG-CAA) 중에서 유도하고, 1 mL 1% PBS/BSA로 세척하여, 다양한 농도의 웨პ티드/HLA.A2 다이머X, 염소항-마우스 IgG F(ab')₂ AlexaFluor® 647 2차 항체, 또는 다양한 농도의 UV-교환된 웨პ티드/HLA.A2 SA-PE로 염색하였다. 세포를 세척하고 (1 mL, 1% PBS/BSA), Accuri C6 유세포 분석기에서 분석하였다.
- [0216] 자이모프렙™ 이스트 플라스미드 미니프렙 II(Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II) (자이모 리서치(Zymo Research))를 사용하여 플라스미드를 회수하고, 서브클로닝 에피시언시™ DH5 α™ 컴파턴트 셀즈(Subcloning Efficiency™ DH5 α™ Competent Cells) (인비트로젠)로의 열 충격 형질전환을 통해 이. 콜라이로 역도입시켰다. 이. 콜라이 세포를 확장시키고, QIA프렙 스핀 미니프렙 키트(QIAprep Spin Miniprep Kit) (퀴아젠 (Qiagen))를 사용하여 플라스미드를 단리시켰다. 개별 클론의 서열은 생어(Sanger) 서열 분석에 의해 분석하였다.
- [0217] 참고 문헌 및 변형에 의한 인용에 관한 진술
- [0218] 본원에서 인용된, 모든 참고 문헌, 예를 들어, 등록된 또는 승인된 특허 또는 등가물을 포함하는 특허 문서; 특허 출원 공개; 및 비특허 문헌 문서 또는 다른 원자료는 비록 각 참고 문헌이 본 출원의 개시내용과 적어도 부분적으로는 일치하는 정도로 참조로서 개별적으로 포함되기는 하지만, 이의 전문이 본원에서 참조로 포함된다 (예를 들어, 부분적으로 불일치하는 참고 문헌은 참고 문헌 중 부분적으로 불일치하는 부분을 제외하면, 참조로 인용됨).
- [0219] 본 명세서에서 언급된 모든 특허 및 공개 문헌은 본 개시내용이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자의 기술 수준을 나타낸다. 최신 기술을 언급하기 위해, 일부 경우에는 이의 출원일로서 나타내기 위해 본원에서 인용된 참고 문헌은 이의 전문이 본원에서 참조로 포함되며, 필요할 경우, 선행 기술인 구체적인 실시형태를 배제시키기 위해 (예를 들어, 부인하기 위해), 또는 본원 개시내용에 최신 기술의 방법 또는 물질을 구체적으로 포함시키지 않으면서, 상기 방법 또는 물질을 사용하기 위해 본원에서 상기 정보를 사용할 수 있는 것으로 한다. 예를 들어, 화합물을 주장할 때, 본원에 개시된 참고 문헌에서 (특히, 참조된 특허 문서에서) 개시된 특정 화합물을 포함한, 선행 기술에 공지된 화합물은 본 청구범위에 포함하지 않는 것으로 한다는 것을 이해하여야 한다.
- [0220] 본원에서 마쿠쉬(Markush) 군 또는 다른 군 분류가 사용될 때, 상기 군의 모든 개별 멤버 및 상기 군의 가능한 모든 조합 및 하위조합이 본 개시내용에 개별적으로 포함되는 것으로 한다.
- [0221] "포함한다(comprise)," "포함한다(comprises)," "포함된," 또는 "포함하는"이라는 용어가 본원에서 사용될 때, 하나 이상의 다른 특징, 정수, 단계, 성분, 또는 이의 군들의 존재 또는 부가를 배제하는 것이 아니라, 언급된 특징, 정수, 단계 또는 성분의 존재를 명시하는 것으로 해석되어야 한다. "포함하는," 또는 "포함한다(comprise(s)), " 또는 "포함된"이라는 용어가 임의적으로 문법상 유사한 용어, 예컨대, "구성된/구성된다(consist(s))" 또는 "본질적으로 구성된/본질적으로 구성된다"라는 용어로 대체됨으로써 반드시 동연적인 것은 아닌 추가의 실시형태를 기술하는 것인 본 개시내용의 별개의 실시형태 또한 포함하는 것으로 한다. 명확하게 하기 위해, 본원에서 사용되는바, "포함하는"이라는 것은 "가지는," "포함한(including)," "함유하는," 또는 "~을 특징으로 하는"이라는 것과 동의어로 사용되며, 포괄적이거나, 양단 개방형이며, 추가의 언급되지 않는 요소 또는 방법 단계를 배제시키지 않는다. 본원에서 사용되는바, "~로 구성된"이라는 것은 청구범위 요소에서 명시되지 않는 임의의 요소, 단계, 성분, 또는 구성 요소는 배제시킨다. 본원에서 사용되는바, "본질적으로 ~로 구성된"이라는 것은 특허범위의 기본적인 신규한 특징에 물질적으로 영향을 주지 않는 (예컨대, 활성 성분에 영향을 주지 않는) 물질 또는 단계는 배제시키지 않는다. 본원 각 경우에서, "포함하는," "본질적으로 ~로 구성된" 및 "~로 구성된"이라는 용어 중 임의의 것은 다른 두 용어 중 하나로 대체될 수 있다. 본원에서 예시적으로 기술된 개시내용은 본원에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들의 부재하에서도 적합하게 실시될 수 있다.
- [0222] 본 개시내용은 구체적이고, 바람직한 다양한 실시형태 및 기술을 참조로 하여 기술되었다. 그러나, 본 개시내용의 취지 및 범주 내에서 그대로 유지되면서, 많은 변형 및 수정이 이루어질 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 본원에서는 광범위하게 기술되었는바, 본원에서 구체적으로 기술된 것 이외의 조성물, 방법, 장치, 장치 요소, 물질, 임의적 특징, 방법 및 기술은 과도한 실험에 의존하지 않고도 본 개시내용을 실시하는 데 적용될 수 있다는 것을 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이해할 것이다. 본원에 기술된 조성물, 방법, 장치, 장치 요소, 물질, 방법 및 기술의 관련 기술분야에 공지된 모든 기능적 등가물; 및 이의 일부는 본 개시내용에 포함되는 것으로 한다. 범위가 개시될 때에는 언제나, 모든 하위범위 및 개별 값이 포함되는 것으로 한다. 본 개시내용을,

제한하는 것이 아니라, 일례 또는 예시로 제공된, 도면에 제시되거나, 또는 명세서에 예시된 것을 포함한, 개시된 실시형태로 제한하고자 하지 않는다. 본원에 제공된 일부 참고 문헌은 개시내용의 추가의 출발 물질, 추가의 합성 방법, 및 추가의 분석 방법 및 추가의 용도에 관한 상세한 설명을 제공하기 위하여 본원에 참조로 포함된다.

[0223] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 개시내용이 본 목적을 수행하고, 언급된 수단 및 이점 뿐만 아니라, 이의 고유한 것을 수득하는 데 잘 적합화될 수 있다는 것을 쉽게 이해할 것이다. 이에 바람직한 실시형태를 나타내는, 본원에 기술된 조성물 및 방법, 및 보조 방법은 예시적인 것이며, 본 개시내용의 범주를 제한하고자 하는 것이 아니다. 통상의 기술자는 그에 대한 변형 및 다른 용도를 생각할 수 있을 것이며, 이는 본 개시내용의 취지에 포함된다.

[0224] 참고 문헌

1. Addo M. M., Draenert R., Rathod A., Verrill C. L., Davis B. T., Gandhi R. T., Robbins G. K., Basgoz N. O., Stone D. R., Cohen D. E., Johnston M. N., Flynn T., Wurcel A. G., Rosenberg E. S., Altfeld M. and Walker B. D. (2007) Fully Differentiated HIV-1 Specific CD8+ T Effector Cells Are More Frequently Detectable in Controlled than in Progressive HIV-1 Infection. PLoS ONE 2, e321.
2. Aggen D. H., Chervin A. S., Insaidoo F. K., Piepenbrink K., H., Baker B. M. and Kranz D. M. (2011) Identification and engineering of human variable regions that

[0225]

allow expression of stable single-chain T cell receptors. Protein Engineering, Design, & Selection 24, 361-72.

