



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월15일
(11) 등록번호 10-2793492
(24) 등록일자 2025년04월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7010945
- (22) 출원일자(국제) 2018년11월05일
심사청구일자 2021년11월03일
- (85) 번역문제출일자 2020년04월16일
- (65) 공개번호 10-2020-0074111
- (43) 공개일자 2020년06월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/080176
- (87) 국제공개번호 WO 2019/086665
국제공개일자 2019년05월09일
- (30) 우선권주장
10 2017 125 888.4 2017년11월06일 독일(DE)
62/582,202 2017년11월06일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020197006315 A
WO2011113819 A1

- (73) 특허권자
이매텍스 바이오테크놀로지스 게엠베하
독일 72076 투빈겐 파울-울리히-스트라세 15
- (72) 발명자
운베르도르벤 펠릭스
독일 70199 스투트가르트 피링거스트라세 157
봉크 세바스티안
독일 72074 튀빙겐 게르트루트-보이머-스트라세 19/1
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 18 항

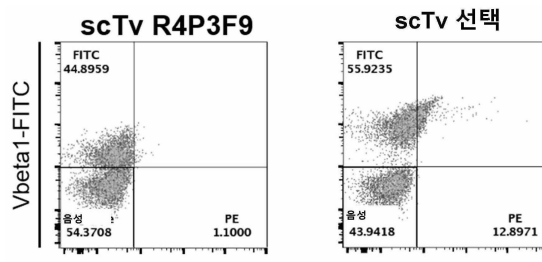
심사관 : 이미경

(54) 발명의 명칭 신규 조작된 T 세포 수용체 및 이를 사용하는 면역 요법

(57) 요약

본 발명은 COL6A3 항원에 대한 항원 인식 구조체에 관한 것이다. 본 발명은 특히 종양 발현 항원 COL6A3에 대해 선택적이고 특이적인, 신규 조작된 T 세포 수용체(TCR) 기반의 분자를 제공한다. 본 발명의 TCR 및 그로부터 유래하는 COL6A3 항원 결합 단편은 암 질환을 발현하는 COL6A3의 진단, 치료 및 예방에 유용하다. 본 발명의 항원 인식 구조체를 인코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 항원 인식 구조체를 발현하는 재조합 세포 및 본 발명의 화합물을 포함하는 약학적 조성물이 추가로 제공된다.

대표도 - 도1



HLA-A*02/COL6A3-002 사합체-PE

(52) CPC특허분류

C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/2833 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/32 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

호프만 마르틴

독일 72076 튀빙겐 가이스베크 20

후트 마이케

독일 70565 스투트가르트 로러 회헤 58

마우러 도미니크

독일 72116 뢰싱겐 플라이네르베크 7

알텐 레오니

독일 72076 튀빙겐 바이스도른베크 14 아파르터망
161

마그너 클라우디아

독일 72074 튀빙겐 뉘르팅거 스트라세 32

명세서

청구범위

청구항 1

서열 식별 번호 6의 아미노산 서열(CDRa2) 및 서열 식별 번호 7의 아미노산 서열(CDRa3)을 포함하는 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 제1 도메인; 및

서열 식별 번호 14의 아미노산 서열(CDRb2) 및 서열 식별 번호 15의 아미노산 서열(CDRb3)을 포함하는 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 제2 도메인

을 포함하는 항원 인식 구조체로서,

(a) 제1 도메인의 CDRa1이 서열 식별 번호 5에 제시된 것이고, 제2 도메인의 CDRb1이 서열 식별 번호 37 내지 44의 아미노산 서열 중 하나로부터 선택되거나;

(b) 제1 도메인의 CDRa1이 서열 식별 번호 26에 제시된 것이고, 제2 도메인의 CDRb1이 서열 식별 번호 13 및 37 내지 49의 아미노산 서열 중 하나로부터 선택되고,

상기 항원 인식 구조체가 T 세포 수용체(TCR), 이의 유도체 또는 단편이되, 상기 유도체 또는 단편이 COL6A3 항원성 폴리펩티드에 특이적으로 및/또는 선택적으로 결합하는 분자의 항원 결합 및/또는 인식 능력을 보유하는, 항원 인식 구조체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항원 인식 구조체가 안정하고, 특히 MHC의 맥락에서 서열 식별 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 COL6A3 항원성 펩티드에 특이적으로 및/또는 선택적으로 결합할 수 있는, 항원 인식 구조체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제1 도메인이 TCR α 또는 γ 쇠의 부분이고/이거나 상기 제2 도메인이 TCR β 또는 δ 쇠의 부분인, 항원 인식 구조체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항원 인식 구조체가 단일 쇠 항원 인식 구조체이고, 상기 단일 쇠 항원 인식 구조체가 단일 쇠 TCR인, 항원 인식 구조체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항원 인식 구조체가 가용성 TCR인, 항원 인식 구조체.

청구항 6

제1항에 따른 항원 인식 구조체를 인코딩하는 핵산.

청구항 7

제6항에 따른 핵산을 포함하는 핵산 벡터.

청구항 8

제1항에 따른 항원 인식 구조체, 제6항에 따른 핵산 또는 제7항에 따른 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 숙주 세포는 포유동물 세포인, 재조합 숙주 세포.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 숙주 세포는 인간 세포인, 재조합 숙주 세포.

청구항 11

제8항에 있어서,

- a) 림프구, 또는
 - b) 비림프구 세포
- 인 재조합 숙주 세포.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 림프구는 T 림프구 또는 T 림프구 전구세포인, 재조합 숙주 세포.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 림프구는 CD4 또는 CD8 양성 T 세포인, 재조합 숙주 세포.

청구항 14

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항원 인식 구조체, 제6항에 따른 핵산, 제7항에 따른 벡터, 또는 제8항에 따른 재조합 숙주 세포, 및 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 안정화제 및/또는 부형제를 포함하는, 암의 진단, 예방 및/또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 COL6A3 특이적 항원 인식 구조체를 생산하는 방법으로서,

- a) 적절한 숙주 세포를 제공하는 단계;
- b) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항원 인식 구조체를 인코딩하는 코딩 서열을 포함하는 유전자 구조체를 제공하는 단계;
- c) 상기 적절한 숙주 세포 안으로 상기 유전자 구조체를 도입하는 단계; 및
- d) 상기 적절한 숙주 세포에 의해 상기 유전자 구조체를 발현하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 16

◆청구항 16은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제15항에 있어서, 상기 적절한 숙주 세포로부터 상기 항원 인식 구조체를 분리 및 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

◆청구항 17은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.◆

제15항에 있어서, T 세포 내에 상기 항원 인식 구조체를 재구성하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 암이 COL6A3이 과발현되고/되거나 돌연변이되고/되거나 COL6A3에서 유래된 종양 관련 항원이 제시되는 암인, 약학적 조성물.

청구항 19

복수의 형질전환된 세포를 생성하는 시험관 내 방법으로서,

- a) 암 또는 COL6A3 양성 전암을 갖는 대상으로부터 분리된 세포를 하나 이상의 제7항에 따른 벡터에 의해 형질 전환시켜 형질전환된 세포를 생성하는 단계; 및

b) 상기 형질전환된 세포를 팽창시켜 복수의 형질전환된 세포를 생성하는 단계를 포함하는 시험관 내 방법.

청구항 20

암을 검출하기 위한 시험관 내 방법으로서,

- a) 생물학적 샘플을 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항원 인식 구조체와 접촉시키는 단계; 및
- b) 상기 생물학적 샘플에 대한 상기 항원 인식 구조체의 결합을 검출하는 단계를 포함하는 시험관 내 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 COL6A3 항원에 대한 항원 인식 구조체에 관한 것이다. 본 발명은 특히 종양 발현 항원 COL6A3에 대해 선택적이고 특이적인, 신규 조작된 T 세포 수용체(TCR) 기반의 분자를 제공한다. 본 발명의 TCR 및 그로부터 유래하는 COL6A3 항원 결합 단편은 암 질환을 발현하는 COL6A3의 진단, 치료 및 예방에 유용하다. 본 발명의 항원 인식 구조체를 인코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 항원 인식 구조체를 발현하는 재조합 세포 및 본 발명의 화합물을 포함하는 약학적 조성물이 추가로 제공된다.

배경 기술

[0002] 콜라겐은 다양한 조직의 완결성 유지에서 역할을 하는 단백질의 상위계열(superfamily)이다. 콜라겐은 세포외 기질 단백질이며 이들의 공통 구성 요소로서 삼중 나선 도메인을 갖는다. 콜라겐 VI은 미세원섬유의 주요 구조적 구성 요소이다. 콜라겐 VI의 기본 구조 단위는 $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$ 및 $\alpha 3(VI)$ 콜라겐 쇠의 이중삼합체이다. $\alpha 1(VI)$ 및 $\alpha 2(VI)$ 쇠는 각각 COL6A1 및 COL6A2 유전자에 의해 인코딩된다. COL6A3 유전자에 의해 인코딩되는 단백질은 VI형 콜라겐의 $\alpha 3$ 아단위이다($\alpha 3(VI)$ 콜라겐 쇠)(Bertini et al., 2002 Eur. J. Paediatr. Neurol 6:193-8). COL6A3의 유전자 발현은 이전에 유방암의 진행과 연관 있는 것으로 나타났으며 결장암에서 상승했고(Smith MJ et al., "Analysis of differential gene expression in colorectal cancer and stroma using fluorescence-activated cell sorting purification," British journal of cancer, 2009; 100:1452-1464; Tilman G et al., "Human periostin gene expression in normal tissues, tumors and melanoma: evidences for periostin production by both stromal and melanoma cells," Mol Cancer, 2007; 6:80) 또한 결장직장 암종의 예후 표지자로서 나타났다(Qiao J et al., "Stroma derived COL6A3 is a potential prognosis marker of colorectal carcinoma revealed by quantitative proteomics," Oncotarget, 2015 Oct 6; 6(30): 29929-29946). COL6A3 유전자는 인간 게놈에서 2q37의 위치를 찾아내며 44개의 엑손을 포함한다. COL6A3은 3177개의 아미노산을 가지며 12개의 폰 빌베르란트 인자 A형(vWA) 도메인, 1개의 섬유결합소 3형 도메인 및 1개의 BPTI/Kunitz 계열의 세린 단백질분해효소 억제제(KU) 도메인을 포함한다.

[0003] T 세포 기반의 면역요법 표적은 종양 관련 또는 종양 특이적 단백질에서 유래하는 펩티드 에피토프를 나타내며, 이는 구조적 적합성 복합체(MHC)의 분자에 의해 제시된다. 이러한 종양 관련 항원(TAA)은 해당 종양의 세포에서 보통 상향조절되는 동일한 원천의 변형되지 않은 세포들에 비해서 발현된 효소, 수용체, 전사 인자 등과 같은 모든 단백질 클래스에서 유래하는 펩티드일 수 있다.

[0004] 세포 면역 반응의 특정 요소는 종양 세포를 선택적으로 인식하고 파괴할 수 있다. 종양 침윤 세포 모집단 또는 말초 혈액으로부터 종양 항원 특이적 T 세포의 분리는 그러한 세포가 암에 대한 자연 면역 방어에서 중요한 역할을 수행함을 시사한다. 특히 세포질에 위치한 단백질 또는 결손 리보솜 산물(DRIp)로부터 유래된 보통 8 내지 10개의 아미노산 잔기로 이루어진 구조적 적합성 복합체(MHC)를 포함하는 펩티드의 클래스 I 분자를 인식하는 CD8 양성 T 세포는 이 반응에서 중요한 역할을 한다. 인간의 MHC 분자는 또한 인간 백혈구 항원(HLA)으로 지정된다.

[0005] TCR은 신호 전달의 매개에 관여하는 CD3 복합체의 불변 단백질과 관련이 있는 면역글로불린 상위계열의 이중이합체 세포 표면 단백질이다. TCR은 $\alpha\beta$ 및 $\gamma\delta$ 이중이합체의 형태로 존재하며, 이들은 구조적으로 유사하지만 해부학적 위치는 상당히 다르며 아마 기능도 다를 것이다. 미접촉 이중이합체 $\alpha\beta$ TCR의 세포의 부분은 2개의

폴리펩티드 쇠로 구성되며, 각각의 쇠는 막 근위의 불변 도메인과 막 원위의 가변 도메인을 갖는다. 불변 및 가변 도메인 각각은 쇠내 이황화 결합을 포함한다. 가변 도메인은 항체의 상보성 결정 영역(CDR)과 동족인 고도로 다형태적인 루프를 함유한다. TCR 유전자 요법의 사용은 다수의 기존 장애물을 극복한다. 이것은 환자 자신의 T 세포가 바람직한 특이성과 짧은 기간 동안 충분한 숫자의 T 세포 생성을 갖추는 것을 허용하여 세포의 고갈을 피할 수 있다. TCR이 중앙 기억 T 세포 또는 줄기세포 특성이 있는 T 세포 안으로 형질도입되며, 이것은 전달에 있어 더 나은 지속성 및 기능을 보장할 수 있다. TCR 조작된 T 세포를 화학요법 또는 방사능에 의해 림프구감소 증에 걸린 암 환자에게 주입하면, 효율적인 생착은 가능하게 하면서 면역 억제는 저해한다.

[0006] 암 요법을 위한 분자 표적화 약물의 개발에서 진전이 있었지만, 암 세포에 고도로 특이적인 분자를 특이적으로 표적화하는 새로운 항암 제제의 개발 요구가 여전히 업계에 존재한다. 본 설명은 신규 조작된 COL6A3 TCR, 각 해당되는 재조합 TCR 구조체, 핵산, 벡터 및 개시된 바와 같이 COL6A3 에피토프(들)에 특이적으로 결합하는 숙주 세포; 및 암의 치료에서 상기 분자들을 사용하는 방법들을 제공하여 이러한 요구를 해결한다.

발명의 내용

- [0007] 첫 양태에서 본 발명의 목적은
- [0008] 서열 식별 번호 5(CDRa1), 서열 식별 번호 6(CDRa2) 및 서열 식별 번호 7(CDRa3)에 따른 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 제1 도메인, 및
- [0009] 서열 식별 번호 13(CDRb1), 서열 식별 번호 14(CDRb2) 및 서열 식별 번호 15(CDRb3)에 따른 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 제2 도메인
- [0010] 을 포함하는 항원 인식 구조체에 있어서,
- [0011] 상기 상보성 결정 영역의 적어도 하나가
- [0012] (a) 서열 식별 번호 26(CDRa1 돌연변이체 1) 및 서열 식별 번호 37 내지 49(CDRb1 돌연변이체 1 내지 13), 바람직하게는 서열 식별 번호 40, 및
- [0013] (b) 보존적인 아미노산 교환을 포함하는 서열 식별 번호 26 및 서열 식별 번호 37 내지 49, 바람직하게는 서열 식별 번호 40
- [0014] 의 균으로부터 선택된 적어도 하나의 서열로 대체되는, 항원 인식 구조체에 의해 해결된다.
- [0015] 다른 양태에서, 항원 인식 구조체의 CDRa1은 서열 식별 번호 5에 따른 아미노산 서열과 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 동일성을 가질 수 있다.
- [0016] 다른 양태에서, 항원 인식 구조체의 CDRa2는 서열 식별 번호 6에 따른 아미노산 서열과 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 동일성을 가질 수 있다.
- [0017] 다른 양태에서, 항원 인식 구조체의 CDRa3은 서열 식별 번호 7에 따른 아미노산 서열과 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 동일성을 가질 수 있다.
- [0018] 다른 양태에서, 항원 인식 구조체의 CDRb1은 서열 식별 번호 13에 따른 아미노산 서열과 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 동일성을 가질 수 있다.
- [0019] 다른 양태에서, 항원 인식 구조체의 CDRb2는 서열 식별 번호 14에 따른 아미노산 서열과 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 동일성을 가질 수 있다.