3. Anikeeva N., Mareeva T., Liu W. and Sykulev Y. (2009) Can oligomeric T-cell receptor be used as a tool to detect viral peptide epitopes on infected cells? Clin Immunol 130, 98-109.
4. Armstrong K. M., Piepenbrink K. H. and Baker B. M. (2008) Conformational changes and flexibility in T-cell receptor recognition of peptide-MHC complexes. Biochem J 415, 183-96.
5. Ashfield R. and Jakobsen B. K. (2006) Making high-affinity T-cell receptors: a new class of targeted therapeutics. IDrugs 9, 554-9.
6. Bargou R., Leo E., Zugmaier G., Klinger M., Goebeler M., Knop S., Noppeney R., Viardot A., Hess G., Schuler M., Einsele H., Brandl C., Wolf A., Kirchinger P., Klappers P., Schmidt M., Riethmuller G., Reinhardt C., Baeuerle P. A. and Kufer P. (2008) Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. Science 321, 974-7.
7. Benatuil L., Perez J. M., Belk J. and Hsieh C. M. (2010) An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. Protein Eng Des Sel 23, 155-9.
8. Bird R. E., Hardman K. D., Jacobson J. W., Johnson S., Kaufman B. M., Lee S. M., Lee T., Pope S. H., Riordan G. S. and Whitlow M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. Science 242, 423-426.
9. Boder E. T. and Wittrup K. D. (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. Nat. Biotech. 15, 553-557.
10. Boder E. T. and Wittrup K. D. (2000) Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability. Methods Enzymol 328, 430-44.
11. Boon T. and Old L. J. (1997) Cancer tumor antigens. Curr Opin Immunol 9, 681-3.
12. Borbulevych O. Y., Santhanagopolan S. M., Hossain M. and Baker B. M. (2011) TCRs used in cancer gene therapy cross-react with MART-1/Melan-A tumor antigens via distinct mechanisms. J Immunol 187, 2453-63.
13. Brower V. (1997) Enbrel's phase III reinforces prospects in RA [news]. Nat Biotechnol 15, 1240.
14. Bulek A. M., Cole D. K., Skowera A., Dolton G., Gras S., Madura F., Fuller A., Miles J. J., Gostick E., Price D. A., Drijfhout J. W., Knight R. R., Huang G. C.,

- Lissin N., Molloy P. E., Wooldridge L., Jakobsen B. K., Rossjohn J., Peakman M., Rizkallah P. J. and Sewell A. K. (2012) Structural basis for the killing of human beta cells by CD8(+) T cells in type 1 diabetes. *Nat Immunol* 13, 283-9.
- 15.** Cheever M. A., Allison J. P., Ferris A. S., Finn O. J., Hastings B. M., Hecht T. T., Mellman I., Prindiville S. A., Viner J. L., Weiner L. M. and Matrisian L. M. (2009) The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 15, 5323-37.
- 16.** Chervin A. S., Aggen D. H., Raseman J. M. and Kranz D. M. (2008) Engineering higher affinity T cell receptors using a T cell display system. *J Immunol Methods* 339, 175-84.
- 17.** Chervin AS, Stone JD, Soto CM, Engels B, Schreiber H, Roy EJ, and Kranz DM. (2013) Design of T-cell receptor libraries with diverse binding properties to examine adoptive T-cell responses. *Gene Ther.* 20(6):634-44
- 18.** Colby D. W., Kellogg B. A., Graff C. P., Yeung Y. A., Swers J. S. and Wittrup K. D. (2004) Engineering antibody affinity by yeast surface display. *Methods Enzymol* 388, 348-58.
- 19.** Davis M. M. and Bjorkman P. J. (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402.
- 20.** Davis M. M., Boniface J. J., Reich Z., Lyons D., Hampl J., Arden B. and Chien Y. (1998) Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 523-544.
- 21.** Ding Y. H., Baker B. M., Garboczi D. N., Biddison W. E. and Wiley D. C. (1999) Four A6-TCR/peptide/HLA-A2 structures that generate very different T cell signals are nearly identical. *Immunity* 11, 45-56.
- 22.** Foote J. and Eisen H. N. (2000) Breaking the affinity ceiling for antibodies and T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10679-81.
- 23.** Garboczi D. N., Ghosh P., Utz U., Fan Q. R., Biddison W. E. and Wiley D. C. (1996) Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384, 134-141.
- 24.** Garcia K. C., Adams J. J., Feng D. and Ely L. K. (2009) The molecular basis of TCR germline bias for MHC is surprisingly simple. *Nat Immunol* 10, 143-7.
- 25.** Haidar J. N., Pierce B., Yu Y., Tong W., Li M. and Weng Z. (2009) Structure-based design of a T-cell receptor leads to nearly 100-fold improvement in binding affinity for pepMHC. *Proteins* 74, 948-60.

[0227]

- 26.** Harkiolaki M., Holmes S. L., Svendsen P., Gregersen J. W., Jensen L. T., McMahon R., Friese M. A., van Boxel G., Etzensperger R., Tzartos J. S., Kranc K., Sainsbury S., Harlos K., Mellins E. D., Palace J., Esiri M. M., van der Merwe P. A., Jones E. Y. and Fugger L. (2009) T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity* 30, 348-57.
- 27.** Hawse W. F., Champion M. M., Joyce M. V., Hellman L. M., Hossain M., Ryan V., Pierce B. G., Weng Z. and Baker B. M. (2012) Cutting edge: evidence for a dynamically driven T cell signaling mechanism. *J Immunol* 188, 5819-23.
- 28.** Holler P. D., Chlewicki L. K. and Kranz D. M. (2003) TCRs with high affinity for foreign pMHC show self-reactivity. *Nat Immunol* 4, 55-62.
- 29.** Holler P. D., Holman P. O., Shusta E. V., O'Herrin S., Wittrup K. D. and Kranz D. M. (2000) In vitro evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5387-92.
- 30.** Holliger P., Prospero T. and Winter G. (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6444-8.
- 31.** Hoogenboom H. R. (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 23, 1105-16.
- 32.** Jarvis L. M. (2012) Rethinking Antibody-Drug Conjugates. Chemical and Engineering News 90, 12-18.
- 33.** Kessels H. W., van Den Boom M. D., Spits H., Hooijberg E. and Schumacher T. N. (2000) Changing T cell specificity by retroviral T cell receptor display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14578-83.
- 34.** Kieke M. C., Shusta E. V., Boder E. T., Teyton L., Wittrup K. D. and Kranz D. M. (1999) Selection of functional T cell receptor mutants from a yeast surface-display library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5651-6.
- 35.** Lauck F., Smith C. A., Friedland G. F., Humphris E. L. and Kortemme T. (2010) RosettaBackrub--a web server for flexible backbone protein structure modeling and design. *Nucleic Acids Res* 38, W569-75.
- 36.** Li Y., Moysey R., Molloy P. E., Vuidepot A. L., Mahon T., Baston E., Dunn S., Liddy N., Jacob J., Jakobsen B. K. and Boulter J. M. (2005) Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display. *Nat Biotechnol* 23, 349-54.
- 37.** Liddy N., Bossi G., Adams K. J., Lissina A., Mahon T. M., Hassan N. J., Gavarret J., Bianchi F. C., Pumphrey N. J., Ladell K., Gostick E., Sewell A. K., Lissin

N. M., Harwood N. E., Molloy P. E., Li Y., Cameron B. J., Sami M., Baston E. E., Todorov P. T., Paston S. J., Dennis R. E., Harper J. V., Dunn S. M., Ashfield R., Johnson A., McGrath Y., Plesa G., June C. H., Kalos M., Price D. A., Vuidepot A., Williams D. D., Sutton D. H. and Jakobsen B. K. (2012) Monoclonal TCR-redirected tumor cell killing. *Nat Med.*

38. Litvak-Greenfeld D. and Benhar I. (2012) Risks and untoward toxicities of antibody-based immunoconjugates. *Adv Drug Deliv Rev.*

39. Manning T. C. and Kranz D. M. (1999) Binding energetics of T-cell receptors: correlation with immunological consequences. *Immunology Today* 20, 417-422.

40. Marrack P., Scott-Browne J. P., Dai S., Gapin L. and Kappler J. W. (2008) Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annu Rev Immunol* 26, 171-203.

41. Marsh S. G. E., Parham P. and Barber L. D. (2000) *The HLA Facts Book*. Academic Press, London.

42. Mason D. (1998) A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T- cell receptor. *Immunol Today* 19, 395-404.

43. Miller B. R., Demarest S. J., Lugovskoy A., Huang F., Wu X., Snyder W. B., Croner L. J., Wang N., Amatucci A., Michaelson J. S. and Glaser S. M. (2010) Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies. *Protein Eng Des Sel* 23, 549-57.

44. Molloy P. E., Sewell A. K. and Jakobsen B. K. (2005) Soluble T cell receptors: novel immunotherapies. *Curr Opin Pharmacol* 5, 438-43.

45. Murphy K. (2012) *Janeway's immunobiology*. Garland Science, New York.

46. Nold M. F., Nold-Petry C. A., Zepp J. A., Palmer B. E., Bufler P. and Dinarello C. A. (2010) IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol* 11, 1014-22.

47. Pastan I., Hassan R., Fitzgerald D. J. and Kreitman R. J. (2006) Immunotoxin therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 559-65.

48. Pierce B. G., Haidar J. N., Yu Y. and Weng Z. (2010) Combinations of affinity-enhancing mutations in a T cell receptor reveal highly nonadditive effects within and between complementarity determining regions and chains. *Biochemistry* 49, 7050-9.

- 49.** Porter D. L., Levine B. L., Kalos M., Bagg A. and June C. H. (2011) Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 365, 725-33.
- 50.** Reichert J. M. and Valge-Archer V. E. (2007) Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6, 349-56.
- 51.** Ricart A. D. and Tolcher A. W. (2007) Technology insight: cytotoxic drug immunoconjugates for cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 4, 245-55.
- 52.** Richman S. A., Aggen D. H., Dossett M. L., Donermeyer D. L., Allen P. M., Greenberg P. D. and Kranz D. M. (2009) Structural features of T cell receptor variable regions that enhance domain stability and enable expression as single-chain ValphaVbeta fragments. *Mol Immunol* 46, 902-16.
- 53.** Richman S. A. and Kranz D. M. (2007) Display, engineering, and applications of antigen-specific T cell receptors. *Biomol Eng* 24, 361-73.
- 54.** Rock K. L. and Goldberg A. L. (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I- presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17, 739-79.
- 55.** Rudolph M. G., Stanfield R. L. and Wilson I. A. (2006) How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24, 419-66.
- 56.** Sadelain M., Brentjens R. and Riviere I. (2009) The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol* 21, 215-23.
- 57.** Sami M., Rizkallah P. J., Dunn S., Molloy P., Moysey R., Vuidepot A., Baston E., Todorov P., Li Y., Gao F., Boulter J. M. and Jakobsen B. K. (2007) Crystal structures of high affinity human T-cell receptors bound to peptide major histocompatibility complex reveal native diagonal binding geometry. *Protein Eng Des Sel* 20, 397-403.
- 58.** Schrama D., Reisfeld R. A. and Becker J. C. (2006) Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 5, 147-59.
- 59.** Scott J. K. and Smith G. P. (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249, 386-90.
- 60.** Skowera A., Ellis R. J., Varela-Calvino R., Arif S., Huang G. C., Van-Krinks C., Zaremba A., Rackham C., Allen J. S., Tree T. I., Zhao M., Dayan C. M., Sewell A. K., Unger W. W., Drijfhout J. W., Ossendorp F., Roep B. O. and Peakman M. (2008) CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope. *J Clin Invest* 118, 3390-402.

[0230]

- 61.** Smith C. A. and Kortemme T. (2008) Backrub-like backbone simulation recapitulates natural protein conformational variability and improves mutant side-chain prediction. *J Mol Biol* 380, 742-56.
- 62.** Soo Hoo W. F., Lacy M. J., Denzin L. K., Voss E. W. J., Hardman K. D. and Kranz D. M. (1992) Characterization of a single-chain T cell receptor expressed in E. Coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 4759-4763.
- 63.** Starr T. K., Jameson S. C. and Hogquist K. A. (2003) Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139-76.
- 64.** Starwalt S. E., Masteller E. L., Bluestone J. A. and Kranz D. M. (2003) Directed evolution of a single-chain class II MHC product by yeast display. *Protein Eng* 16, 147-56.
- 65.** Stone J. D., Chervin A. S., Aggen D. H. and Kranz D. M. (2012) T cell receptor engineering. *Methods Enzymol* 503, 189-222.
- 66.** Stone J. D., Yin Y., Mo M., Weber K. S., Donermeyer D. L., Allen P. M., Mariuzza R. A. and Kranz D. M. (2012) Engineering High-Affinity T Cell Receptor/Cytokine Fusions for Therapeutic Targeting. In *Protein Engineering* (Edited by Kaumaya P.). InTech.
- 67.** Stroncek D. F., Berger C., Cheever M. A., Childs R. W., Dudley M. E., Flynn P., Gattinoni L., Heath J. R., Kalos M., Marincola F. M., Miller J. S., Mostoslavsky G., Powell D. J., Jr., Rao M., Restifo N. P., Rosenberg S. A., O'Shea J. and Melief C. J. (2012) New directions in cellular therapy of cancer: a summary of the summit on cellular therapy for cancer. *J Transl Med* 10, 48.
- 68.** Swers J. S., Kellogg B. A. and Wittrup K. D. (2004) Shuffled antibody libraries created by *in vivo* homologous recombination and yeast surface display. *Nucleic Acids Res* 32, e36.
- 69.** Tayal V. and Kalra B. S. (2008) Cytokines and anti-cytokines as therapeutics--an update. *Eur J Pharmacol* 579, 1-12.
- 70.** Thakur A. and Lum L. G. (2010) Cancer therapy with bispecific antibodies: Clinical experience. *Curr Opin Mol Ther* 12, 340-9.
- 71.** Tonegawa S. (1988) Nobel lecture in physiology or medicine--1987. Somatic generation of immune diversity. *In Vitro Cell Dev Biol* 24, 253-65.
- 72.** Tsomides T. J., Aldovini A., Johnson R. P., Walker B. D., Young R. A. and Eisen H. N. (1994) Naturally processed viral peptides recognized by cytotoxic T

lymphocytes on cells chronically infected by human immunodeficiency virus type 1. J Exp Med 180, 1283-93.

73. Turner D. J., Ritter M. A. and George A. J. (1997) Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments: optimisation of peptide sequence using phage display technology. J Immunol Methods 205, 43-54.

74. Utz U., Banks D., Jacobson S. and Biddison W. E. (1996) Analysis of the T-cell receptor repertoire of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes from patients with HTLV-1-associated disease: evidence for oligoclonal expansion. J Virol 70, 843-51.

75. Varela-Rohena A., Molloy P. E., Dunn S. M., Li Y., Suhoski M. M., Carroll R. G., Milicic A., Mahon T., Sutton D. H., Laugel B., Moysey R., Cameron B. J., Vuidepot A., Purphoo M. A., Cole D. K., Phillips R. E., June C. H., Jakobsen B. K., Sewell A. K. and Riley J. L. (2008) Control of HIV-1 immune escape by CD8 T cells expressing enhanced T-cell receptor. Nat Med 14, 1390-5.

76. Weber K. S., Donermeyer D. L., Allen P. M. and Kranz D. M. (2005) Class II-restricted T cell receptor engineered in vitro for higher affinity retains peptide specificity and function. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 19033-8.

77. Wong R. L., Liu B., Zhu X., You L., Kong L., Han K. P., Lee H. I., Chavaillaz P. A., Jin M., Wang Y., Rhode P. R. and Wong H. C. (2011) Interleukin-15:Interleukin-15 receptor alpha scaffold for creation of multivalent targeted immune molecules. Protein Eng Des Sel 24, 373-83.

[0232]

미국 특허

[0234]

제7,569,357호; 출원일: 2004년 2월 20일; 등록일: 2009년 8월 4일; 출원인: 보드 오브 트러스티즈 유니버시티 오브 일리노이(Board of Trustees University of Illinois). 발명의 명칭: High affinity TCR proteins and methods.

[0235]

제7,465,787호; 출원일: 2003년 12월 16일; 등록일: 2008년 12월 16일; 출원인: 보드 오브 트러스티즈 유니버시티 오브 일리노이. 발명의 명칭: Yeast cell surface display of proteins and uses thereof.

[0236]

제6,759,243호; 출원일: 2000년 12월 6일; 등록일: 2004년 7월 6일; 출원인: 보드 오브 트러스티즈 유니버시티 오브 일리노이. 발명의 명칭: High affinity TCR proteins and methods.