- [0020] 다른 양태에서, 항원 인식 구조체의 CDRb3은 서열 식별 번호 15에 따른 아미노산 서열과 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 동일성을 가질 수 있다.
- [0021] 본 발명의 맥락에서, 본 발명자들은 모 R4P3F9의 안정성, 인식 및 선택성을 향상시키는 α 및 β 쇠(들)에서 돌연변이된 CDR1 서열을 포함하는 COL6A3 TCR R4P3F9의 향상된 조작 버전을 파악했다. 이러한 성숙화된 TCR 변이체들은 2단계 방법으로 선택되었으며, 1단계에서는 안정성을 선택하고 2단계에서는 변이체에 대한 친화도를 선택한다(실시에 참조). 본 발명의 TCR이 돌연변이된 CDR1 영역을 포함하는 반면, 결합 친화도/특이성 및/또는 선택성을 증가시키기 위해 CDR2 및/또는 CDR3 또한 돌연변이될 수 있으며 또한 그러한 돌연변이된 CDR이 이상적으로 기존 구조체에 포함될 수 있는 가능성이 있다.
- [0022] 친화도 성숙화에 의해 HLA-A*02/COL6A3-펩티드를 향한 결합 활성이 상당히 더 강하지만 특이성은 유지되거나 심지어 향상된 변이체를 파악했다. 모 TCR C-1(야생형 CDR을 포함하는 R4P3F9 TCR, 표 5 참조)과 비교해서, 본 발명의 모든 변이체가 더 낮은 펩티드 부하 농도에 대해 이미 도달한 더 높은 수준의 상태에서 IFN- γ 방출을 향상시켰다.
- [0023] 가변 도메인 내부에서 CDR1 및 CDR2는 폴리펩티드 쇠의 가변(V) 영역에서 발견되고 CDR3은 일부의 V 영역, 전체의 다양성(D) 영역 및 결합(J) 영역을 포함한다. CDR3이 가장 가변적이며, 특이적으로 그리고 선택적으로 항원을 인식하는 책임이 있는 주 CDR임이 가정된다. 놀랍게도 일부 TCR의 경우 CDR1이 펩티드와 접촉도 하는 것으로 보이며, 따라서 선택적 인식을 야기한다. 본 사례에서, 구체적인 이론에 구속됨 없이 돌연변이된 CDR1b가 COL6A3-펩티드의 위치 8과 상호작용하는 것으로 보인다.
- [0024] 미접촉 α - β 이중이합체 TCR은 하나의 α 쇠 및 하나의 β 쇠를 갖는다. 각 α 쇠는 가변, 결합 및 불변 영역을 포함하며, β 쇠는 또한 대개 가변 영역과 결합 영역 사이에 짧은 다양성 영역을 포함하지만, 이 다양성 영역은 흔히 결합 영역의 일부로서 간주된다. 각 가변 영역은 구조틀(framework) 서열에 포매되어 있는 3개의 CDR(상보성 결정 영역)을 포함하며, 그 중 하나는 CDR3으로 불리는 과가변 영역이다. 여러 유형의 α 쇠 가변(V α) 영역이 있고 여러 유형의 β 쇠 가변(V β) 영역이 있는데, 이들은 구조틀, CDR1 및 CDR2 서열에 의해 그리고 부분적으로 정의된 CDR3 서열에 의해 구별된다. IMGT 명명법에서 V α 유형은 고유한 TRAV 번호로 지칭하고, V β 유형은 고유한 TRBV 숫자로 지칭한다.
- [0025] 바람직하게는, 본 발명의 항원 인식 구조체는 본원에 개시된 본 발명의 하나의 개별 조작된 TCR 가변 영역의 각각의 CDR1 내지 CDR3을 포함한다. 바람직하기로는 적어도 하나의, 바람직하게는 2개의 성숙화된 CDR1 서열을 포함하는 본 발명의 항원 인식 구조체(예: α β 및 γ δ TCR들)이다.
- [0026] 본원에 개시된 CDR 변이체, 특히 CDR1 변이체는 달리 언급되지 않는 한 다른, 아마도 선택적인, 펩티드 쇠 이내 부위에서 하나 이상의 잔기의 치환으로 변형될 수 있다. 이러한 치환은, 예를 들면, 소수성의 아미노산이 다른 소수성의 아미노산으로 치환되는 것처럼, 한 아미노산이 구조 및 특성이 유사한 아미노산으로 치환되므로 그 성격이 보존적이다. 심지어 더 보존적인 것은 류신이 이소류신으로 치환되는 것처럼, 동일하거나 유사한 크기 및 화학적 특성을 가진 아미노산으로 치환되는 것일 것이다. 자연적으로 발생하는 동종 단백질의 종족에서의 서열 변이의 연구에서, 특정 아미노산의 치환은 다른 것들보다 더 자주 허용되고 있으며, 이들은 본래의 아미노산과 치환된 아미노산 간에 크기, 전하, 극성 및 소수성이 비슷한 상관관계를 보이며, 이것은 "보존적 치환"을 정의하는 데 기본이 된다. 바람직한 보존적 치환은 본원에서 다음 5개 그룹 중 1개 내에서의 교환으로 정의된다: 그룹 1- 작은, 지방족, 비극성 또는 약간 극성의 잔기(Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); 그룹 2- 극성, 음전하를 가진 잔기와 그 아미드(Asp, Asn, Glu, Gln); 그룹 3- 극성, 양전하를 가진 잔기(His, Arg, Lys); 그룹 4- 큰, 지방족, 비극성 잔기(Met, Leu, Ile, Val, Cys); 및 그룹 5- 큰, 방향족 잔기(Phe, Tyr, Trp).
- [0027] 덜 보존적 치환은 알라닌을 이소류신 잔기로 치환하는 것처럼, 한 아미노산을 유사한 특성이지만 크기가 어느 정도 다른 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다.
- [0028] 본원에서 사용된 "특이성" 또는 "항원 특이성" 또는 주어진 항원에 대한 "특이적"이란 용어는 상기 항원이 HLA, 바람직하게는 HLA A2에 의해 제시될 때 항원 인식 구조체가 상기 항원에, 바람직하게는 COL6A3 항원에, 보다 바람직하게는 고결합성으로 특이적으로 결합할 수 있음을 의미한다. 예를 들어, COL6A3 제시 HLA에 반응하여 TCR을 발현하는 T 세포가 낮은 농도의(예: 약 10^{-11} mol/l, 10^{-10} mol/l, 10^{-9} mol/l, 10^{-8} mol/l, 10^{-7} mol/l, 10^{-6} mol/l, 10^{-5} mol/l) COL6A3 항원, 예컨대 본원에서 이하에 제공된 COL6A3 에피토프 및 항원들로 펄스된 HLA A2 표

적 세포와 함께 공동배양 시 적어도 약 200 pg/ml 이상(예: 250 pg/ml 이상, 300 pg/ml 이상, 400 pg/ml 이상, 500 pg/ml 이상, 600 pg/ml 이상, 700 pg/ml 이상, 1000 pg/ml 이상, 2,000 pg/ml 이상, 2,500 pg/ml 이상, 5,000 pg/ml 이상)의 인터페론 γ (IFN- γ)를 분비한다면, 항원 인식 구조체로서 TCR이 COL6A3 항원에 대해 "항원성 특이성"을 갖는다고 간주할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, TCR을 발현하는 T 세포가 낮은 농도의 COL6A3 항원으로 펄스된 표적 세포와 공동배양 시 변환되지 않은 배경 수준의 IFN- γ 의 적어도 2배에 해당하는 IFN- γ 를 분비한다면, TCR은 COL6A3에 대해 "항원성 특이성"을 갖는다고 간주할 수 있다. 위에서 기술한 이러한 "특이성"은 예를 들어 ELISA로 분석할 수 있다.

[0029] 본 발명의 한 대체 또는 추가의 구현에서, 항원 인식 구조체는 안정하고 COL6A3 항원에 특이적이고/이거나 선택적으로 결합할 수 있으며, 바람직하게 상기 COL6A3 항원은 서열 식별 번호 1에 나와 있는 아미노산 서열을 갖는 단백질 에피통 또는 펩티드이거나 또는 그 변이체이며, 상기 변이체는 세 개 이하, 바람직하게는 2개, 가장 바람직하게는 한 개 이하의 아미노산 위치에서 아미노산 소실, 추가, 삽입 또는 치환체이다.

[0030] "선택성" 또는 "선택적 인식/결합"이란 용어는 바람직하게 단 하나의 특이적 에피통을 선택적으로 인식하거나 이에 결합하며 바람직하게는 다른 에피통에 대해 교차반응성을 전혀 보이지 않거나 실질적으로 보이지 않는, 항원 인식 구조체, 예컨대 TCR 또는 항체의 성질을 지칭하는 것으로 이해한다. 바람직하게는 "선택성" 또는 "선택적 인식/결합"은 항원 인식 구조체(예: TCR)가 바람직하게 단 하나의 특이적 에피통을 선택적으로 인식하거나 또는 이에 결합하며, 바람직하게는 다른 에피통에 대해 교차반응성을 전혀 보이지 않거나 실질적으로 보이지 않으며, 상기 항원 인식 구조체가 다른 에피통 및 다른 단백질에 대해 교차반응성을 전혀 보이지 않거나 실질적으로 보이지 않도록 상기 에피통이 하나의 단백질에 고유한 것을 의미한다.

[0031] 본 발명에 따른 항원 인식 구조체는 바람직하게는 항체 또는 그 유도체 또는 단편, 이중특이적 분자, 또는 T 세포 수용체(TCR) 또는 그 유도체 또는 단편으로부터 선택된다. 본 발명의 항체 또는 TCR의 유도체 또는 단편은 바람직하게는 모 분자의 항원 결합/인식 능력, 특히 상기 설명된 특이성 및/또는 선택성을 보유해야 한다.

[0032] 본 발명의 한 구현에서, 본 발명의 조작된 TCR은 주조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 의존 방식으로 COL6A3 항원을 인식할 수 있다. 본원에 사용된 "MHC 클래스 I 의존 방식"은 MHC 클래스 I 분자의 맥락에서 TCR이 COL6A3 펩티드 항원에 결합 시 면역 반응을 유발한다는 의미이다. MHC 클래스 I 분자는 당업계에서 알려진 일체의 MHC 클래스 I 분자일 수 있으며, 예를 들어 HLA-A 분자이다. 본 발명의 바람직한 한 구현에서, MHC 클래스 I 분자는 HLA-A2 분자이다.

[0033] 본 발명은 단일쇄 항원 인식 구조체와 이중쇄 인식 구조체 그리고 기타 변이체 분자 모두를 제공한다. 본 발명은 특히 항원 인식 구조체로서 조작된 TCR 또는 그 단편 또는 유도체를 제공한다. 조작된 TCR은 바람직하게는 인간 기원이며, 이는 인간 TCR 자리로부터 생성되므로 인간 TCR 서열을 포함하는 것으로 이해된다. 더욱이 본 발명의 TCR은 친화도 성숙화된 TCR로 특징지어지며, 이는 특이적으로 그리고 선택적으로 COL6A3 펩티드 항원을 인식할 수 있다.

[0034] 본 발명의 또 다른 구현은 면역 반응을 유도하는 상기 설명의 항원 인식 구조체를 추가적으로 또는 대안적으로 제공하는데, 바람직하게는 그 면역 반응이 인터페론(IFN) γ 수준의 증가를 특징으로 한다.

[0035] 본 발명의 TCR은 α 또는 β , 또는 γ 또는 δ 분자의 단일쇄로서, 또는 대안적으로 α 및 β 쇄 또는 γ 및 δ 쇄 둘 모두로 구성되는 이중쇄 구조체로서 제공될 수 있다.

[0036] 일부 추가의 구현에서, 본원에 개시된 조작된 TCR쇄의 CDR1 내지 CDR3 영역의 임의의 하나, 둘 또는 모두를 포함하는 항원 인식 구조체(표 1 참조)가 가장 바람직하다. 3개, 2개, 및 바람직하게는 단 1개만의 변형된 아미노산 잔기를 가진 자연적이거나 조작된 CDR 서열을 포함하는 항원 인식 구조체가 바람직할 수 있다. 변형된 아미노산 잔기는 아미노산 삽입, 결손 또는 치환으로부터 선택될 수 있다. 3개, 2개, 및 바람직하게는 1개의 변형된 아미노산 잔기가 해당 CDR 서열의 첫 번째 또는 마지막 아미노산 잔기인 것이 가장 바람직하다. 변형이 치환인 경우, 일부 구현에서는 그러한 치환이 바람직하게 보존적 아미노산 치환이다.

[0037] 본 발명의 TCR은 일체의 포유동물(예: 인간, 쥐, 원숭이, 토끼, 당나귀, 생쥐)과 같은 일체의 적절한 종으로부터 유래된 불변 영역을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 한 구현에서, 본 발명의 TCR은 인간 불변 영역을 추가로 포함한다. 일부 바람직한 구현에서, 본 발명의 TCR의 불변 영역은 TCR 발현 및 안정성을 증가시킬 수 있는, 예를 들어, 이질성 서열, 바람직하게는 마우스 서열의 도입에 의해 약간 변형될 수 있다. 또한, 바람직하지 못한 아미노산의 V 영역에서의 교체 및/또는 TCR C 도메인 사이에 이황화 가교의 도입 그리고 비결합 시스템의 제거와 같은 최신 기술에서 알려진 더욱 안정화하는 돌연변이(예: DE 10 2016 123 893.7)를 도입시킬 수

있다.

- [0038] 본원에 사용된 용어 "쥐과" 또는 "인간"은 항원 인식 구조체 또는 TCR, 또는 본원에 기술된 TCR의 임의의 성분 (예: 상보성 결정 영역(CDR), 가변 영역, 불변 영역, α 쇠 및/또는 β 쇠)을 지칭하는 경우, 각각 생쥐 또는 인간 비재배열된 TCR 자리로부터 유래한 TCR(또는 그 성분)을 의미한다.
- [0039] 본 발명의 한 구현에서, 키메라 TCR이 제공되며, 여기서 TCR 쇠는 복수의 중으로부터의 서열을 포함한다. 바람직하게, 본 발명의 TCR은 α 쇠의 인간 가변 영역 그리고 예를 들어, 쥐과 TCR α 쇠의 쥐과 불변 영역을 포함하는 α 쇠를 포함할 수 있다.
- [0040] 한 구현에서, 본 발명의 TCR은 상기 구현에 따른 인간 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함하는 인간 TCR이다.
- [0041] 본 발명의 TCR은 단일 쇠 TCR(scTCR)로서 제공될 수 있다. scTCR은 제1 TCR 쇠(예: α 쇠)의 가변 영역의 폴리펩티드 그리고 전체(전장) 제2 TCR 쇠(예: β 쇠)의 폴리펩티드 또는 이의 반대를 포함할 수 있다. 더욱이, scTCR은 2개 이상의 폴리펩티드를 함께 연결하는 하나 이상의 링커를 임의적으로 포함할 수 있다. 링커는 예를 들어 본원에 기술된 바와 같이 2개의 단일 쇠를 함께 연결하는 펩티드일 수 있다. 또한 IL-2, IL-7 또는 IL-15와 같은 인간 사이토키네 융합되는, 본 발명의 그러한 scTCR이 제공된다.
- [0042] 본 발명에 따른 항원 인식 구조체는 적어도 2개의 scTCR 분자를 포함하는 다합체 복합체의 형태로 또한 제공될 수 있으며, 상기 scTCR 분자는 적어도 1개의 비오틴 모이어티에 각각 융합되며 또한 상기 scTCR은 비오틴-스트렙타비딘 상호작용에 의해 상호연결되어 상기 다합체 복합체의 형성을 허용한다. 다합체 TCR의 생성을 위한 유사한 접근 방식 또한 가능하며 본 공개에 포함된다. 또한 2개가 넘는 본 발명의 scTCR을 포함하는 더 높은 차수의 다합체 복합체가 제공된다.
- [0043] 본 발명의 목적상, TCR이란 적어도 하나의 TCR α 또는 γ 및/또는 TCR β 또는 δ 가변 도메인을 갖는 모이어티이다. 일반적으로, 이들은 TCR α 가변 도메인 및 TCR β 가변 도메인 모두를 포함한다. 이들은 $\alpha\beta$ 이질이합체이거나 단일 쇠 형태일 수 있다. 입양 요법에서의 사용을 위해, $\alpha\beta$ 이질이합체 TCR은 예를 들어 세포질 및 막횡단 도메인을 모두 갖는 전장 쇠로서 형질감염될 수 있다. 원한다면, 해당 불변 도메인의 잔기 사이에 도입된 이황화 결합이 존재할 수 있다.
- [0044] 바람직한 한 구현에서, 항원 인식 구조체는 인간 TCR이거나 그 단편 또는 유도체이다. 인간 TCR 또는 그 단편 또는 유도체는 상응하는 인간 TCR 서열의 50% 이상을 구성하는 TCR이다. 바람직하게는, TCR 서열의 적은 부분만 인공적 기원이거나 다른 중으로부터 유래한다. 그러나, 키메라 TCR, 예를 들어 불변 도메인에서 쥐과 서열을 가진 인간 기원으로부터 유래한 것이 유리하다고 알려져 있다. 그러므로 특히 바람직한 것은 그 불변 도메인의 세포의 부분에서 쥐과 서열을 함유하는 본 발명에 의거한 TCR이다.
- [0045] 그리하여 본 발명의 항원 인식 구조체는 인간 백혈구 항원(HLA) 의존 방식으로, 바람직하게는 HLA-A02 의존 방식으로 그 펩티드 항원을 인식할 수 있는 것이 또한 바람직하다. 본 발명의 맥락에서 "HLA 의존 방식"이라는 용어는, 항원 인식 구조체가 항원 펩티드가 상기 HLA에 의해 제시되는 경우에만 항원에 결합한다는 것을 의미한다.
- [0046] 한 구현에서 본 발명에 의거한 항원 인식 구조체는 바람직하게는 면역 반응을 유도하며, 바람직하게는 그 면역 반응이 인터페론(IFN) γ 수준의 증가를 특징으로 한다.
- [0047] 본원에 사용된 용어 "폴리펩티드"에는 올리고펩티드가 포함되며 하나 이상의 펩티드 결합에 의해 연결된 단일 쇠의 아미노산을 지칭한다. 본 발명의 폴리펩티드에 있어서, 기능적 부분은 그것이 한 부분인 TCR(또는 그 기능적 변이체)의 연속적 아미노산을 포함하는 일체의 부분일 수 있으며, 단 그 기능적 부분은 바람직하게는 본원의 표 1에 개시된 바와 같이 COL6A3 항원에 특이적으로 결합해야 한다. TCR(또는 그 기능적 변이체)을 언급할 때 사용되는 "기능적 부분"이라는 용어는 일부(모 TCR 또는 그 모 기능적 변이체)로서 TCR(또는 그 기능적 변이체)의 생물학적 활성을 보유하는 본 발명의 TCR(또는 그 기능적 변이체)의 임의의 부분 또는 단편을 지칭한다. 기능적 부분은 예를 들어, 모 TCR(또는 그 기능적 변이체)과 유사한 정도로, 동일한 정도로 또는 보다 더 높은 정도로 COL6A3 항원에 (HLA-A2 의존 방식으로) 특이적으로 결합하는 능력 또는 암을 검출, 치료 또는 예방하는 능력을 보유하는 TCR(또는 그 기능적 변이체)의 부분들을 망라한다.
- [0048] 기능적 부분은 그 부분의 아미노 또는 카르복시 말단 또는 두 말단 모두에서 추가의 아미노산을 포함할 수 있으며, 그 추가의 아미노산은 모 TCR 또는 그 기능적 변이체의 아미노산 서열에서 발견되지 않는다. 바람직하게는 추가의 아미노산이 기능적 부분의 생물학적 기능, 예를 들어 COL6A3 항원에 특이적으로 결합하고/하거나 암을