[0237]

제6,699,658호; 출원일: 1998년 1월 20일; 등록일: 2004년 3월 2일; 출원인: 보드 오브 트러스티즈 유니버시티 오브 일리노이. 발명의 명칭: Yeast cell surface display of proteins and uses thereof.

[0238]

제6,696,251호; 출원일: 2000년 11월 28일; 등록일: 2004년 2월 24일; 출원인: 보드 오브 트러스티즈 유니버시티 오브 일리노이. 발명의 명칭: Yeast cell surface display of proteins and uses thereof.

[0239]

제6,423,538호; 출원일: 2000년 11월 28일; 등록일: 2002년 7월 23일; 출원인: 보드 오브 트러스티즈 유니버시티 오브 일리노이. 발명의 명칭: Yeast cell surface display of proteins and uses thereof.

[0240]

제6,300,065호; 출원일: 1998년 8월 26일; 등록일: 2001년 10월 9일; 출원인: 보드 오브 트러스티즈 유니버시티 오브 일리노이. 발명의 명칭: Yeast cell surface display of proteins and uses thereof.

[0241]

제8,143,376호; 출원일: 2005년 5월 18일; 등록일: 2012년 3월 27일; 출원인: 이뮤노코어 리미티드(Immunocore Limited); 발명의 명칭: High affinity NY-ESO T cell receptor.

[0242]

제8,088,379호; 출원일: 2007년 9월 26일; 등록일: 2012년 1월 3일; 출원인: 이뮤노코어 리미티드; 발명의

명칭: Modified T cell receptors and related materials and methods.

[0243] 제8,017,730호; 출원일: 2006년 5월 19일; 등록일: 2011년 9월 13일; 출원인: 이뮤노코어 리미티드; 발명의 명칭: T cell receptors which bind to VYGFVRACL-HLA-A24.

[0244] 제7,763,718호; 출원일: 2007년 10월 29일; 등록일: 2010년 7월 27일; 출원인: 이뮤노코어 리미티드; 발명의 명칭: Soluble T cell receptors.

[0245] 제7,666,604호; 출원일: 2003년 7월 9일; 등록일: 2010년 2월 23일; 출원인: 이뮤노코어 리미티드; 발명의 명칭: Modified soluble T cell receptor.

[0246] 제7,608,410호; 출원일: 2008년 10월 7일; 등록일: 2009년 10월 27일; 출원인: 이뮤노코어 리미티드; 발명의 명칭: Method of improving T cell receptors.

[0247] 제7,569,664호; 출원일: 2003년 10월 3일; 등록일: 2009년 8월 4일; 출원인: 이뮤노코어 리미티드; 발명의 명칭: Single chain recombinant T cell receptors.

[0248] 제8,105,830호; 출원일: 2002년 11월 5일; 등록일: 2012년 1월 31일; 출원인: 알토 바이오사이언스 코포레이션 (Altor Bioscience Corporation); 발명의 명칭: Polyspecific binding molecules and uses thereof.

[0249] 제6,534,633호; 출원일: 1999년 10월 21일; 2003년 3월 18일; 출원인: 알토 바이오사이언스 코포레이션; 발명의 명칭: Polyspecific binding molecules and uses thereof.

도면

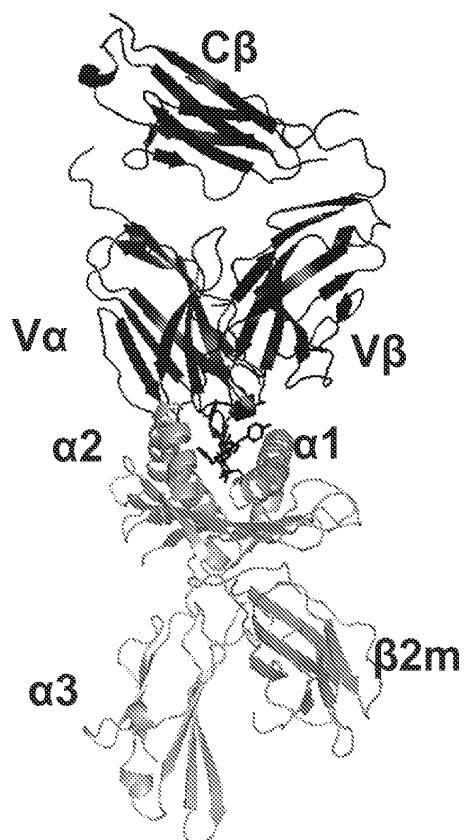
도면1

三

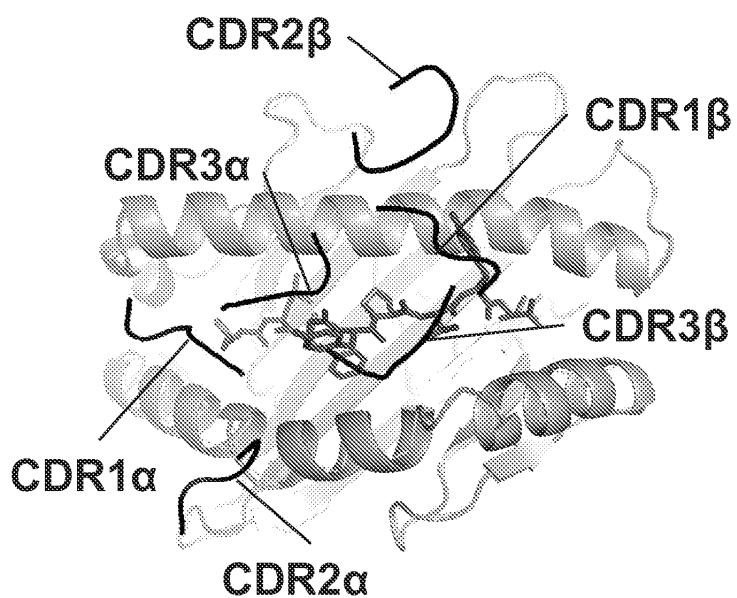
48

9 (계속)