검출, 치료 또는 예방하는 등의 능력을 갖는 기능을 방해하지 않는다. 더 바람직하게는, 추가의 아미노산이 모 TCR 또는 그 기능적 변이체의 생물학적 활성과 비교하여 생물학적 활성을 강화시킨다.

[0049] 위에서 이미 언급된 바와 같이, 본 발명의 TCR의 결합 기능성은 항체의 구조를 안에서 제공될 수 있다. 다양한 문법적 형태로 사용되는 "항체"란 용어는 본원에서 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉 항체 결합 부위 또는 과라톱을 함유하는 분자를 지칭한다. 그러한 분자는 면역글로불린 분자의 "항원 결합 단편"으로도 불린다. 본 발명은 본원에 기술된 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그 항원 결합 부분을 추가로 제공한다. 항체는 당업계에서 알려진 어떠한 유형의 면역글로불린이라도 될 수 있다. 예를 들어, 항체는 모든 아이소형의 것일 수 있으며, 예를 들면 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM 등이다. 항체는 단클론 또는 다클론 일 수 있다. 항체는 자연적으로 발생하는 항체일 수 있으며, 예를 들어 생쥐, 토끼, 염소, 말, 닭, 햄스터, 인간 등 포유동물로부터 분리되고/분리되거나 정제된 항체이다. 대안적으로, 항체는 유전자 조작된 항체, 예를 들어 인간화된 항체 또는 키메라 항체일 수 있다. 항체는 단량체 또는 중합체 형태일 수 있다.

[0050] 본 발명은 또한 본원에 기술된 항체 중 어느 하나의 항원 결합 부분을 제공한다. 항원 결합 부분은 Fab, F(ab')₂, dsFv, scFv, 디아바디 및 트리아바디와 같은 적어도 하나의 항원 결합 부위를 갖는 어느 한 부분일 수 있다. 합성 펩티드를 통해 항체 경쇄의 V 도메인에 연결된 항체 중쇄의 가변(V) 도메인을 포함하는 절단된 Fab 단편으로 구성된, 단일쇄 가변 영역 단편(scFv) 항체 단편은 일상적인 재조합 DNA 기술의 기법을 사용하여 생성될 수 있다. 유사하게 이황화물 안정화 가변 영역 단편(dsFv)은 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있지만, 본 발명의 항체 단편은 이러한 항체 단편의 예시적 유형으로 제한되지 않는다. 또한 항체 또는 그 항원 결합 부분은 검출 가능한 표지, 예를 들어 방사능동위원소, 형광단(예: 플루오레세인 이소티오시안산염(FITC), 피코에리트린(PE)), 효소(예: 알칼리성 인산분해효소, 양고추냉이 과산화효소) 및 원소 입자(예: 금 입자)를 포함하도록 변형될 수 있다.

[0051] 항체를 만드는 적절한 방법은 당업계에서 알려져 있다. 예를 들어, 표준 히브리도마 방법은 예를 들어 다음에 기술되어 있다: Kohler and Milstein, Eur.J. Immunol, 5, 51 1-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), Antibodies:A Laboratory Manual, CSH Press (1988), 및 C.A. Janeway et al.(eds.), Immunobiology, 제8판, Garland Publishing, New York, NY (201 1). 대안적으로, EBV-히브리도마 방법(Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984) 및 Roder et al, Methods Enzymol, 121, 140-67 (1986))과 같은 다른 방법들 그리고 박테리오파지 벡터 발현 시스템(예: Huse et al., Science, 246, 1275-81 (1989))이 당업계에서 알려져 있다. 또한 비인간 동물에서 항체를 생산하는 방법은 예를 들어, 미국 특허 번호 5,545,806, 5,569,825 및 5,714,352, 그리고 미국 특허 출원 번호 2002/0197266에 기술되어 있다.

[0052] 본 발명의 일부 구현은 또한 TCR 또는 그 기능적 단편 및 폴리펩티드에 관한 것으로 이는 가용성 TCR이다. 본원에 사용되는 "가용성 T 세포 수용체"란 용어는 미접촉 TCR의 단일쇄 또는 이중이합체의 절단된 변이체를 지칭하며 이는 폴리펩티드 링커(서열 식별 번호 22, 24, 25 및 27)로 연결된 TCR α-쇄 및 β-쇄의 적어도 가변 도메인을 포함한다. TCR의 가용성 변이체에는 대개 적어도 미접촉 단백질의 막횡단 및 세포질 도메인이 결여되고, 일부 경우, 바람직하게는, 그러한 가용성 구조체는 어떠한 불변 도메인 서열도 포함하지 않는다. 바람직한 구현에서 본 발명의 가용성 T 세포 수용체 구조체는 본원에 제공되는 적절한 링커 서열로 연결된 α-쇄 및 β-쇄 가변 도메인으로 구성되는 구조체를 포함한다. 가용성 TCR α-쇄 및 β-쇄의 가변 도메인 서열(아미노산 또는 핵산)은 미접촉 TCR 내 상응하는 서열과 동일할 수 있거나 상응하는 미접촉 TCR에 비해 가용성 TCR-α-쇄 및 β-쇄의 변이체를 포함할 수 있다. 본원에 사용되는 용어 "가용성 T 세포 수용체"는 변이체 또는 비변이체 가용성 TCR α-쇄 및 β-쇄 서열을 가진 가용성 TCR을 망라한다. 그 변이는 가용성 TCR α-쇄 및 β-쇄 서열의 가변 도메인 서열의 구조를 및/또는 CDR 영역에 있을 수 있으며, 아미노산 결손, 삽입, 치환 돌연변이 그리고 핵산 서열의 변경(이것은 아미노산 서열을 변경시키지 않음)을 포함할 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. 어떠한 경우에도 본 발명의 가용성 TCR은 모 TCR 분자의 결합 기능성을 보유하거나 우선적으로 향상시킨다.

[0053] 위의 문제는 또한 본 발명의 항원 인식 구조체를 인코딩하는 핵산 또는 위에서 언급된 단백질이나 폴리펩티드 구조체 중 어느 하나에 의해서 추가로 해결된다. 핵산은 바람직하게는 (a) 본 발명에 따른 항원 인식 구조체를 인코딩하는 가닥을 가지며; (b) (a)의 가닥에 상보적인 가닥을 가지며; 또는 (c) 엄격한 조건하에서 (a) 또는 (b)에 기술된 분자와 혼성화하는 가닥을 갖는다. 엄격한 조건이 당업자에게 알려져 있으며 구체적으로 Sambrook 등의 "분자 클로닝"에 나와 있다. 이에 추가하여, 핵산은 추가의 서열을 임의적으로 가지며, 이는 단백질에 상응하는 핵산 서열의 발현을 위해 구체적으로 포유동물/인간 세포에서의 발현을 위해 필요하다. 사용된 핵산은 세포에서 폴리펩티드에 상응하는 핵산 서열의 발현을 허용하는데 적합한 벡터에 포함될 수 있다. 하지만 핵산은 수지상 세포와 같은 고전적 항원 제시 세포로 제약될 수 있는 항원 제시 세포를 자체의 세포 표면 상의 상응하

는 단백질을 생산하는 방식으로 형질 전환하는 데에도 사용할 수 있다.

- [0054] 본원에 사용된 "핵산"에는 "폴리뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드" 및 "핵산 분자"가 포함되며, 일반적으로 DNA 또는 RNA의 중합체를 의미하는데 이것은 자연적 출처로부터 한 가닥 또는 두 가닥으로 합성되거나 얻을 수 있으며(예: 분리 및/또는 정제함), 그 출처는 자연적, 비자연적 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 또한 자연적, 비자연적 또는 변형되지 않은 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 사이에서 발견되는 포스포디에스테르 대신 포스포로아미데이트 결합 또는 포스포로티오에이트 결합과 같은 변형된 인트뉴클레오티드 결합을 포함할 수 있다.
- [0055] 바람직하게는, 본 발명의 핵산은 재조합이다. 본원에 사용된 "재조합"이란 용어는 (i) 살아 있는 세포에서 복제가 가능한 핵산 분자에 자연 또는 합성 핵산 분절(segment)을 결합시켜 살아 있는 세포 외부에 구성되는 분자 또는 (ii) 위의 (i)에서 기술한 것들의 복제로부터 얻어지는 분자를 지칭한다. 본 문서의 목적상, 복제는 시험관 내 복제 또는 생체 내 복제일 수 있다. 핵산은 TCR, 폴리펩티드 또는 단백질 또는 본원에 기술한 기능적 부분 또는 이의 기능적 변이체를 인코딩하는 일체의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0056] 더욱이, 본 발명은 또한 위에서 기술한 본 발명에 따른 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 바람직하게, 벡터는 발현 벡터 또는 재조합 발현 벡터이다. "재조합 발현 벡터"란 용어는 본 발명의 환경에서 적절한 숙주 세포 안에서 mRNA, 단백질 또는 폴리펩티드의 발현을 허용하는 핵산 구조체를 지칭한다. 본 발명의 재조합 발현 벡터는 일체의 적합한 재조합 벡터일 수 있으며, 일체의 적합한 숙주의 형질전환 또는 형질감염에 사용될 수 있다. 적합한 벡터에는 플라스미드와 바이러스와 같이 전파 및 팽창을 위해 또는 발현을 위해 또는 두 가지 모두를 위해 고안된 것들이 포함된다. 동물 발현 벡터의 예에는 pEUK-C1, pMAM 및 pMAMneo가 포함된다. 바람직하게는, 재조합 발현 벡터는 예를 들어 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터이다. 재조합 발현 벡터는 전사 그리고 번역 개시 및 종료 코돈과 같은 숙주 세포의 유형(예: 박테리아, 균류, 식물 또는 동물)에 특이적인 조절 서열을 포함하며, 그 안으로 벡터가 개입되어 그 안에서 본 발명의 핵산의 발현이 수행될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 벡터에는 형질전환되거나 형질감염된 숙주의 선택을 허용하는 하나 이상의 표지자 유전자가 포함될 수 있다. 재조합 발현 벡터는 본 발명의 구조체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 또는 본 발명의 구조체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 상보적이거나 이를 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 작동할 수 있도록 연결되는 자연적 또는 규범적 촉진자를 포함할 수 있다. 촉진자의 선택에는 예를 들어 강한, 약한, 유도가능한, 조직 특이적 및 발육 특이적 촉진자가 포함된다. 촉진자는 비바이러스성 촉진자 또는 바이러스성 촉진자일 수 있다. 본 발명의 재조합 발현 벡터는 일시적 발현, 안정한 발현 또는 둘 모두를 위해 설계할 수 있다. 또한 재조합 발현 벡터는 구성적 발현 또는 유도가능 발현을 위해 만들 수 있다.
- [0057] 본 발명은 또한 본 발명에 의거하는 항원 인식 구조체를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명의 숙주 세포는 본원에서 앞서 기술한 핵산 또는 벡터를 포함한다. 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어 식물, 동물, 균류 또는 조류일 수 있으며 또는 원핵 세포, 예를 들어 세균 또는 원생동물일 수 있다. 숙주 세포는 배양된 세포 또는 일차 세포, 즉 예를 들어 인간같은 생물로부터 직접 분리된 것일 수 있다. 숙주 세포는 유착 세포 또는 부유 세포, 즉 부유 상태로 성장하는 세포일 수 있다. 재조합 TCR, 폴리펩티드 또는 단백질 생산의 목적상, 숙주 세포는 바람직하게 포유동물(예: 중국 햄스터 난소(CHO) 세포) 세포이다. 가장 바람직하게는, 숙주 세포는 인간 세포이다. 숙주 세포는 일체의 세포 유형일 수 있으며, 어떤 유형의 조직으로부터도 유래할 수 있고 또한 어떠한 발육 단계의 것일 수도 있지만, 숙주 세포는 바람직하게는 말초 혈액 백혈구(PBL) 또는 말초 혈액 단핵세포(PBMC)이다. 더욱 바람직하게는, 숙주 세포는 T 세포이다. T 세포는 배양된 T 세포, 예를 들어 일차 T 세포와 같은 모든 T 세포 또는 배양된 세포주, 예를 들어 Jurkat, SupT1 등으로부터 유래한 T 세포 또는 포유동물에서 얻어진 T 세포, 바람직하게는 인간 환자로부터의 T 세포 또는 T 세포 전구체일 수 있다. 포유동물로부터 얻는 경우, T 세포는 다수의 출처로부터 얻을 수 있으며 혈액, 골수, 림프절, 흉선 또는 기타 조직이나 유체가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. T 세포는 또한 보강하거나 정제할 수 있다. 바람직하게는, T 세포는 인간 T 세포이다. 보다 바람직하게는, T 세포는 인간으로부터 분리된 T 세포이다. T 세포는 모든 유형의 T 세포일 수 있고 모든 발육 단계일 수 있으며, CD4 양성 및/또는 CD8 양성, CD4 음성 조력 T 세포, 예를 들어 Th1 및 Th2 세포, CD8 양성 T 세포(예: 세포 독성 T 세포), 종양 침윤 세포(TIL), 기억 T 세포, 자연 T 세포 등이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, T 세포는 CD8 양성 T 세포 또는 CD4 양성 T 세포이다.
- [0058] 바람직하게는, 본 발명의 숙주 세포는 림프구이며 바람직하게는 CD4 양성 또는 CD8 양성 T 세포와 같은 T 림프구이다. 숙주 세포는 더 나아가 바람직하게 COL6A3 발현 종양 세포에 대해 특이적인 종양 반응성 T 세포이다.
- [0059] 본 발명의 한 추가적인 양태는 의학에서의 사용을 위하여 본원에 공개된 항원 인식 구조체, 핵산, 벡터, 약학적

조성물 및/또는 숙주 세포에 관한 것이다. 한 바람직한 구현에서 의학에서의 사용에는 악성 또는 양성 종양 질병과 같은 종양 질병의 진단, 예방 및/또는 치료에서의 사용이 포함된다. 종양 질환은 예를 들어 암이나 상피 종양 질환의 종양 세포에서 COL6A3의 발현에 의해 특징지어지는 종양 질환이다.

- [0060] 위에서 언급된 항원 인식 구조체 및 그로부터 유래된 기타 물질의 의학적 적용에 있어, 치료 및 진단 대상 암은 일체의 암일 수 있으며, 급성 림프구성 암, 급성 골수성 백혈병, 포상 횡문근육종, 골암, 뇌암, 유방암, 항문의 암, 항문, 항문관 또는 직장항문의 암, 눈의 암, 간내 담관의 암, 관절의 암, 목, 방광 또는 흉막의 암, 코, 비강 또는 중이의 암, 구강의 암, 질의 암, 외음부의 암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수암, 결장암, 식도암, 자궁경부암, 위장관계 카르시노이드 종양, 신경아교종, 호지킨 림프종, 하인두암, 신장암, 인두암, 간암, 폐암, 악성 중피종, 흑색종, 다발성 골수종, 비강인두암, 비호지킨 림프종, 구인두의 암, 난소암, 음경의 암, 췌장암, 복막, 망 및 장간막 암, 인두암, 전립선암, 직장암, 신장암, 피부암, 소장암, 연조직암, 위암, 고환암, 갑상선암, 자궁의 암, 요관암 및 방광암 중 어느 하나를 포함한다. 바람직한 암은 자궁 경부, 구인두, 항문, 항문관, 직장항문, 질, 외음부, 또는 음경의 암이다. 특히 바람직한 암은 위장 및 위의 암 등 COL6A3 양성 암이다.
- [0061] 본 발명의 구조체, 단백질, TCR, 항체, 폴리펩티드 및 핵산은 특히 면역 요법, 바람직하게는 입양 T 세포 요법에서의 사용을 위한 것이다. 본 발명의 화합물의 투여에는, 예를 들어 본 발명의 T 세포를 상기 환자에 주입하는 것이 관여할 수 있다. 바람직하게는, 그러한 T 세포는 환자의 자가 T 세포이며 본 발명의 핵산이나 항원 인식 구조체와 함께 시험관 내 형질도입된다.
- [0062] WO 2016/011210에서는 NK 세포 및 T 세포를 포함하여 입양 요법을 위해 조작된 세포와 그 세포를 함유하는 조성물, 그리고 시험대상자에 대한 이의 투여 방법을 공개하고 있다. 이 세포는 키메라 항원 수용체(CAR) 및 공동자극 수용체와 같은 항원에 특이적으로 결합하는 유전자 조작 항원 수용체를 포함할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 목적은 또한 세포주를 발현하는 COL6A3 특이적 항원 인식 구조체의 제조 방법에 의해 해결되며, 그 방법은 다음을 포함한다:
- [0064] a. 적절한 숙주 세포의 제공,
- [0065] b. 청구범위 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항원 인식 구조체를 인코딩하는 코딩 서열을 포함하는 유전자 구조체의 제공,
- [0066] c. 상기 적절한 숙주 세포 안으로 상기 유전자 구조체의 도입, 및
- [0067] d. 상기 적절한 숙주 세포에 의한 상기 유전자 구조체의 발현.
- [0068] 이 방법은 상기 적절한 숙주 세포 상에 상기 항원 인식 구조체의 세포 표면 제시의 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0069] 다른 바람직한 구현에서, 유전자 구조체는 상기 코딩 서열에 작동 가능하게 연결되는 촉진자 서열을 포함하는 발현 구조체이다.
- [0070] 바람직하게는, 상기 항원 인식 구조체가 포유동물 기원의 구조체, 바람직하게는 인간 기원의 구조체이다. 본 발명의 방법에서 사용을 위한 바람직한 적절한 숙주 세포는 인간 세포와 같은 포유동물 세포, 특히 인간 T 림프구이다. 본 발명에서의 사용을 위한 T 세포는 본원에 앞서 상세히 기술되어 있다.
- [0071] 또한, 상기 항원 인식 구조체가 변형된 TCR이며, 상기 변형이 표지자 또는 치료에 활성적인 물질과 같은 기능적 도메인의 추가인 구현들도 본 발명에 망라된다. 더욱이, 내인성 막횡단 영역 대신에 대체 막 고정 도메인과 같은 대체 도메인을 갖는 TCR이 망라된다.
- [0072] 바람직하게 유전자 구조체를 상기 적절한 숙주 세포에 도입하는 형질감염 시스템은 레트로바이러스성 벡터 시스템이다. 그러한 시스템은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0073] 한 구현에서 세포로부터 항원 인식 구조체의 분리 및 정제 그리고 선택적으로 T 세포에서 번역된 항원 인식 구조체-단편의 재구성에 대한 추가의 방법 단계 또한 본 발명에 포함된다.
- [0074] 본 발명의 대안적인 양태에서는, 본원에 앞서 기술된 바와 같이 종양 세포에 대해 특이적이며 높은 결합성을 갖는 T 세포 수용체(TCR)의 생산 방법에 의해 T 세포가 제공되거나 획득되거나 획득될 수 있다. 이러한 T 세포는 본 발명의 방법에서 사용된 숙주 세포, 예를 들어 인간 또는 비인간 T 세포, 바람직하게는 인간 TCR에 의존한다.

- [0075] 본 발명의 TCR, 폴리펩티드, 단백질(그 기능적 변이체 포함), 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포(그 모집단 포함) 그리고 항체(그 항원 결합 부분 포함)는 분리 및/또는 정제할 수 있다. 본원에 사용된 "분리"란 용어는 그 자연 환경으로부터 제거됨을 의미한다. 본원에 사용된 "정제"란 용어는 순도가 증가됨을 의미하며, 여기서 "순도"는 상대적 용어로 절대 순도로 해석해서는 안 된다. 예를 들어, 순도는 적어도 약 50%일 수 있으며 60%, 70%, 80%, 90%, 95%보다 클 수 있거나 100%일 수 있다.
- [0076] 본 발명의 항원 인식 구조체, TCR, 폴리펩티드, 단백질(그 기능적 변이체 포함), 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포(그 모집단 포함) 그리고 항체(그 항원 결합 부분 포함)는 본원에 이하 집합적으로 "본 발명의 TCR 물질"로 지칭하며, 약학적 조성물과 같은 조성물로 배합할 수 있다. 이러한 점에서, 본 발명은 본원에 기술한 항원 인식 구조체, TCR, 폴리펩티드, 단백질, 기능적 부분, 기능적 변이체, 핵산, 발현 벡터, 숙주 세포(그 모집단 포함) 및 항체(그 항원 결합 부분 포함) 중 어느 하나, 및 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 및/또는 안정화제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 TCR 물질의 어느 하나를 포함하는 본 발명의 약학적 조성물은 하나보다 많은 본 발명의 TCR 물질(예: 폴리펩티드 및 핵산) 또는 2개 이상의 다른 TCR(그 기능적 부분 및 기능적 변이체 포함)을 포함할 수 있다. 대안적으로, 약학적 조성물이 화학요법 제제(예: 아스파라기나제, 부술판, 카보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 젬시타빈, 히드록시우레아, 메토틱렉세이트, 과클리릭셀, 리톡시맵, 빈블라스틴, 빈크리스틴 등)와 같은 다른 약학적으로 활성인 제제(들)이나 약물(들)과의 조합으로 발명의 TCR 물질을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 담체는 약학적으로 허용가능한 담체이다. 약학적 조성물에 대하여, 담체는 고려 중인 본 발명의 특징적인 TCR 물질에 관계적으로 사용되는 담체 중 어느 하나일 수 있다. 그러한 약학적으로 허용가능한 담체는 당업자에게 잘 알려져 있으며 일반 대중에게 즉시 제공될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 사용 조건하에서 유해한 부작용이나 독성이 없는 것이 바람직하다.
- [0077] 그리하여 본원에 기술된 본 발명의 제품 중 어느 하나 및 본 발명의 TCR 물질, 구체적으로 일체의 단백질, 핵산 또는 숙주 세포를 포함하는 약학적 조성물 또한 제공된다. 바람직한 한 구현에서 약학적 조성물은 면역 요법, 바람직하게는 양자 세포 요법을 위한 것이다.
- [0078] 바람직하게는, 본 발명의 TCR 물질은 주사, 예를 들어 정맥 내로 투여된다. 본 발명의 TCR 물질이 본 발명의 TCR(또는 그 기능적 변이체)을 발현하는 숙주 세포인 경우, 주입을 위한 세포의 약학적으로 허용가능한 담체는 예를 들어, 생리학적 식염수(물에 든 약 0.90% w/v의 NaCl, 물에 든 약 300 mOsm/L의 NaCl, 또는 물 1리터당 약 9.0 g의 NaCl), NORMOSOL R 전해질 용액(Abbott, Chicago, IL), PLASMA-LYTE A(Baxter, Deerfield, IL), 물에 든 약 5% 텍스트로스 또는 링거 젯산액과 같은 일체의 등장성 담체를 포함할 수 있다. 한 구현에서 약학적으로 허용가능한 담체는 인간 혈청 알부민으로 보완된다.
- [0079] 본 발명의 목적상, 투여되는 본 발명의 TCR 물질의 수량 또는 용량(예: 본 발명의 TCR 물질이 하나 이상의 세포 일 때 세포의 수)은 합당한 시간의 틀에 걸쳐 시험대상자나 동물에서 영향을 미치는 데(예: 치료 또는 예방 반응) 충분할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 TCR 물질의 용량은 암 항원과의 결합하거나, 투여 시점부터 약 2시간 이상의 기간 동안(예: 12 내지 24시간 이상) 암의 검출, 치료 또는 예방에 충분해야 한다. 특정 구현에서 상기 시간 기간은 더 길 수 있다. 상기 용량은 발명의 특정 TCR 물질의 유효성 그리고 동물(예: 인간)의 상태 그리고 치료할 동물(예: 인간)의 체중에 의해 결정될 것이다.
- [0080] 본 발명의 약학적 조성물, TCR(그 기능적 변이체 포함), 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포 또는 세포의 모집단을 암이나 COL6A3 양성 전암 상태의 치료나 예방의 방법에 사용할 수 있다고 사료된다. 세포에 의해 발현되는 경우, 본 발명의 TCR(또는 관련된 발명의 폴리펩티드 또는 단백질 및 그 기능적 변이체)이 본 발명의 COL6A3 항원을 발현하는 표적 세포에 대해 면역 반응을 매개할 수 있도록, COL6A3 항원에 특이적으로 결합되는 것으로 사료된다. 이러한 점에서 본 발명은 포유동물에서 한 병태, 특히 암의 치료나 예방의 방법을 제공하며, 상기 방법은 약학적 조성물, 항원 인식 구조체, 특히 TCR(및 그 기능적 변이체), 폴리펩티드, 또는 본원에 기술한 단백질, 일체의 핵산 또는 어느 한 TCR(및 그 기능적 변이체)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터, 폴리펩티드, 본원에 기술한 단백질, 또는 일체의 숙주 세포나 본 발명의 일체의 구조체(및 그 기능적 변이체)을 인코딩하는 재조합 벡터를 포함하는 세포의 모집단, 폴리펩티드 또는 본원에 기술한 단백질 중 어느 하나를 포유동물의 질병을 치료하기에 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함하여, 여기서 병태는 암, 바람직하게는 COL6A3 양성 암이다.
- [0081] 본 발명에서 유용한 약학적으로 허용가능한 담체나 희석제의 예는 SPGA와 같은 안정화제, 탄수화물(예: 솔비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 포도당, 텍스트란), 알부민이나 카세인과 같은 단백질, 소 혈청이나 탈지유와 같은 단백질 함유 제제 그리고 완충액(예: 인산염 완충액)을 포함한다.

- [0082] 본원에 사용된 "치료" 및 "예방"이라는 용어 그리고 그로부터 유래하는 단어들은 반드시 100% 또는 완전한 치료나 예방을 내포하는 것은 아니다. 대신, 다양한 정도의 치료나 예방이 있으며 당업자는 이익이나 치료 효과의 가능성을 갖는 것으로 이를 인식한다. 이러한 점에서 본 발명의 방법들은 포유동물의 병태에 대하여 일체의 수량이나 일체의 수준의 치료나 예방을 제공할 수 있다. 더욱이, 본 발명의 방법에 제공되는 치료나 예방은 치료나 예방 대상인 병태(예: 암) 또는 병태의 증상의 치료나 예방을 포함할 수 있다. 예를 들어, 치료나 예방은 종양의 퇴행 촉진을 포함할 수 있다. 또한 본원에의 목적상, "예방"은 병태의 발생, 또는 증상 또는 그 병태를 지연시키는 것을 망라할 수 있다.
- [0083] 본 발명은 또한 본 설명의 TCR, 핵산 또는 숙주 세포와 적어도 하나의 화학 요법제 및/또는 방사선 요법과 병용하는 투여를 포함하는 암의 치료 방법에 관한 것이다.
- [0084] 또한 다음 단계를 포함하는 암 치료를 필요로 하는 시험대상자에서 암의 치료 방법이 제공된다:
- [0085] a) 상기 시험대상자로부터 세포의 분리,
- [0086] b) 형질전환된 세포의 생산을 위해 본 발명의 항원 인식 구조체를 인코딩하는 적어도 하나의 벡터를 갖는 세포의 형질전환,
- [0087] c) 복수의 형질전환된 세포의 생산을 위해 형질전환된 세포의 팽창, 및
- [0088] d) 복수의 형질전환된 세포의 상기 시험대상자에 대한 투여.
- [0089] 또한 다음 단계를 포함하는 암 치료를 필요로 하는 시험대상자에서 암의 치료 방법이 제공된다:
- [0090] a) 건강한 공여자로부터 세포의 분리,
- [0091] b) 형질전환된 세포의 생산을 위해 본 발명의 항원 인식 구조체를 인코딩하는 적어도 하나의 벡터를 갖는 세포의 형질전환,
- [0092] c) 복수의 형질전환된 세포의 생산을 위해 형질전환된 세포의 팽창, 및
- [0093] d) 복수의 형질전환된 세포의 상기 시험대상자에 대한 투여.
- [0094] 또한 다음 단계를 포함하는 생물학적 샘플에서의 암의 검출 방법이 제공된다:
- [0095] a) 생물학적 샘플을 본 설명의 항원 인식 구조체와 접촉, 및
- [0096] b) 생물학적 검출에 대한 항원 인식 구조체의 결합의 검출.
- [0097] 일부 구현에서 암 검출 방법은 시험관 내, 생체 내 또는 제자리에서 실행된다.
- [0098] 또한 포유동물에서 병태의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 (i) 포유동물의 하나 이상의 세포를 포함하는 샘플과 본 발명의 TCR(및 그 기능적 변이체), 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포의 모집단, 항체 또는 그 항원 결합 부분 또는 본원에 기술한 약학적 조성물 중 어느 하나와의 접촉으로써 복합체 형성 및 (ii) 그 복합체 검출을 포함하며, 여기에서 복합체의 검출은 포유동물에서 병태가 존재함을 나타내며, 상기 병태는 COL6A3 양성 암과 같은 암이다.
- [0099] 포유동물에서 병태 검출에 대한 본 발명의 방법에 있어, 세포의 샘플은 전세포, 그 용해물, 또는 전세포 용해물의 분획(예: 핵이나 세포질 분획), 전체 단백질 분획 또는 핵산 분획을 포함하는 세포일 수 있다.
- [0100] 본 발명의 검출 방법의 목적을 위해, 접촉은 포유동물에 대해 시험관 내 또는 생체 내에서 반영할 수 있다. 바람직하게는 상기 접촉이 시험관 내이다.
- [0101] 또한 복합체의 검출은 당업계에 알려진 임의의 수의 방식을 통해 발생할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항원 인식 구조체(및 그 기능적 변이체), 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포의 모집단, 또는 항체 또는 TCR 또는 본원에 기술한 그 항원 결합 부분을 예를 들어 방사성동위원소 형광단(예: 플루오레세인 이소티오시안산염(FITC), 피코에리트린(PE)), 효소(예: 알칼리성 인산분해효소, 양고추냉이 과산화효소) 및 원소 입자(예: 금 입자)와 같은 검출 가능한 표지자로 표지화할 수 있다.
- [0102] 숙주 세포나 세포의 모집단이 투여되는 본 발명의 방법의 목적상, 상기 세포는 포유동물에 대해 동종 또는 자가 세포일 수 있다. 바람직하게는, 상기 세포는 포유동물에 대해 자가 세포이다.
- [0103] 앞서 언급된 본 발명의 TCR 물질의 의학적 적용에 있어, 치료 및 진단 대상 암은 일체의 암일 수 있으며, 급성

림프구성 암, 급성 골수성 백혈병, 포상 횡문근육종, 골암, 뇌암, 유방암, 항문의 암, 항문, 항문관 또는 직장 항문의 암, 눈의 암, 간내 담관의 암, 관절의 암, 목, 방광 또는 흉막의 암, 코, 비강 또는 중이의 암, 구강의 암, 질의 암, 외음부의 암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수암, 결장암, 식도암, 자궁경부암, 위장관계 카르시노이드 종양, 신경아교종, 호지킨 림프종, 하인두암, 신장암, 후두암, 간암, 폐암, 악성 중피종, 흑색종, 다발성 골수종, 비인두암, 비호지킨 림프종, 구인두의 암, 난소암, 음경의 암, 췌장암, 복막, 망 및 장간막 암, 인두암, 전립선암, 직장암, 신장암, 피부암, 소장암, 연조직암, 위암, 고환암, 갑상선암, 자궁의 암, 요관암 및 방광암 중 어느 하나를 포함한다. 바람직한 암은 자궁 경부, 구인두, 항문, 항문관, 직장항문, 질, 외음부, 또는 음경의 암이다. 특히 선호되는 암은 위장관 및 위의 암 등과 같은 COL6A3 양성 암이다.