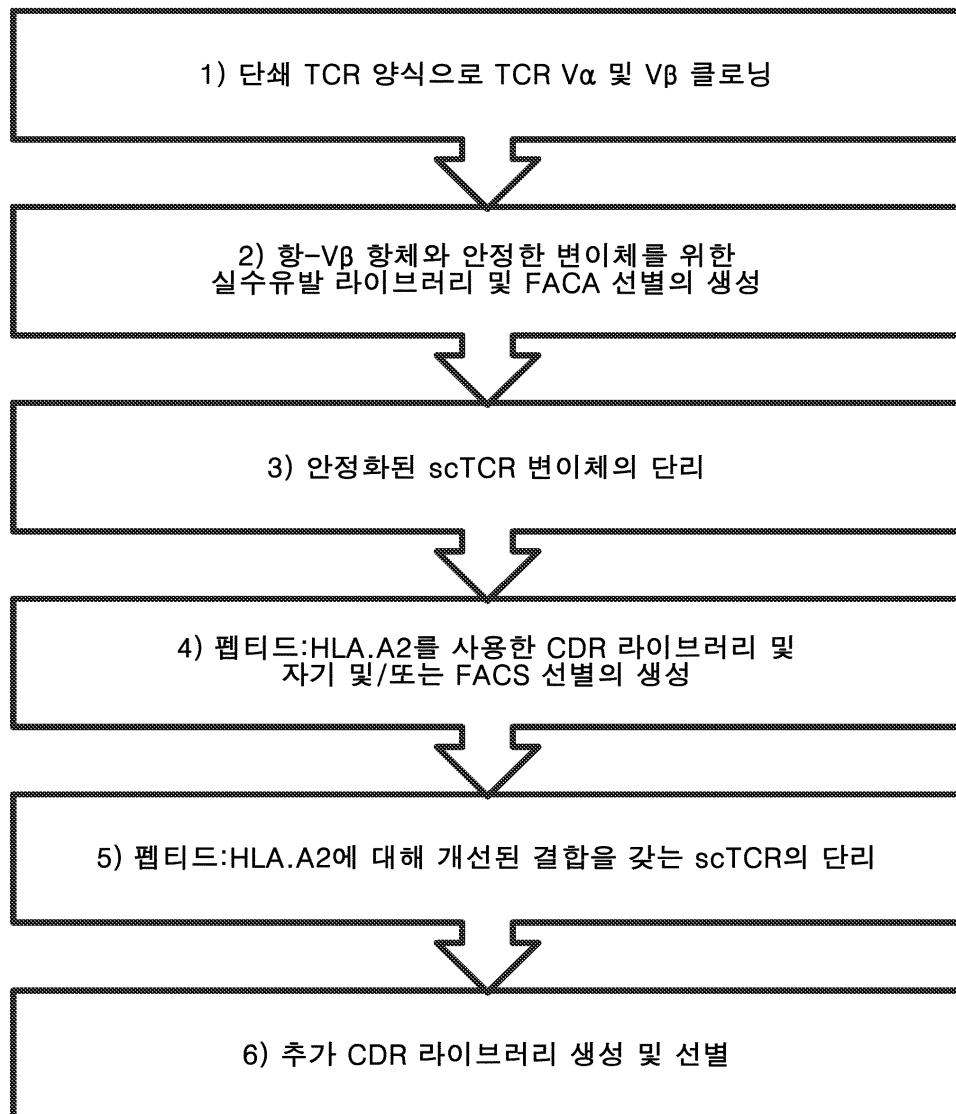
도면2a



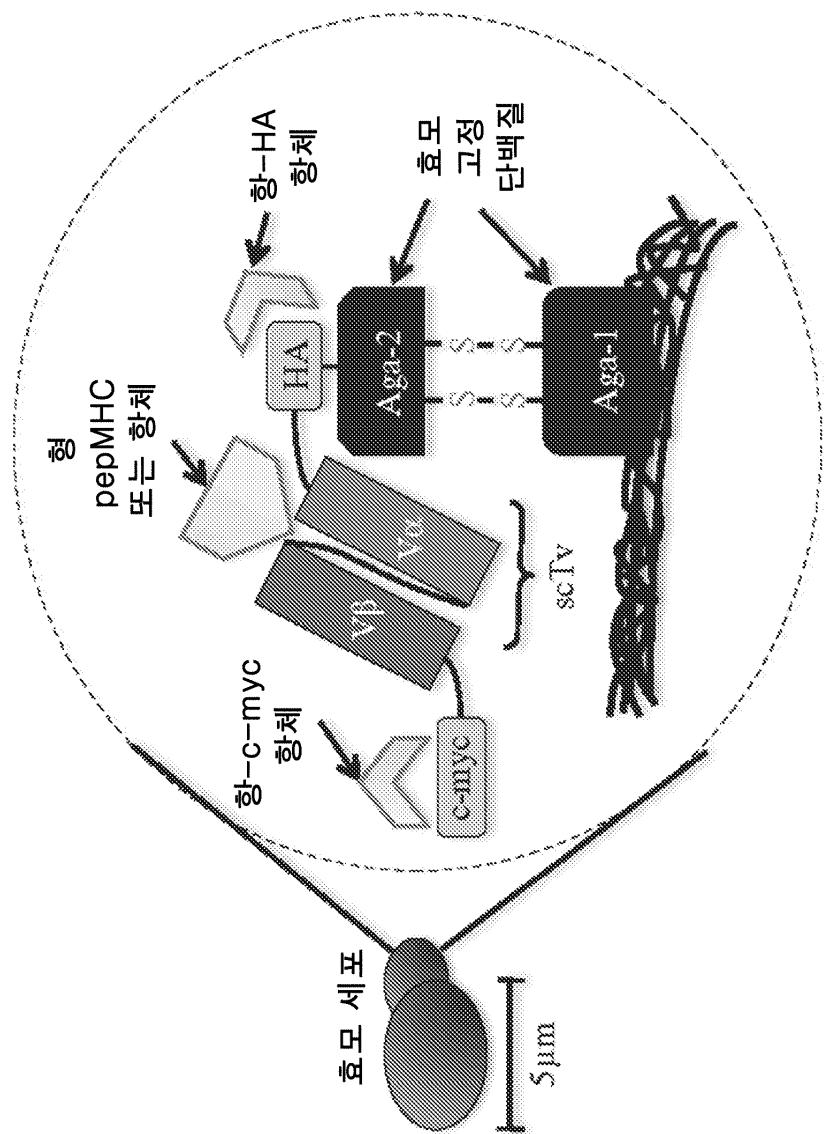
도면2b



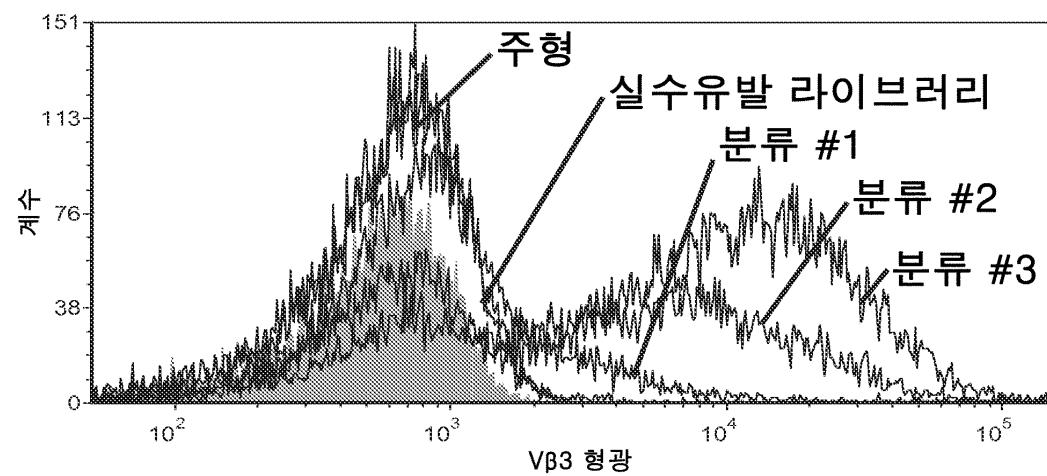
도면3



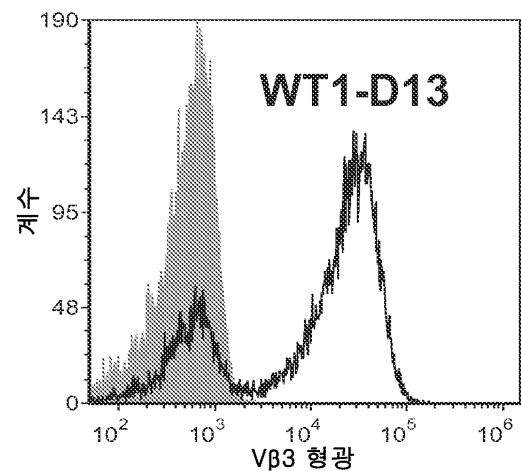
도면4



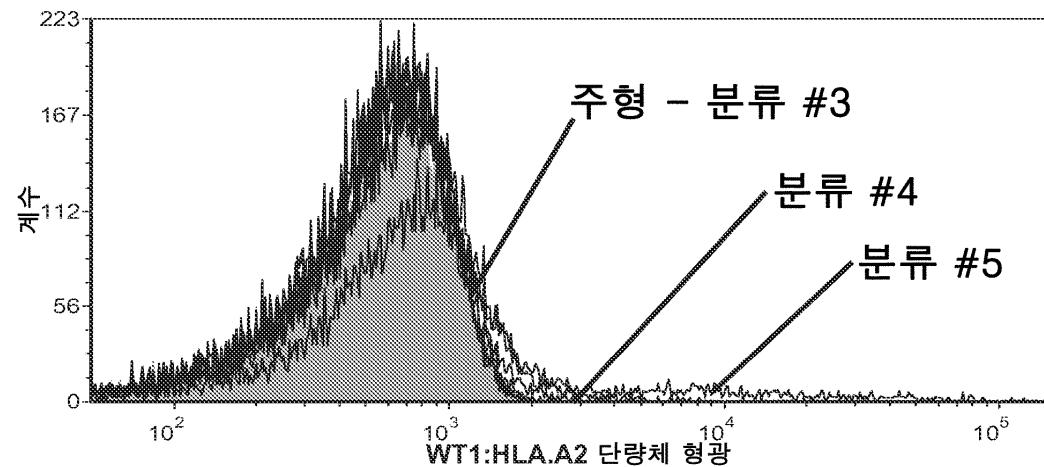
도면5a



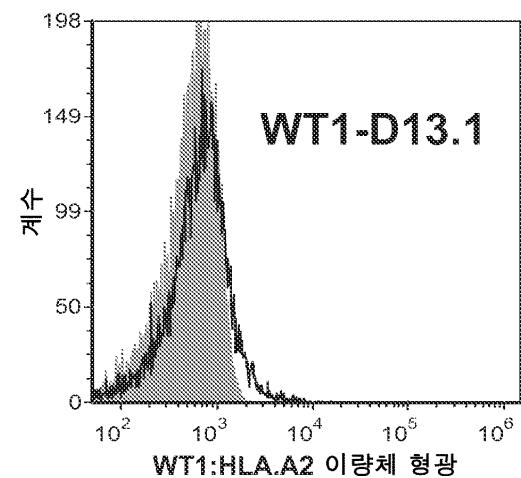
도면5b



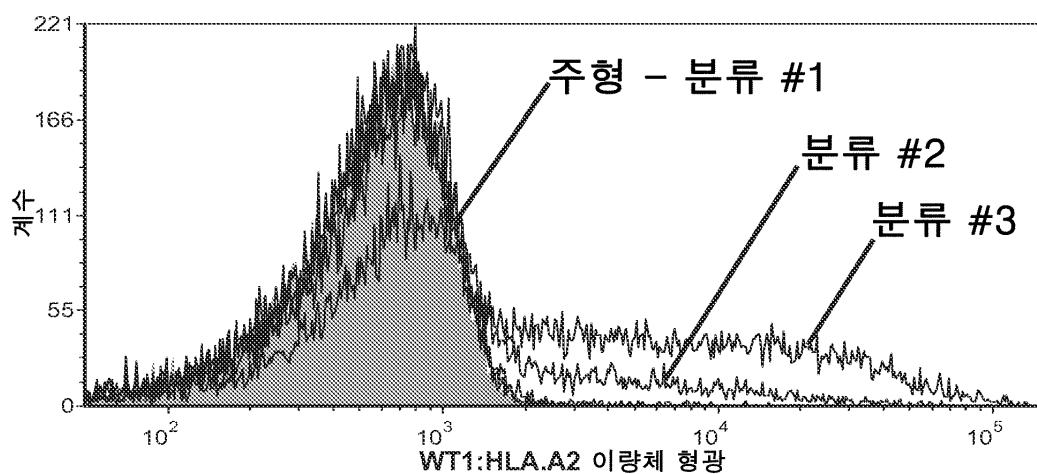
도면6a



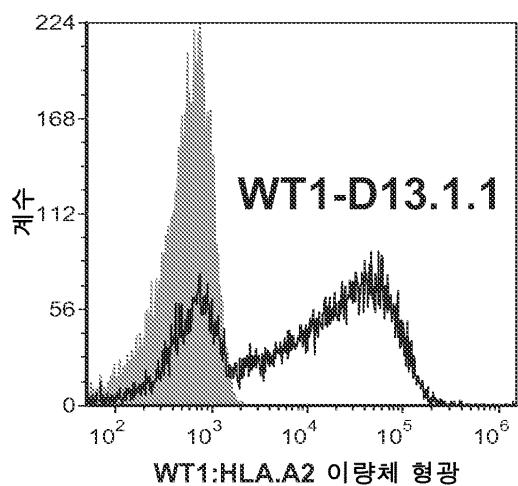
도면6b



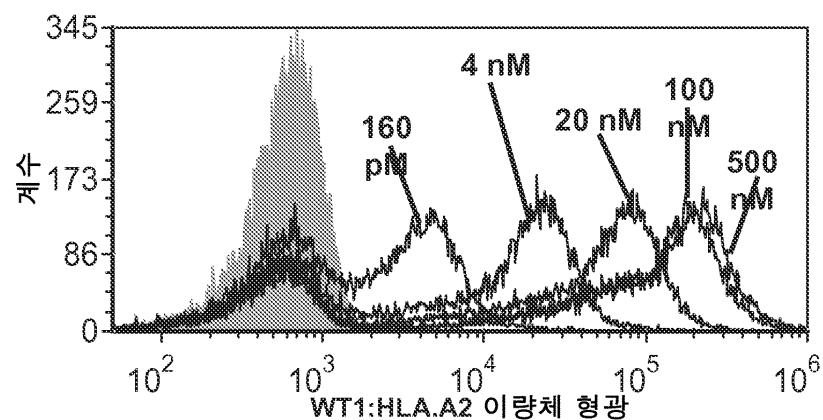
도면7a



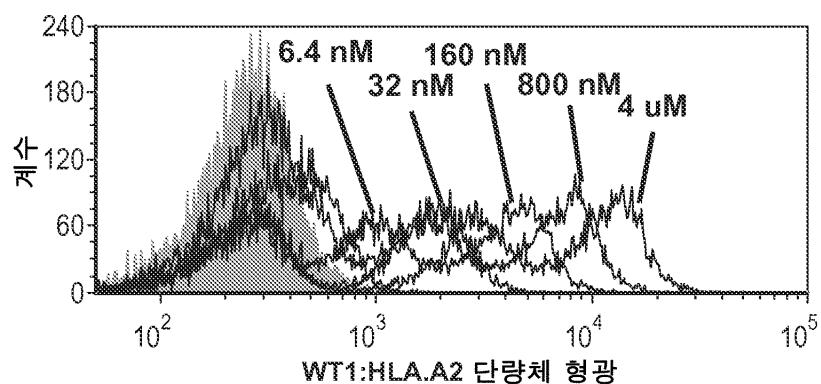
도면7b



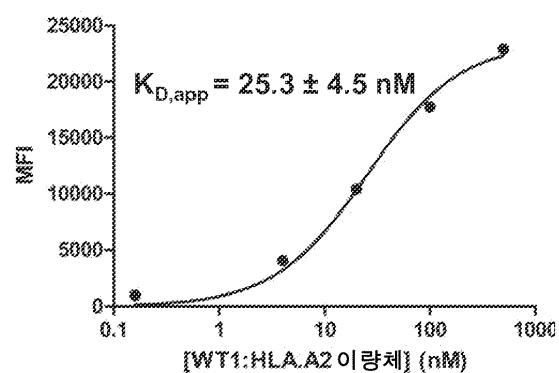
도면8a



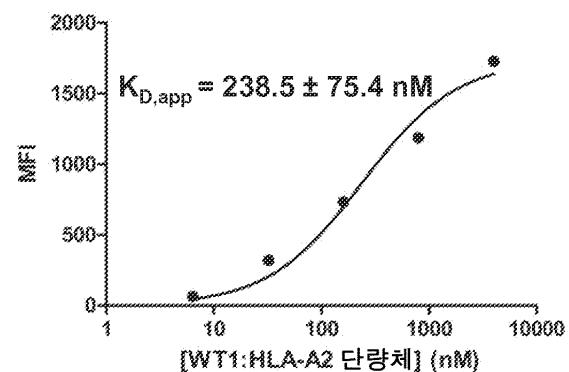
도면8b



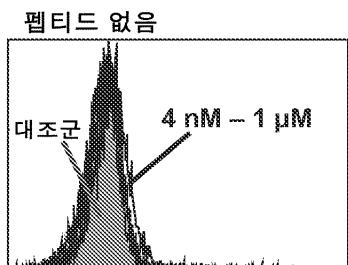
도면8c



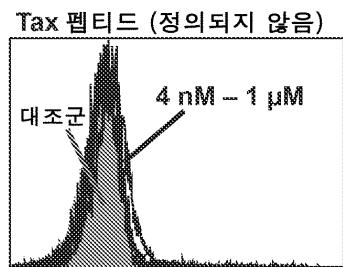
도면8d



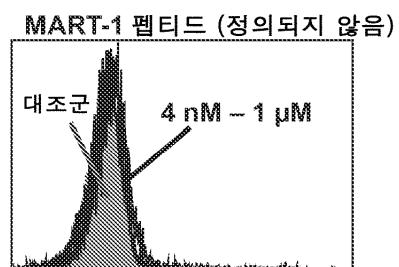
도면9a



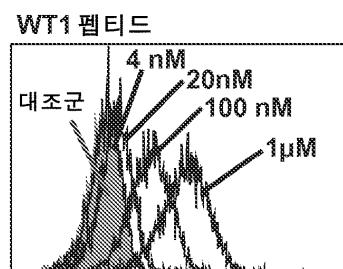
도면9b



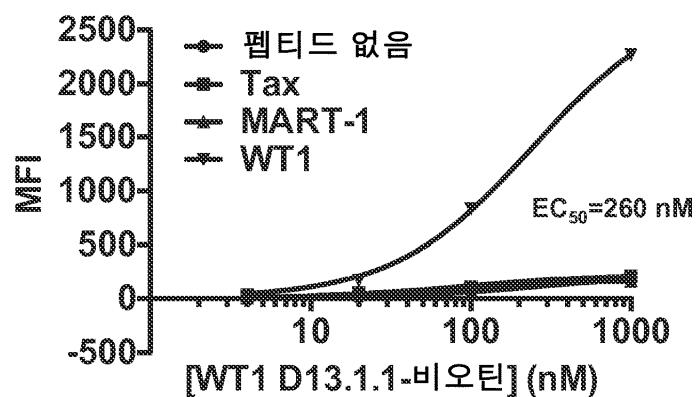
도면9c



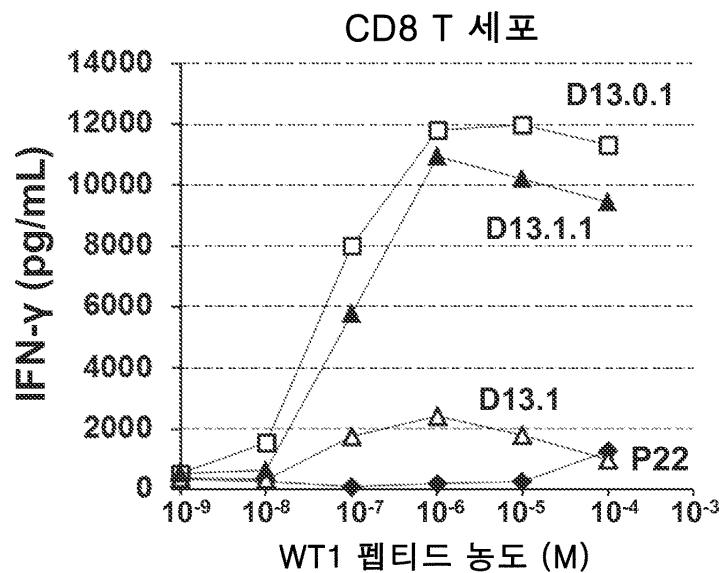
도면9d



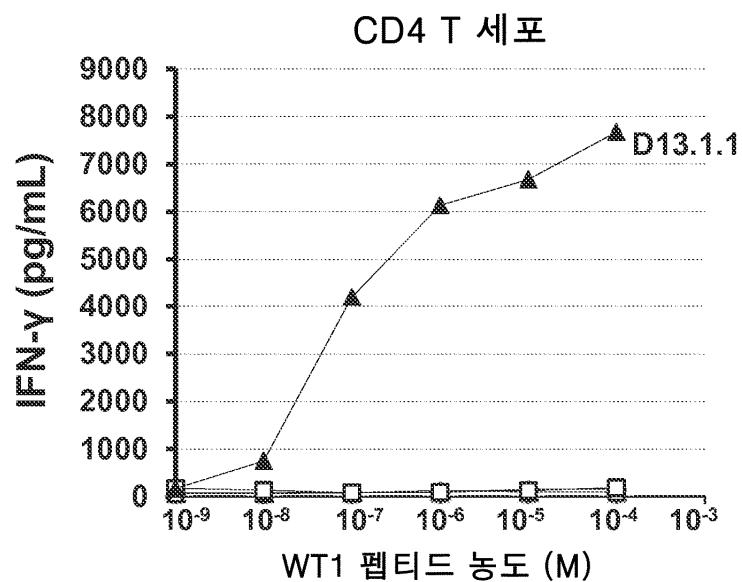
도면9e



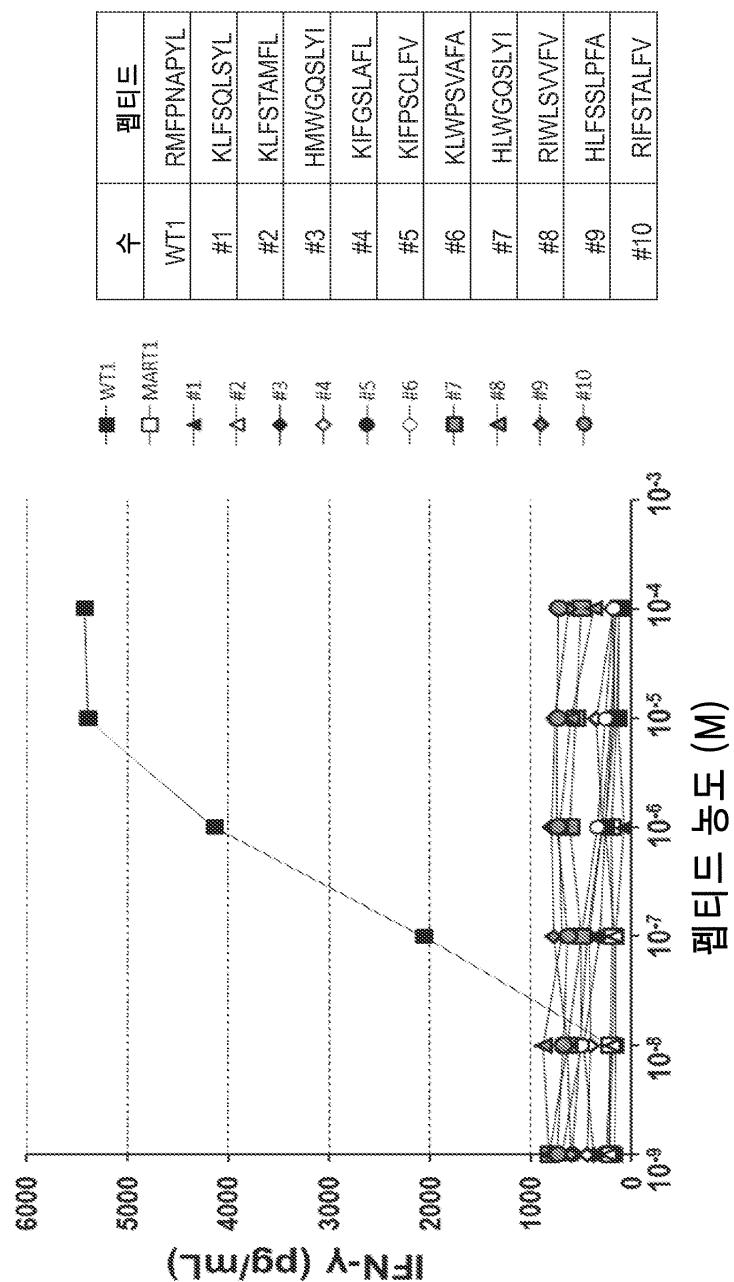
도면10a



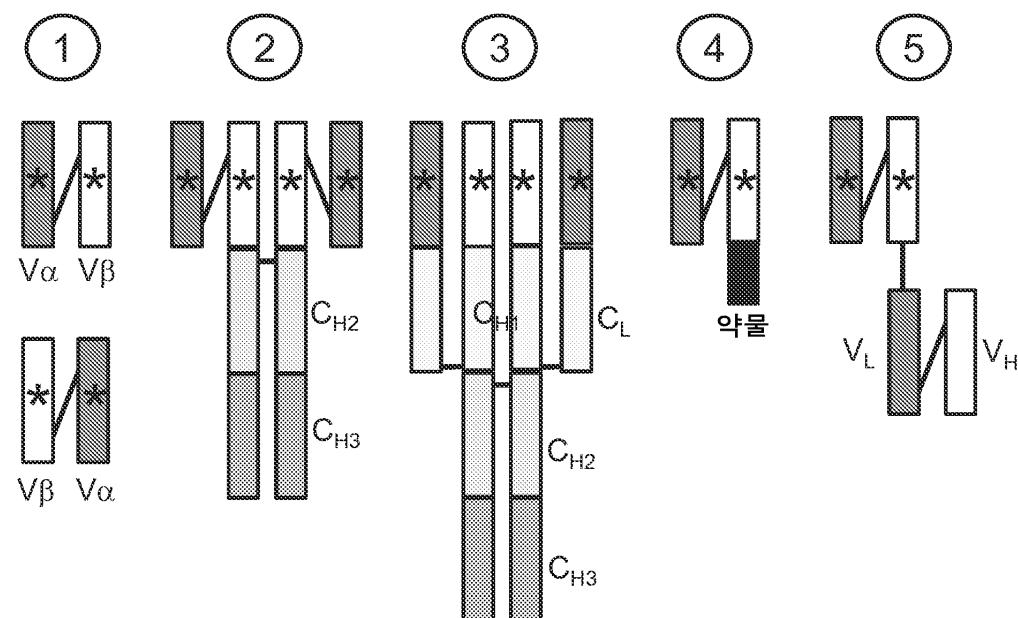
도면10b



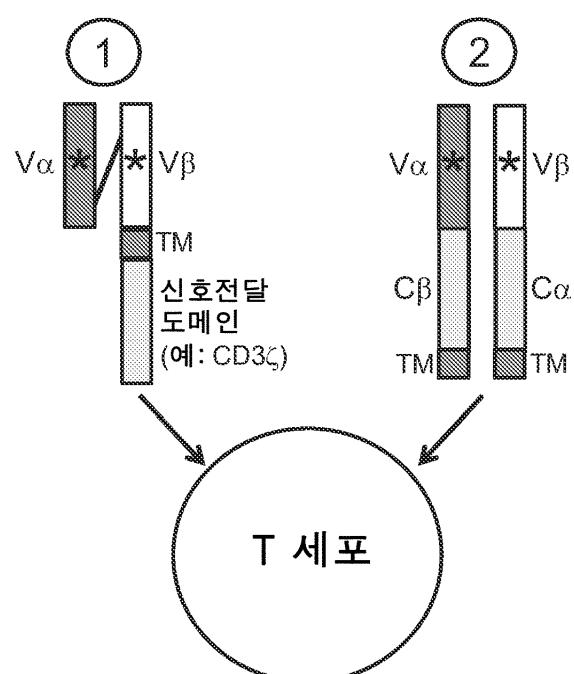
도면11



도면12a



도면12b



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Board of Trustees of the University of Illinois

Fred Hutchinson Cancer Research Center

<120> ENGINEERED HIGH-AFFINITY HUMAN T CELL RECEPTORS

<130> IPA160473-US

<150> US 61/907,887

<151> 2013-11-22

<160> 34

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met

20	25	30
----	----	----

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

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

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

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

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

Leu Lys Asn

115

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Val Ser Gln Ser

20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met

35 40 45

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Asn Asn Ala Gly Asn

85 90 95

Met Leu Thr Phe Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile

100 105 110

<210> 3

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified variable beta region of the TCR with high affinity to

WT1/HLA-A2

<400> 3

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Lys Asn

115

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified variable alpha region of the TCR with high affinity to
WT1/HLA-A2

<400> 4

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

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

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Asp Leu Gly Ser

20	25	30	35
----	----	----	----

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met

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

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Asn Asn Ala Gly Asn

85	90	95
----	----	----

Met Leu Thr Phe Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile

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

<210> 5

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Single-chain TCR that binds with high-affinity to WT1/HLA-A2

<400> 5

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

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

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Lys Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys

115 120 125

Asp Gly Lys Ser Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser

130 135 140

Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg

180 185 190

Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile

195 200 205

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

210 215 220

Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Thr Arg Leu Met Val

225 230 235 240

Lys Pro His Ile

<210> 6

<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5
<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Human T cell lymphotrophic virus
<400> 7
Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val

1 5
<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Amino acid linker sequence
<400> 8

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 9
<211> 24
<212>
DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer Splice 4L
<400> 9

ggcagccccca taaacacaca gtat 24

<210> 10
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer used to generate the WT1-D13 CDR1alpha library

<400> 10

acgatcgcta taggtgcagt tcaatgatgc aatagcacct tccggacac ttaatggcc 60

gct 63

<210> 11

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer used to generate the WT1-D13 CDR1alpha library

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(35)

<223> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(38)

<223> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(41)

<223> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(44)

<223> n = any base

<400> 11

attgcatcat tgaactgcac ctatagcgat cgttnsnnsn nsnnsttctt ttggatataga 60

cagtacagt g caaatcccc g 81

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer T7

<400> 12

taatacgact cactataggg 20

<210> 13

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer used to generate the WT1-D13.1 CDR3 betal library

<400> 13

tgcacacagg tacatggaag tttgatttgtt actagcgctt tccagaatca aactgaaacg	60
--	----

ttcttt

66

<210> 14

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer used to generate the WT1-D13.1 CDR3 betal library

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(35)