[0104] 일반적으로, 본 발명은 본 발명에 의해 공개된 항원 인식 구조체, 핵산, 벡터, 약학적 조성물 및/또는 숙주 세포의 투여를 포함하는, 종양이나 종양 질환을 앓는 시험대상자의 치료를 위한 방법을 제공한다. 바람직하게는 상기 시험대상자가 그러한 치료를 필요로 하는 시험대상자이다. 바람직한 구현의 시험대상자는 포유동물 시험대상자, 바람직하게는 COL6A3 양성인 종양이나 종양 질환을 앓는 인간 환자이다.

[0105] 이제 이로써 제한되지 않는 동반되는 도면 및 서열을 참조하여 다음 실시예에서 본 발명을 추가로 기술한다. 본 발명의 목적상, 여기서 인용된 모든 참조문헌은 전문이 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0106] 도 1은 효모 표면 디스플레이를 통한 TCR의 안정화된 Va/Vβ 단일쇄 TCR(scTv)의 전환을 보여준다. 형질전환된 사카로마이세스 세레비지에 EBY100 표면에 나타나는 ScTv 분자를 FITC 표지된 항-Vbeta1 항체 및 PE 표지된 HLA-A*02/COL6A3-002 사합체로 염색했다. 변형되지 않은 scTv R4P3F9(왼쪽 패널, 서열 식별 번호 22)를 무작위 돌연변이 scTv 라이브러리 선택으로부터 유래한 scTv 골격(오른쪽 패널)을 안정화하기 위해 scTv 클론 포함 단일점 돌연변이와 비교한다.

도 2는 효모 표면 디스플레이를 통한 scTv 친화도 성숙화를 보여준다. 친화도 성숙화된 CDR1 β가 있는 그리고 없는 안정화된 scTv 분자를 COL6A3-002(서열 식별 번호 1)를 함유하는 HLA-A*02 사합체로 염색한 다음 COL6A3-002와 서열 유사성이 높은 9개의 펩티드(서열 식별 번호 28 내지 36)를 함유한 HLA-A*02사합체의 혼합물로 대조 염색했다. 비성숙화된 β쇄 CDR1 서열 RSGDLS(서열 식별 번호 13)로 안정화된 scTv(서열 식별 번호 27)를 친화도 성숙화된 β쇄 CDR1 서열 AMDHPY(서열 식별 번호 40) 및 ARWHRN(서열 식별 번호 39)을 갖는 scTv 클론들과 비교한다.

도 3은 항-CD3 Fab-scTv R4P3F9S 융합 변이체들인 75-1 내지 75-25의 크기 배제 크로마토그래피 용출 프로파일을 보여준다.

도 4는 항-Fab-scTv R4P3F9S 항-CD3 융합 변이체들인 75-1 내지 75-25의 생물층 간섭계로 측정되는 HLA-A*02/COL6A3-002 결합의 반응속도를 보여준다. HLA-A*02/COL6A3-002의 분석된 농도가 표시된다.

도 5는 생물층 간섭계(BLI)로 측정된 항 CD3 Fab-scTv R4P3F9S 융합 변이체들인 75-1 내지 75-25의 결합 분석을 보여준다. 표시된 유사 펩티드가 있는 1 μM의 HLA-A*02의 복합체가 분석되었다.

도 6은 여러 항 CD3 Fab-scTv R4P3F9S 융합 변이체들에 대한 HLA-A*02/COL6A3-002와 HLA-A*02/COL6A1-001(서열 식별 번호 30)의 결합 반응속도를 비교한 것을 보여준다. Fab-scTv의 분석된 농도가 표시된다.

도 7은 PE 표지된 HLA-A*02/COL6A3-002 사합체로 성숙화된 인간 CD8⁺ T 세포를 발현하는 R4P3F9 TCR 변이체의 염색을 보여준다. 대조 목적을 위해, NYES01-001에 대해 특이적인 TCR(모의) 또는 1G4 TCR이 발현되지 않았으며 PE 표지된 HLA-A*02/NYES01-001 사합체에 의한 염색이 사용되었다.

도 8은 COL6A3-002에 반응하여 인간 CD8⁺ T 세포를 발현하는 성숙화된 R4P3F9 TCR 변이체의 IFN-γ 방출을 보여준다. 대조 목적을 위해, NYES01-001에 대해 특이적인 TCR(모의) 또는 1G4 TCR이 발현되지 않았다. IFN-γ 방출은 COL6A3-002의 일련의 희석물로 로딩된 T2 세포를 전기천공한 CD8⁺ T 세포와 공동 배양한 후 ELISA로 측정했다.

도 9는 COL6A3-002 및 다른 유사한 펩티드에 대한 반응으로 인간 CD8⁺ T 세포를 발현하는 성숙화된 R4P3F9 TCR 변이체의 IFN-γ 방출을 보여준다. 대조 목적을 위해, NYES01-001에 대해 특이적인 TCR(모의) 또는 1G4 TCR이 발현되지 않았다. IFN-γ 방출은 10 μM의 COL6A3-002나 유사한 펩티드로 로딩된 T2 세포를 전기천공한 CD8⁺ T

세포와의 공동 배양한 후 ELISA로 측정했다.

도 10은 PE 표지된 펩티드-HLA-A*02 사합체를 사용한, 인간 CD8⁺ T 세포를 발현하는 R4P3F9 TCR 변이체의 염색을 보여준다. 대조 목적을 위해, NYESO1-001에 대해 특이적인 TCR(모의) 또는 1G4 TCR이 발현되지 않았으며 PE 표지된 HLA-A*02/NYESO1-001 사합체에 의한 염색이 사용되었다.

도 11은 COL6A3-002 또는 COL6A1-001에 대한 반응으로 인간 CD8⁺ T 세포를 발현하는 성숙화된 R4P3F9 TCR 변이체의 IFN- γ 방출을 보여준다. 대조 목적을 위해, NYESO1-001에 대해 특이적인 TCR(모의) 또는 1G4 TCR이 발현되지 않았다. IFN- γ 방출은 COL6A3-002 또는 COL6A1-001의 일련의 희석물로 로딩된 T2 세포를 전기천공한 CD8⁺ T 세포와 공동 배양한 후 ELISA로 측정했다.

도 12는 여러 종양 세포주와의 공동 배양 후 R4P3F9 TCR 변이체를 발현하는 원발성 인간 CD8⁺ T 세포의 IFN- γ 방출을 보여준다. SF539, SW982 및 Hs840.T 세포는 여러 수준의 표적 펩티드를 제시한다. MCF-7 세포는 표적 펩티드를 제시하지 않는다. 대조로 관심 대상의 TCR을 가진 세포와 함께 외인성 TCR이 없는 작용기 세포를 분석했다. IFN- γ 방출은 ELISA로 측정했다. *는 척도를 벗어난 데이터를 표시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0107]

하기 표 1은 본 발명의 펩티드 서열을 나타낸다(위치는 IMGT 번호 매김 체계에 따름: Francois Ehrenmann, Patrice Duroux, Chantal Ginestoux; Protein displays: 인간(호모 사피엔스) TRAV; IMGT Repertoire. IMGT®, the international ImMunoGenetics information system® <http://www.imgt.org>; 작성일: 2011년 3월 16일. 버전: 2016년 3월 6일; Francois Ehrenmann, Patrice Duroux, Chantal Ginestoux; Protein displays: 인간(호모 사피엔스) TRBV; IMGT Repertoire. IMGT®, the international ImMunoGenetics information system® <http://www.imgt.org>; 작성일: 2011년 3월 16일. 버전: 2016년 3월 6일).

[0108] [표 1]

서열 식별 번호	명칭	설명	서열
1	COL6A3-002		FLLDGSANV
2	R4P3F9 α	R4P3F9 TCR α 사슬 - 전장	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFVYRQYSGKSPPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVLLIRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVLPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVQSQKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
3	R4P3F9 α 리더	R4P3F9 TCR α 사슬 - 리더 캡티드	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQ
4	R4P3F9 α 가변	R4P3F9 TCR α 사슬 - 가변 도메인	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFVYRQYSGKSPPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVLLIRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVLP
5	R4P3F9 CDRa1	R4P3F9 TCR α 사슬 - CDR1	DRGSQS
6	R4P3F9 CDRa2	R4P3F9 TCR α 사슬 - CDR2	IYSNGD
7	R4P3F9 CDRa3	R4P3F9 TCR α 사슬 - CDR3	CAAYSGAGSYQLT
8	R4P3F9 - α 불변	R4P3F9 TCR α 사슬 - 불변 도메인	NIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVQSQKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
9	R4P3F9 - α 불변 시작	R4P3F9 TCR α 사슬 - 불변 도메인 시작	NIQN
10	R4P3F9 β	R4P3F9 TCR β 사슬 - 전장	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDSALYFCASSVESHYGYTFGSGTRLTVVEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLVLMAMVVRKDF
11	R4P3F9 β 리더	R4P3F9 TCR β 사슬 - 리더 캡티드	MGFRLCCVAFCLLGAGPV
12	R4P3F9 β 가변	R4P3F9 TCR β 사슬 - 가변 도메인	DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDSALYFCASSVESHYGYTFGSGTRLTVV
13	R4P3F9 CDRb1	R4P3F9 TCR β 사슬 - CDR1	RSGDLS
14	R4P3F9	R4P3F9 TCR	YNGEE

[0109]

	CDRb2	β 사슬 - CDR2	
15	R4P3F9 CDRb3	R4P3F9 TCR β 사슬 - CDR3	CASSVESHYGYT
16	R4P3F9 β 불변	R4P3F9 TCR β 사슬 - 불변 도메인	EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKKRDF
17	R4P3F9 β 불변 시작 1	R4P3F9 TCR β 사슬 - 불변 도메인 시작 1	EDLNK
18	R4P3F9 β 불변 시작 2	R4P3F9 TCR β 사슬 - 불변 도메인 시작 2	EDLKN
19	Aga2p - R4P3F9	scTv R4P3F9와의 Aga2p 융합 단백질 및 태그	MQLLRCSIFSVIASVLAQELTTICEQIPSPBLESTPYSLSTTTILANGKAMQGVFEYYKSVTFVSNCGSHPSTTSKGSPIINTQYVFGGGSDYKDDDDKGGASQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFVWYRQYSGKSPPELIMSIYNSGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGGGGGGGGSGVTPKHLITATGQRTVLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDALYFCASSVESHYGYTFGSGTRLTVVEDLNKAAAGGGGQKLISEEDL
20	Aga2p	리더 서열 및 Aga2p	MQLLRCSIFSVIASVLAQELTTICEQIPSPBLESTPYSLSTTTILANGKAMQGVFEYYKSVTFVSNCGSHPSTTSKGSPIINTQYVF
21	FLAG 태그	FLAG 태그 및 링커들	GGGGSDYKDDDDKGGAS
22	scTv R4P3F9	링커가 있는 R4P3F9의 단백질 가변 도메인; a 가변 도메인의 aF55S	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFVWYRQYSGKSPPELIMSIYNSGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGGGGGGGGSGVTPKHLITATGQRTVLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDALYFCASSVESHYGYTFGSGTRLTVVEDLNK
23	Myc 태그	링커 및 Myc 태그	AAAGGGGQKLISEEDL
24	scTv R4P3F9 - bQ43K	β 가변 도메인의 안정화 돌연변이 bQ43K가 있는 scTv R4P3F9	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFVWYRQYSGKSPPELIMSIYNSGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGGGGGGGGSGVTPKHLITATGQRTVLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDALYFCASSVESHYGYTFGSGTRLTVVEDLNK
25	scTv R4P3F9 - bL72S	β 가변 도메인의 안정화 돌연변이 bL72S가 있는 scTv R4P3F9	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFVWYRQYSGKSPPELIMSIYNSGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGGGGGGGGSGVTPKHLITATGQRTVLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDALYFCASSVESHYGYTFGSGTRLTVVEDLNK
26	CDRa1	aG29R	DRRSQS

[0110]

	돌연변이체1	돌연변이	
27	scTv R4P3F9S	scTv R4P3F9의 안정화된 버전	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRRSQSFFWYRQYS GKSPPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQ PDSATYLCAAYSAGSYQLTFGKGTKLSVIPGGGGSGGG GSGGGSGGGSGGGSGVTPKHLITATGQRVTLRCSP RSGDLSVYWKQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNI SERFS AQQFPDLHSELNLSLELGDALYFCASSVESSYGYTFGS GTRRLTVV
28	AGRN-001	유사한 펩티드	ALLDGRVQL
29	CLASP1- 001	유사한 펩티드	RLLDGAFKL
30	COL6A1- 001	유사한 펩티드	ILLDGSASV
31	COL6A2- 001	유사한 펩티드	FLLDGSERL
32	COL6A3- 006	유사한 펩티드	FLFDGSANLV
33	COL6A3- 008	유사한 펩티드	FLFDGSANL
34	COL6A3- 014	유사한 펩티드	FLLDGSEGV
35	VWA2-001	유사한 펩티드	FLLDGSNSV
36	VWF-001	유사한 펩티드	FLLDGSSRL
37	CDRb1 돌연변이체 1	β 사슬 - CDR1 변이체 1	ARWHNN
38	CDRb1 돌연변이체 2	β 사슬 - CDR1 변이체 2	AKDHLN
39	CDRb1 돌연변이체 3	β 사슬 - CDR1 변이체 3	ARWHRN
40	CDRb1 돌연변이체 4	β 사슬 - CDR1 변이체 4	AMDHPY
41	CDRb1 돌연변이체 5	β 사슬 - CDR1 변이체 5	ATDHYN
42	CDRb1 돌연변이체 6	β 사슬 - CDR1 변이체 6	ARYHTN
43	CDRb1 돌연변이체 7	β 사슬 - CDR1 변이체 7	APYHLN
44	CDRb1 돌연변이체 8	β 사슬 - CDR1 변이체 8	AKDHTN
45	CDRb1 돌연변이체 9	β 사슬 - CDR1 변이체 9	ARYHRN
46	CDRb1 돌연변이체	β 사슬 - CDR1 변이체	ARWHSN

[0111]