<223> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(38)

<223> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(41)

<223> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(44)

<223>

> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(47)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 14

agtaccaatc aaactccat gtacctgtgt gcannsnnsn nsnnnsnsga acagttttc	60
---	----

ggcccaggtt caagattaac ggtg	84
----------------------------	----

<210> 15

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer used to generate the WT1-D13.1 CDR3 beta2 library

<400> 15

tgcacacagg tacatggaag tttgatttgtt actagcgctt tccagaatca aactgaaacg 60

ttcttt 66

<210> 16

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer used to generate the WT1-D13.1 CDR3 beta2 library

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(47)

<223> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (49)..(50)

<223> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (52)..(53)

<223> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (55)..(56)

<223

> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (58)..(59)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 16

agtaccaatc aaacttccat gtacctgtgt gcaaggcgtt ccatcnnsnn snnsnnsnns 60

ggcccaggta caagattaac ggtg 84

<210> 17

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer used to generate the WT1-D13.1 CDR3 alpha1

library

<400> 17

ggcgacagg taagtggcgc tatctgacgg ttggctatca cggttaaca gagagacata 60

ctggga 66

<210> 18

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer used to generate the WT1-D13.1 CDR3 alpha1 library

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(35)

<223> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(38)

<223> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(41)

<223> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(44)

<223

> n = any base

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(47)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 18

caaccgtcag atagcgccac ttacctgtgc gccnnnsnnsn nsnnnsnsaa tatgctgacc 60

ttcgggtggcg gtactcgctt aatg 84

<210> 19

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer used to generate the WT1-D13.1 CDR3 alpha2

library

<400> 19

ggcacagg taagtggcgc tatctgacgg ttggctatca cggattaaca gagagacata	60
ctggga	66
<210> 20	
<211> 84	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward primer used to generate the WT1-D13.1 CDR3 alpha2 library	
<220><221> misc_feature	
<222> (46)..(47)	
<223> n = any base	
<220><221> misc_feature	
<222> (49)..(50)	
<223> n = any base	
<220><221> misc_feature	
<222> (52)..(53)	
<223> n = any base	
<220><221> misc_feature	
<222> (55)..(56)	
<223> n = any base	
<220><221> misc_feature	