	10	10	
47	CDRb1 돌연변이체 11	β 사슬 - CDR1 변이체 11	ATDHYN
48	CDRb1 돌연변이체 12	β 사슬 - CDR1 변이체 12	RWGDLN
49	CDRb1 돌연변이체 13	β 사슬 - CDR1 변이체 13	ARDHLN
50	75-1	안정화된 scTv R4P3F9S가 있는Fab 중쇄	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQ KFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYY GSDWYFDVWGQGLTQVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTSPSPAPPVAGQKEVEQNSGPLSVPEGAIASL NCTYSDRGSQSFVWYRQYSGKSPPELIMSIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAYSAGSYQLT FGKGTKLSVLPNIQNGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSVYWKQSLDQG LQFLIQYYNGEERAKGNI SERFSAQQFPDLHSELNLSLE LGDSALYFCASSVESSYGYTFGSGTRLTVVEDLKN
51	75- Fab 중쇄	Fab 중쇄	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQ KFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYY GSDWYFDVWGQGLTQVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTSPSPAPPVAG
52	75- Fab 경쇄	Fab 경쇄	MKWVTFISLLFLFSSAYSIDIQMTQSPSSLSASVGRVTIT CRASQDIRNYLNWYQQKPKGAPKLLIYYTSRLESQVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVIVCLNNFYPR EAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTL KADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
53	1G4 α	1G4 TCR α 사슬 - 전장	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTVI PAALSVPEGENLVL NCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGR LNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVRPTSGGSYI PTFGRGTSLIVHPYIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTD FDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETD TNLNFQNLVIGFRILLLKLVAGFNLLMTLRLWSS
54	1G4 α 리더	1G4 TCR α 사슬 - 리더 펩티드	METLLGLLILWLQLQWVSSK
55	1G4 α 가변	1G4 TCR α 사슬 - 가변 도메인	QEVTVI PAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPG KGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQ PGDSATYLCAVRPTSGGSYIPTFGRGTSLIVHP
56	1G4 α 불변	1G4 TCR α 사슬 - 불변 도메인	YIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS DVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNS IIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLVIGFR ILLLKLVAGFNLLMTLRLWSS
57	1G4 β	1G4 TCR β 사슬 - 전장	MSIGLLCCAALSLLWAGFVNAGVTQTPKFQVLKQGSMTL QCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVAGITDQGEVP NGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGTGE LFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKAT

[0112]

			LVCLATGFYDPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPA LNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDE WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATIL YEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG
58	1G4 β 리더	1G4 TCR β 사슬 - 리더 펩티드	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNA
59	1G4 β 가변	1G4 TCR β 사슬 - 가변 도메인	GVTQT PKFQVLK TGGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMG LRLIHYSVGAGITDQGEV PNYNVSRTTEDFPLRLLSAA PSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVL
60	1G4 β 불변	β 사슬 - 불변 도메인	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYDPDH VELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQI VSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYA VLVSALVLMAMVKRKDSRG
61	NYESO1-001	대조 펩티드	SLLMWITQV
62	C-14 β; C-5 β	C-14; CDRb1 돌연변이체 4가 있는 C-5 TCR 전장 β 사슬	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVD SGVTQTPKHLITATGQRVTL RCSPAMDHPYVYVYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNIL ERFSAQQFPDLHSELNLSLELGD SALYFCASSVESSYGY TFGSGTRLT VVEDLNKVFPEVAVFEPSEAEI SHTQKATL VCLATGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEW TQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILY EILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDF
63	C-14 α	CDRa1 돌연변이체 1이 있는 C-14 TCR 전장 α 사슬	MKSLRVLVLIWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAI A SLNCTYSDRRSQSFFWYRQYSGKSP ELMFIYSNGDKEDG RFTAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQ LTFGKGTKLSVIPNIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTD FDSQTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETD TNLNFQNL SVIGFRILLLK VAGFNLLMFLRLWSS
64	75-5	안정화된 scTv R4P3F9S 및 CDRb1 돌연변이체 4가 있는 Fab 중쇄	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYSFTGYTMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQ KFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYY GSDWYFDVWGQGLT VTSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEP KSCDKTHTSPSPAPPVAGQKEVEQNSGPLSVPEGAIASL NCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSP ELMISIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQLT FGKGTKLSVIPNIQNGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GVTQTPKHLITATGQRVTLRCS PAMDHPYVYVYKQSLDQ LQFLIQYYNGEERAKGNISERFSAQQFPDLHSELNLSLE LGD SALYFCASSVESSYGYTFGSGTRLT VVEDLKN
65	75-14	안정화된 scTv R4P3F9S, CDRa1 돌연변이체 1 및 CDRb1 돌연변이체 4가 있는 Fab 중쇄	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYSFTGYTMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQ KFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYY GSDWYFDVWGQGLT VTSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEP KSCDKTHTSPSPAPPVAGQKEVEQNSGPLSVPEGAIASL NCTYSDRRSQSFFWYRQYSGKSP ELMISIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQLT FGKGTKLSVIPNIQNGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GVTQTPKHLITATGQRVTLRCS PAMDHPYVYVYKQSLDQ LQFLIQYYNGEERAKGNISERFSAQQFPDLHSELNLSLE LGD SALYFCASSVESSYGYTFGSGTRLT VVEDLKN

[0113]

66	75-25	β/α 방향으로 안정화된 scTv R4P3F9S, CDRa1 돌연변이체 1이 있는 Fab 중쇄	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYSFTGYTMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQ KFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYY GSDWYFDVWGQGLT VTSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEP KSCDKTHTSPSPAPPVAGQKEVEQNSGPLSVPEGAIASL NCTYSDRRSQSFFWYRQYSGKSP ELMISIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQLT FGKGTKLSVIPNIQNGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GVTQTPKHLITATGQRVTLRCS PAMDHPYVYVYKQSLDQ LQFLIQYYNGEERAKGNISERFSAQQFPDLHSELNLSLE LGD SALYFCASSVESSYGYTFGSGTRLT VVEDLKN
----	-------	--	---

[0114]

[0115]

실시예

[0116]

암 항원에 대한 미접촉 T 세포 수용체(TCR)는 바이러스성 항원을 표적으로 하는 TCR에 비해 흔히 그 친화도가 더 낮으며, 이것은 종양 면역 탈출에 대한 가능한 설명의 하나일 수 있다(Aleksic et al. 2012). 그러므로 입양

세포 요법에서 또는 가용성 접근 방식(즉, 이중특이적 분자의 사용)의 인식 모듈로 항원 인식 구조체의 사용을 위해 설계된 친화도가 더 높은 TCR 변이체를 갖는 것이 바람직하다(Hickman et al. 2016). 그리하여 본 발명은 약 60 μ M(DE102016115246)의 친화도를 갖는 중앙 관련 펩티드 COL6A3-002(서열 식별 번호 1)를 표적으로 하는 자연 발생하는 T 세포 수용체 R4P3F9(서열 식별 번호 2 및 10)의 변형 및 최적화에 관한 것이다.

[0117] **실시예 1: 안정한 scTv의 생성**

[0118] 본 발명을 위해, 이전에 조사한 TCR R4P3F9(서열 식별 번호 2 및 10)를 단일 쇠 TCR 구조체(scTv, 서열 식별 번호 22)로 전환했으며, 이는 상응하는 불변 도메인(서열 식별 번호 9 및 17)의 부분들 및 적절한 글리신-세린 링커 서열을 가진 가변 α (서열 식별 번호 4) 및 β (서열 식별 번호 12) 도메인의 조합에 의해 효모 표면 디스플레이를 통한 성숙화를 위한 것이다. 상응하는 서열의 DNA를 합성한 다음, pCT302에 근거하여 리더 서열 및 Aga2p 효모 짝짓기 단백질(서열 식별 번호 20)을 함유하는 효모 디스플레이 벡터와 함께 사카로마이세스 세레비지에 EBY100(MATa AGA1::GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2-delta200 his3-delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL)(ATCC® MYA 4941(상표))으로 형질전환했다(Boder et al., 2000). 효모에서 동종 재조합 이후 얻어진 융합 단백질(서열 식별 번호 19)은 Aga2p 단백질의 N-말단에 리더 펩티드를 포함하며, 이는 관심 대상 단백질의 디스플레이를 야기하고(Boder et al., 1997), 또한 발현 통제 및 관심 대상의 단백질 즉 scTv R4P3F9(서열 식별 번호 22) 또는 그 변이체들을 위한 링커 서열을 찾는 짧은 펩티드 태그를 포함한다. 이 형질전환은 DE102016121899에서 기술된 대로 수행되었으며 라이브러리 당 최대 10^9 개의 효모 클론을 초래했다. 라이브러리는 scTv R4P3F9의 전체 유전자 서열을 커버하는 무작위 돌연변이 PCR 접근 방식을 통해 생성되었다.

[0119] HLA-A*02의 맥락에서 COL6A3-002에 선택적으로 결합하며 가장 잘 발현하는 scTv를 갖는 효모 클론의 선택 과정은 근본적으로 Smith et al(2015)에 기술된대로 수행했다. 효모 표면에 표시되는 scTv R4P3F9 변이체의 높은 발현 및 올바른 형태를 확인하기 위해 항-Vbeta1(Beckman Coulter, 클론 BL37.2) 항체를 HLA-A*02/COL6A3-002 사합체(도 1)와 함께 사용했다. 효모 표면 디스플레이에 의한 scTv 전환은 세포 표면에서 scTv의 접합한 제시를 위한 원래의 CDR 서열과 함께 2가지의 중요한 안정화하는 돌연변이를 구조틀 영역에서 드러냈으며, 즉 이는 bQ43K(서열 식별 번호 24) 및 bL72S(서열 식별 번호 25)로 모두 β 쇠에 위치한다. 더욱이 α 쇠의 CDR1에서의 안정성 성숙화 위치 29(서열 식별 번호 5)가 글리신에서 아르기닌(CDRa1 돌연변이체 1, 서열 식별 번호 26)으로 전환되었으며, 이는 향상된 사합체 결합을 초래했다.

[0120] **실시예 2: 안정화된 scTv의 친화도 성숙화**

[0121] HLA-A*02/COL6A3-002를 향한 결합 친화도가 더 높은 scTv 분자를 생성하기 위해, 안정화 돌연변이인 aG29R, bQ43K 및 bL72S를 발현하는 과거에 확인된 안정화된 scTv R4P3F9S 골격(서열 식별 번호 27)을 사용하여 CDRb1(서열 식별 번호 13)을 축퇴시켰다. 근본적으로 과거에 기술된 내용대로 축퇴성 DNA 올리고 프라이머를 사용하여 CDRb1 잔기가 무작위배정되었다(Smith et al., 2015). 그 결과 생긴 DNA 라이브러리를 실시예 1의 기술과 같이 형질전환했다. scTv 결합 선택성을 유지하기 위해, COL6A3-002 펩티드와 높은 서열 유사성을 보이는 정상 조직(서열 식별 번호 28 내지 36)으로부터 유래하는 펩티드를 포함하는 HLA-A*02 사합체에 대한 음성 선택을 사용했다.

[0122] 친화도가 강화되고 선택적인 scTv R4P3F9S 변이체의 선택을 위해 각 분류 라운드마다 농도가 감소하는 HLA-A*02/COL6A3-002 사합체를 사용했다. 3회의 선택 라운드 후, 단일 scTv 클론을 분리하여 서열을 결정했으며 그에 따라 다양한 친화도가 성숙화된 CDRb1 서열(서열 식별 번호 37 내지 49)을 얻었다. 성숙화된 CDRb1 서열을 가진 scTv의 경우 COL6A3-002 결합이 크게 향상됨을 보여줄 수 있었던 반면 COL6A3-002 결합의 선택성이 유지되어 9개의 유사한 펩티드의 결합은 관찰되지 않았다(도 2).

[0123] **실시예 3: 이중특이적 항체-scTv 융합 단백질의 생산**

[0124] HLA-A*02/COL6A3-002에 대한 안정화되고 친화도가 성숙화된 scTv는, 자체의 자연적 특이성과는 관계 없이 T 세포의 중앙 특이적 재표적화 및 활성화를 허용하는 CD3에 반하는 항체 모이어티와의 융합으로 발현할 수 있다. 본 발명자는 scTv R4P3F9S 변이체(서열 식별 번호 50, 64, 65 및 66) 그리고 항 CD3 Fab(UCHT1) 경쇄(서열 식별 번호 52)에 융합된 항 CD3 Fab(UCHT1) 중쇄(서열 식별 번호 51)를 포함하는 이중특이성 항체-TCR 융합 단백질을 생성했다. 그에 따른 Fab-scTv 융합 단백질은 약 75 kDa의 분자량을 가진다. scTv R4P3F9S α (서열 식별 번호 5 및 26) 그리고 β 쇠(서열 식별 번호 13 및 37 내지 49)의 여러 CDR1 서열에 근거하여, 여러 Fab-scTv 융합 변이체(75-1 내지 75-25, 표 2)가 제조사의 권장 내용과 같이 일시적으로 형질주입된 ExpiCHO 세포에서 발현되었다. 단백질은 단백질 L 및 크기 배제 크로마토그래피로 정제했다. 모든 융합 변이체를 80 μ g 내지 1 mg

범위의 수율(표 2) 그리고 크기 배제 크로마토그래피(도 3)의 분석으로 예측되는 크기의 균등질로 형성된 이중 이합체로 생산될 수 있었다.

[0125] 하기 표 2는 이중특이성 Fab-scTv 융합 단백질의 명명 및 수율을 나타낸다. 이 분자들은 서열 식별 번호 50 및 52 그리고 표시된 CDRa1 및 CDRb1 변이체에 근거한다.

[0126] [표 2]

변이체	CDRa1/SEQ	CDRb1/SEQ	수율 [μg]
75-1	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	RSGDLS (서열 식별 번호 13)	267.9
75-2	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	ARWHNN (서열 식별 번호 37)	78.4
75-3	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	AKDHLN (서열 식별 번호 38)	646.7
75-4	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	ARWHRN (서열 식별 번호 39)	704.3
75-5	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	AMDHPY (서열 식별 번호 40)	397.2
75-6	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	ATDHYN (서열 식별 번호 41)	268.1
75-7	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	ARYHTN (서열 식별 번호 42)	83.2
75-8	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	APYHLN (서열 식별 번호 43)	765.7
75-9	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	AKDHTN (서열 식별 번호 44)	1067.2
75-10	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	RSGDLS (서열 식별 번호 13)	389.6
75-11	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	ARWHNN (서열 식별 번호 37)	270.4
75-12	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	AKDHLN (서열 식별 번호 38)	943.6
75-13	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	ARWHRN (서열 식별 번호 39)	560.3
75-14	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	AMDHPY (서열 식별 번호 40)	360.7
75-15	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	ATDHYN (서열 식별 번호 41)	541.5
75-16	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	ARYHTN (서열 식별 번호 42)	403.6
75-17	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	APYHLN (서열 식별 번호 43)	195.5
75-18	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	AKDHTN (서열 식별 번호 44)	731.3
75-19	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	ARYHRN (서열 식별 번호 45)	794
75-20	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	ARWHSN (서열 식별 번호 46)	85.5
75-21	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	ATDHYN (서열 식별 번호 47)	276
75-22	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	RWGDLN (서열 식별 번호 48)	255
75-23	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	ARDHLN (서열 식별 번호 49)	217
75-24 ^a	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	RSGDLS (서열 식별 번호 13)	166.6
75-25 ^a	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	RSGDLS (서열 식별 번호 13)	267

^a scTv의 β-α 방향

[0127]

[0128] **실시예 4: Fab-scTv 융합 단백질의 COL6A3-002 및 유사 펩티드와의 결합**

[0129] COL6A3-002 또는 다른 유사한 펩티드가 있는 HLA-A*02 단량체를 향하는 항-CD3-scTv R4P3F9S 융합 단백질의 결합 친화도는 생물중 간섭계로 측정했다. 제조사가 권장하는 설정값을 사용하여 Octet RED384 시스템에서 측정했다. 간단히 말하면, HLA-A*02/COL6A3-002의 일련의 희석물을 분석하기 전에 정제된 Fab-scTv 분자를 바이오센서 (FAB2G)에 로딩했다. 야생형 CDRa1 및 야생형 CDRb1을 포함하는 변이체 75-1 및 75-24에 비해, 성숙화된 CDRa1 및/또는 CDRb1 서열을 갖는 Fab-scTv 변이체에서 결합 친화도가 40배까지 증가되는 것이 관찰되었다(표 3, 도 4). HLA-A*02/COL6A3-002에 대한 결합의 선택성을 평가하기 위해, FAB2G 바이오센서에 정제된 Fab-scTv 분자를 로딩한 다음 각각 HLA-A*02와 복합체를 형성한 1 μM의 유사한 펩티드(서열 식별 번호 28 내지 36)의 결합을 사전선택했다. 성숙화된 CDRa1(서열 식별 번호 26)을 함유하는 대부분의 Fab-scTv 변이체로 결합되는 HLA-A*02/COL6A1-001(서열 식별 번호 30)을 제외하면, Fab-scTv 변이체들은 유사한 펩티드에 대한 결합을 보이지 않았으며(도 5) 이는 높은 결합 선택성을 입증한다. 일부 Fab-scTv 변이체의 경우, 비오틴화된 펩티드-HLA 복합체를 바이오센서(SA)에 로딩한 다음 Fab-scTv 변이체의 일련의 희석물을 분석하여 HLA-A*02/COL6A3-002 및 HLA-A*02/COL6A1-001이 결합 사이의 치료 창(therapeutic window)을 조사했다. 성숙화된 CDRa1(서열 식별 번호 26) 및 야생형 CDRb1(서열 식별 번호 13) 서열을 포함하는 변이체 75-10에서 HLA-A*02/COL6A1-001에 비해 HLA-A*02/COL6A3-002에 대한 결합 친화도가 8배 증가한 것을 나타낸 반면, 성숙화된 CDRb1(서열 식별 번호 39)을 포함하는 Fab-scTv 변이체 75-13에서 검출된 결합 친화도가 최대 57배 증가했으며 이는 치료 창의 향상을 입증한다(표 4, 도 6).