<222> (58)..(59)	
<223> n is a, c, g, or t	
<400> 20	
caaccgtcag atagcgccac ttacctgtgc gccgcgaata acgcgnnsnn snnsnnsnns	60
ttcgtggcg gtactcgctt aatg	84
<210> 21	
<211> 115	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modified variable beta region of the TCR with high affinity to	
WT1/HLA-A2	
<400> 21	

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Lys Asn

115

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified variable alpha region of the TCR with high affinity to

WT1/HLA-A2

<400> 22

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

1 5 10 15

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Val Ser Gln Pro

20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met

35 40 45

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln

50 55 60

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Asn Asn Ala Gly Asn

85	90	95
----	----	----

Met Leu Thr Phe Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile

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

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Influenza A

<400> 23

Ala Ser Asn Glu Asn Met Asp Ala Met

1	5	
---	---	--

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Influenza A

<400> 24

Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met

1	5	
---	---	--

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT1 structurally similar human peptide

<400> 25

Lys Leu Phe Ser Gln Leu Ser Tyr Leu

1	5	
---	---	--

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT1 structurally similar human peptide

<400> 26

Lys Leu Phe Ser Thr Ala Met Phe Leu

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT1 structurally similar human peptide

<400> 27

His Met Trp Gly Gln Ser Leu Tyr Ile

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT1 structurally similar human peptide

<400> 28

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT1 structurally similar human peptide

<400> 29

Lys Ile Phe Pro Ser Cys Leu Phe Val

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT1 structurally similar human peptide

<400> 30

Lys Leu Trp Pro Ser Val Ala Phe Ala

1 5
<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> WT1 structurally similar human peptide
<400> 31
His Leu Trp Gly Gln Ser Leu Tyr Ile

1 5
<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> WT1 structurally similar human peptide
<400> 32
Arg Ile Trp Leu Ser Val Val Phe Val

1 5
<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> WT1 structurally similar human peptide
<400> 33

His Leu Phe Ser Ser Leu Pro Phe Ala

1 5
<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> WT1 structurally similar human peptide
<400> 34

Arg Ile Phe Ser Thr Ala Leu Phe Val

1 5