[0130] [표 3]

[0131] Fab-scTv 융합 단백질의 HLA-A*02/COL6A3-002에 대한 결합 친화도

변이체	KD (M)	kon (1/Ms)	koff (1/s)
75-1	8.06E-06	1.01E+05	8.17E-01
75-2	3.69E-06	1.59E+05	5.86E-01
75-3	4.92E-06	9.71E+04	4.78E-01
75-4	5.76E-06	9.78E+04	5.63E-01
75-5	4.32E-04	2.21E+03	9.55E-01
75-6	1.13E-06	2.06E+05	2.32E-01
75-7	1.79E-06	1.93E+05	3.44E-01
75-8	3.45E-06	1.36E+05	4.69E-01
75-9	1.41E-05	6.02E+04	8.51E-01
75-10	1.78E-06	1.69E+05	3.01E-01
75-11	2.82E-07	4.16E+05	1.18E-01
75-12	3.74E-07	2.67E+05	1.00E-01
75-13	4.05E-07	3.28E+05	1.33E-01
75-14	3.10E-06	8.41E+04	2.61E-01
75-15	7.78E-07	2.33E+05	1.81E-01
75-16	5.87E-07	3.37E+05	1.98E-01
75-17	2.27E-07	3.62E+05	8.20E-02
75-18	1.93E-06	1.51E+05	2.91E-01
75-19	6.00E-07	2.96E+05	1.78E-01
75-20	5.31E-07	6.08E+05	3.23E-01
75-21	5.52E-07	2.72E+05	1.50E-01
75-22	8.22E-07	2.48E+05	2.04E-01
75-23	3.24E-07	3.18E+05	1.03E-01
75-24	5.20E-06	1.08E+05	5.62E-01
75-25	8.33E-06	6.23E+04	5.19E-01

[0132]

[0133] [표 4]

[0134] HLA-A*02/COL6A3-002 및 HLA-A*02/COL6A1-001에 대한 Fab-scTv 융합 단백질의 결합 친화도 비교

변이체	pHLA-A*02	KD (M)	KD _{COL6A1-001} /KD _{COL6A3-002}
75-10	COL6A3-002	1.37E-05	8
	COL6A1-001	1.08E-04	
75-11	COL6A3-002	8.50E-07	8
	COL6A1-001	6.46E-06	
75-12	COL6A3-002	7.24E-07	12
	COL6A1-001	8.98E-06	
75-13	COL6A3-002	7.39E-07	57
	COL6A1-001	4.23E-05	
75-17	COL6A3-002	8.25E-07	9
	COL6A1-001	7.10E-06	
75-23	COL6A3-002	1.15E-06	22
	COL6A1-001	2.55E-05	

[0135]

[0136] 실시예 5: 세포 발현을 위한 친화도 성숙화된 TCR의 사용

[0137] 중앙 특이적 펩티드-HLA를 인식하는 TCR의 발현을 위한 T 세포의 변형은 암 세포로 T 세포를 재지정하는 유망한 대안이다. 성숙화된 CDR1 서열 사용이 HLA-A*02/COL6A3-002에 대해 세포결합된 TCR을 향상시킬 수 있으므로, 식별된 CDRa1 및 CDRb1 돌연변이체 서열을 TCR R4P3F9(서열 식별 번호 2 및 10)에 이식했다. 그로부터 얻은 돌연변이체 TCR 변이체(C-1 내지 C-18, 표 5)가 PCR 증폭 DNA 구조체의 시험관내 전사에 의해 생성된 해당 mRNA의 전기천공 이후 인간 CD8+ T 세포에서 발현되었다. 대조 목적을 위해 NYES01-001 펩티드(서열 식별 번호 61)에

대하여 1G4 TCR(서열 식별 번호 53 및 57)이 발현되었다. RNA-전기천공된 CD8⁺ T 세포를 하룻밤 배양한 후, PE 표지된 HLA-A*02/COL6A3-002 사합체 또는 HLA-A*02/NYES01-001 사합체로 염색하여 도입된 TCR 변이체의 발현을 분석했다. 모 TCR R4P3F9 변이체 C-1은 HLA-A*02/COL6A3-002 사합체에 대해 매우 미미한 염색을 보인 반면, 성숙화된 CDRa1 및/또는 CDRb1을 가진 R4P3F9 TCR 변이체 C-2 내지 C-18은 사합체 염색의 증가를 보였다(도 7). 여러 성숙화된 R4P3F9 TCR 변이체를 발현하는 CD8⁺ T 세포(웰당 세포 20,000개)의 기능적 활성화를, COL6A3-002(서열 식별 번호 1)의 일련의 희석 또는 10 μM의 COL6A3-002 및 유사한 펩티드(서열 식별 번호 28 내지 36)를 로딩한 T2 세포(웰당 세포 20,000개)와 공동배양 후 방출되는 IFN-γ의 수준을 측정하여 조사했다. 모 R4P3F9 TCR 변이체 C-1에 비해, 성숙화된 TCR 변이체 C-2 내지 C-18은 IFN-γ 방출의 증가를 보였으며 더 낮은 펩티드 농도에서 이미 최대 수준에 도달했다(도 8). 예상대로, TCR을 발현하지 않는 T 세포나 NYES01-001에 특이적인 1G4 대조 TCR에서는 IFN-γ 방출이 관찰되지 않았다. COL6A3-002의 성숙화된 R4P3F9 TCR 변이체 인식에 대한 선택성을 분석하기 위해, 여러 유사한 펩티드(서열 식별 번호 28 내지 36)를 로딩한 T2 세포에 반응하여 방출된 IFN-γ를 분석한 결과 성숙화된 R4P3F9 TCR 변이체에 대한 여러 선택성 프로파일이 드러났다. 가장 흥미로운 점은, 동일한 성숙화된 CDRb1(서열 식별 번호 40)을 포함하는 TCR 변이체 C-5(서열 식별 번호 62 및 2) 그리고 C-14(서열 식별 번호 62 및 63)가 COL6A1-001 또는 다른 유사한 펩티드(도 9)를 향하여 어떠한 교차반응성도 보이지 않은 것이며, 친화도 성숙화된 R4P3F9 TCR 변이체인 C-5 및 C14가 세포 TCR 기반 종양 표적화를 위한 가장 유망한 후보임이 입증되었다.

[0138] 하기 표 5는 세포 TCR 변이체의 명명을 나타낸다. 이 분자들은 서열 식별 번호 2 및 10 그리고 표시된 CDRa1 및 CDRb1 변이체에 기반한다.

[0139] [표 5]

변이체	CDRa1	CDRb1
C-1	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	RSGDLS (서열 식별 번호 13)
C-2	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	ARWHNN (서열 식별 번호 37)
C-3	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	AKDHLN (서열 식별 번호 38)
C-4	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	ARWHRN (서열 식별 번호 39)
C-5	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	AMDHPY (서열 식별 번호 40)
C-6	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	ATDHYN (서열 식별 번호 41)
C-7	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	ARYHTN (서열 식별 번호 42)
C-8	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	APYHLN (서열 식별 번호 43)
C-9	DRGSQS (서열 식별 번호 5)	AKDHTN (서열 식별 번호 44)
C-10	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	RSGDLS (서열 식별 번호 13)
C-11	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	ARWHNN (서열 식별 번호 37)
C-12	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	AKDHLN (서열 식별 번호 38)
C-13	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	ARWHRN (서열 식별 번호 39)
C-14	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	AMDHPY (서열 식별 번호 40)
C-15	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	ATDHYN (서열 식별 번호 41)
C-16	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	ARYHTN (서열 식별 번호 42)
C-17	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	APYHLN (서열 식별 번호 43)
C-18	DRRSQS (서열 식별 번호 26)	AKDHTN (서열 식별 번호 44)

[0140]

[0141] **실시예 6: COL6A3-002 및 COL6A1-001의 세포 TCR 세포 변이체에 대한 인식 창**

[0142] R4P3F9의 세포 발현 및 분석을 다음의 기술대로 수행했다. 이전의 실험과 마찬가지로(도 7), R4P3F9 TCR 변이체인 C-2 내지 C-18(PE 표지된 HLA-A*02/COL6A3-002 사합체 포함)의 염색이 모 TCR C-1에 비해 증가했다. 그 밖에 TCR 변이체인 C-12 및 C-17은 HLA-A*02/COL6A1-001에 대한 결합을 나타냈다(도 10). 성숙화된 R4P3F9 변이체들의 발현은 COL6A3-002(서열 식별 번호 1)의 일련의 희석이 로딩된 T2 세포에 반응하여 CD8⁺ T 세포의 기능적 활성화를 향상시켰으며, EC₅₀ 값이 모 TCR C-1에 비해 5배 내지 90배 더 낮았다(도 11, 표 6). 가장 낮은 EC₅₀ 값은 변이체 C-14에서 나타났다. 다시 말해서, 동일한 성숙화된 CDRb1(서열 식별 번호 40)을 포함하는 TCR 변이체 C-5(서열 식별 번호 62 및 2) 그리고 C-14(서열 식별 번호 62 및 63)는 COL6A1-001을 향해 어떠한 교차반응성도 보이지 않은 반면, 다른 변이체들은 강한 인식을 보였으며 EC₅₀ 창(COL6A3-002 대 COL6A1-001)은 최저

5배였다.

[표 6]

COL6A3-002 또는 COL6A1-001이 로딩된 T2 세포와의 공동 배양 후, R4P3F9를 발현하는 T 세포의 IFN- γ 방출에 대한 EC₅₀ 값[nM]

변이체	EC ₅₀ COL6A3- 002[nM]	EC ₅₀ COL6A1- 001[nM]
C-1	2.51	-
C-2	0.16	-
C-3	0.14	871 ^a
C-4	0.13	-
C-5	0.15	-
C-6	0.48	-
C-7	0.29	-
C-8	0.20	350
C-9	0.55	-
C-10	0.32	1.5
C-11	0.32	8.2
C-12	0.20	1.9
C-13	0.23	9.7
C-14	0.03	-
C-15	0.31	69
C-16	0.34	78
C-17	0.33	4.1
C-18	0.14	280089 ^a

^a안정기에 도달하지 않음

실시예 7: 성숙화된 R4P3F9 변이체 C-5 및 C-14의 종양 세포주에 대한 유효성

R4P3F9 변이체의 세포 발현 및 분석을 위해 기술된 대로 수행했다. 모 TCR C-1에 비해, 성숙화된 R4P3F9 변이체 C-5(서열 식별 번호 62 및 2) 및 C-14(서열 식별 번호 62 및 63)의 발현은 COL6A3-002(서열 식별 번호 1) 제시 종양 세포주에 반응하여 CD8⁺ T 세포의 기능적 활성화를 향상시켰다(도 12). 이 연구에 사용된 종양 세포주들은 다른 양의 표적 펩티드를 제시한다. SF539 세포는 세포당 약 4000개 카피의 HLA-A*02/COL6A3-002를 운반하며 SW982 세포는 세포당 약 460개 카피를 운반한다. TCR C-1은 표적-양성 세포주와의 공동배양 후 강력한 T 세포 활성화를 매개하지 않은 반면, TCR 변이체 C-14는 TCR 변이체 C-5에 비해 더 강력한 기능적 활성화의 향상을 나타냈다. 이 데이터는 TCR C-1 내지 C-5까지 및 C-14까지의 EC₅₀ 향상과 일치한다(표 6). 표적 음성 종양 세포주 MCF-7은 이들 TCR의 어느 것에 의해서도 인식되지 않았다.

참조문헌:

[0149] Aleksic et al., 2012: Different affinity windows for virus and cancer-specific T-cell receptors - implications for therapeutic strategies, Eur J Immunol. 2012 Dec; 42(12):3174-9;

[0150] Hickman et al., 2016: Antigen Selection for Enhanced Affinity T-Cell Receptor-Based Cancer Therapies, J Biomol Screen. 2016 Sep; 21(8):769-85;

[0151] Boder and Wittrup, 2000: Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability, Methods Enzymol. 2000; 328:430-44;

[0152] Boder and Wittrup, 1997: Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, Nat Biotechnol. 1997 Jun; 15(6):553-7;

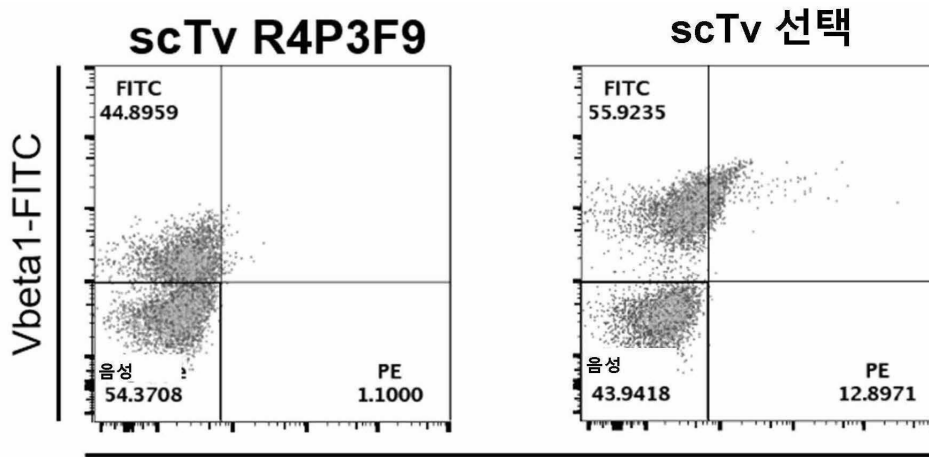
[0153] Smith et al., 2015: T Cell Receptor Engineering and Analysis Using the Yeast Display Platform, Methods Mol Biol. 2015; 1319:95-141;

[0154] DE 102016121899.5;

[0155] DE 102016115246.

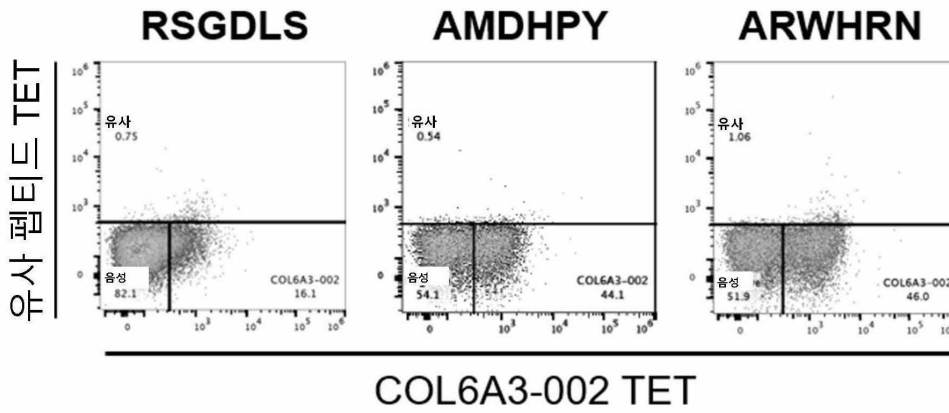
도면

도면1



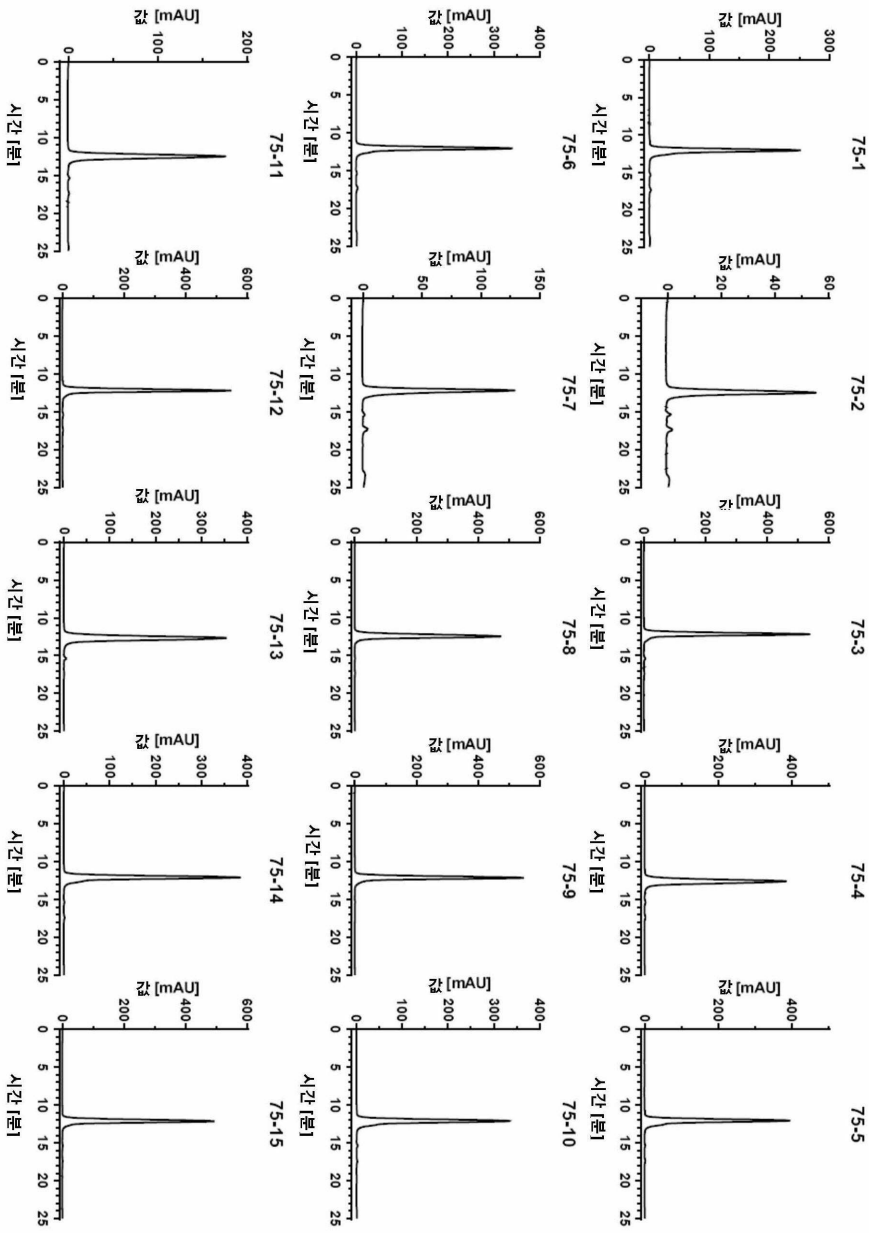
HLA-A*02/COL6A3-002 사합체-PE

도면2

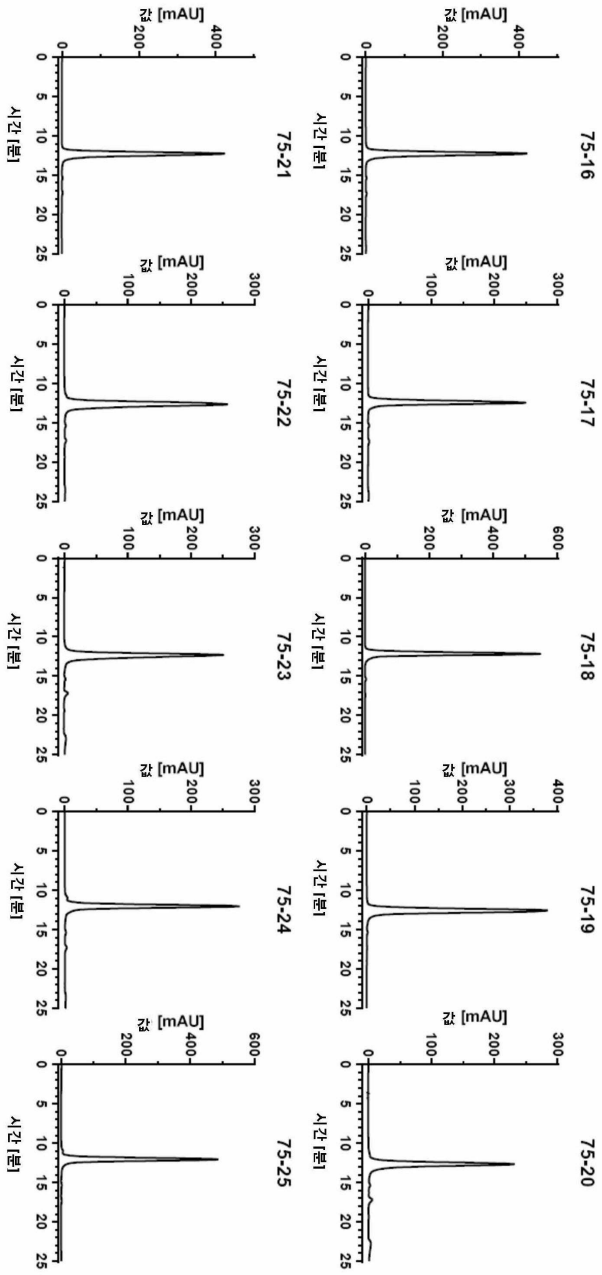


COL6A3-002 TET

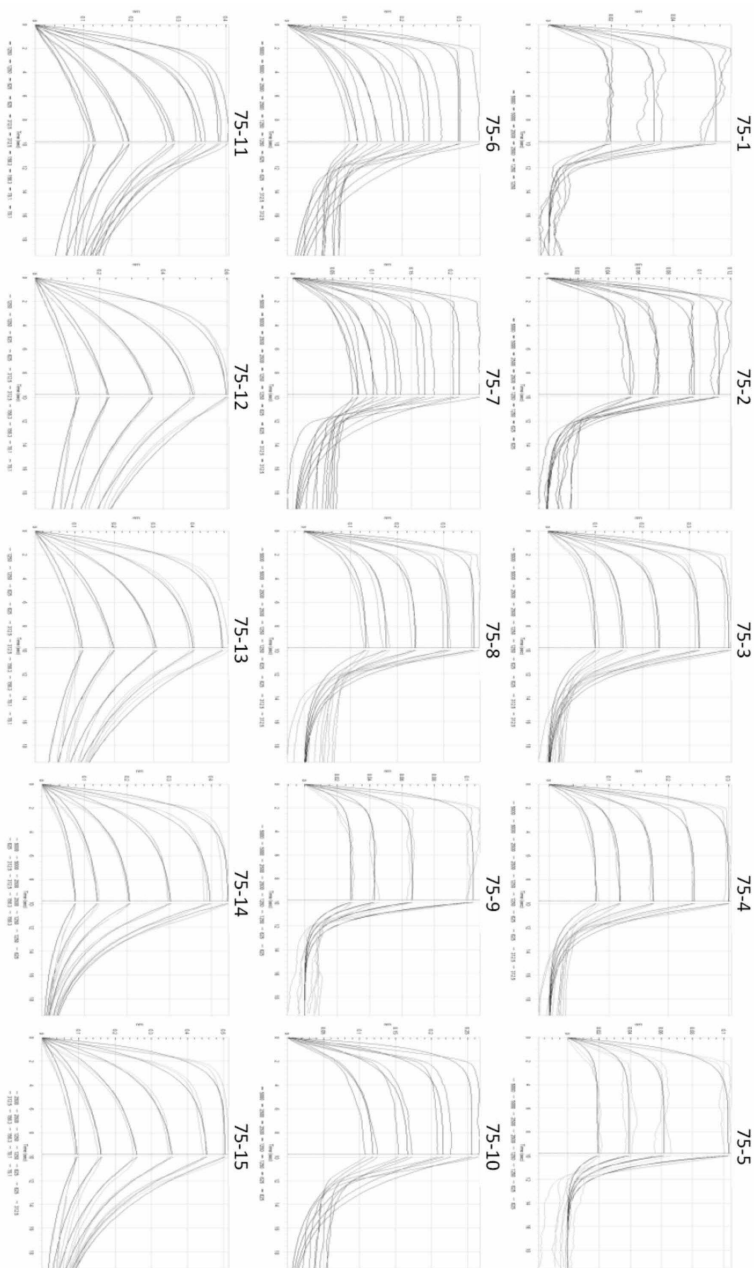
도면3a



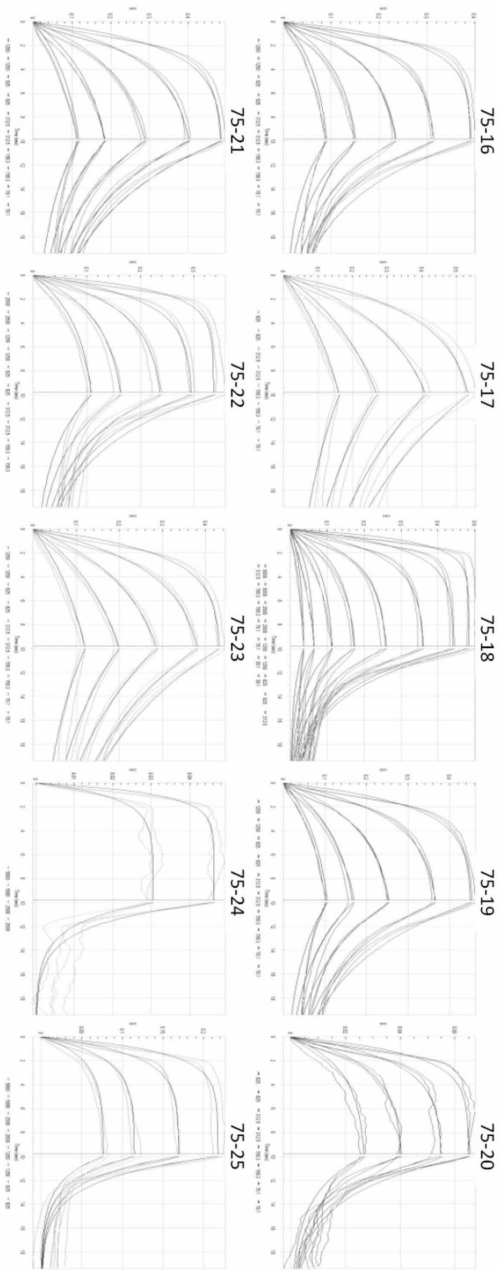
도면 3b



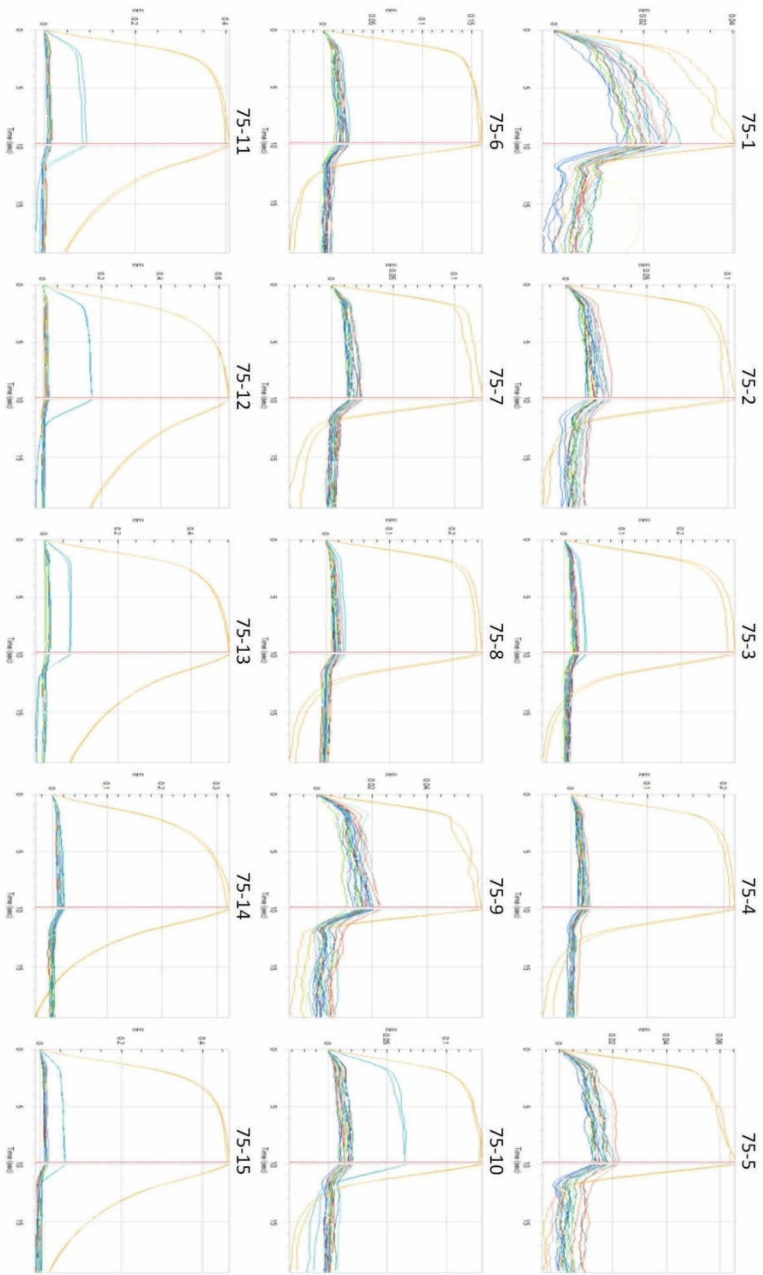
도면4a



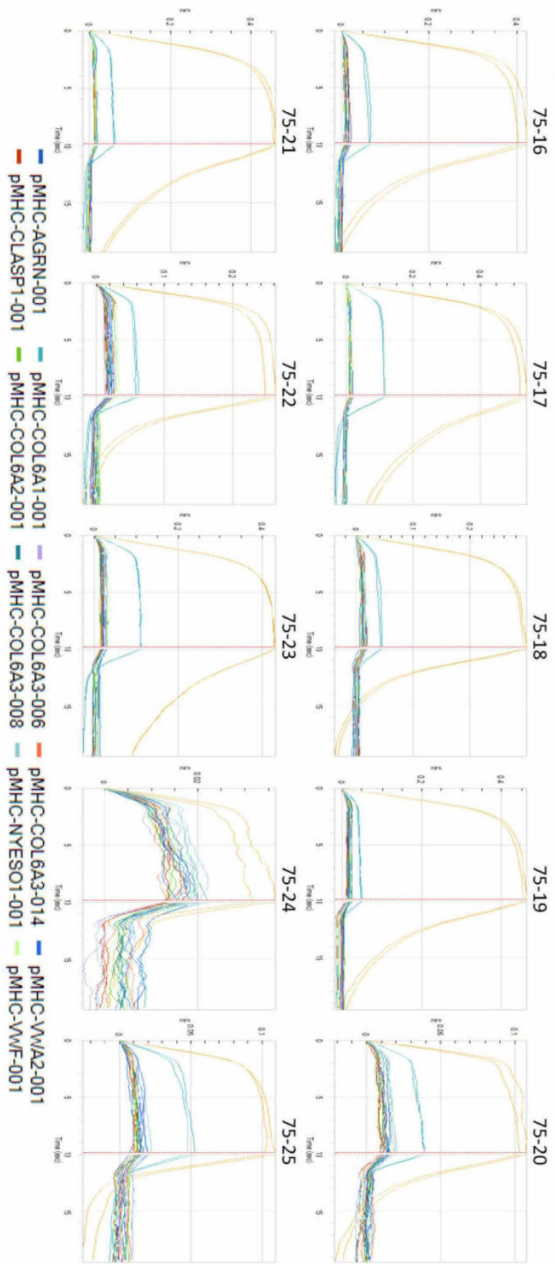
도면4b



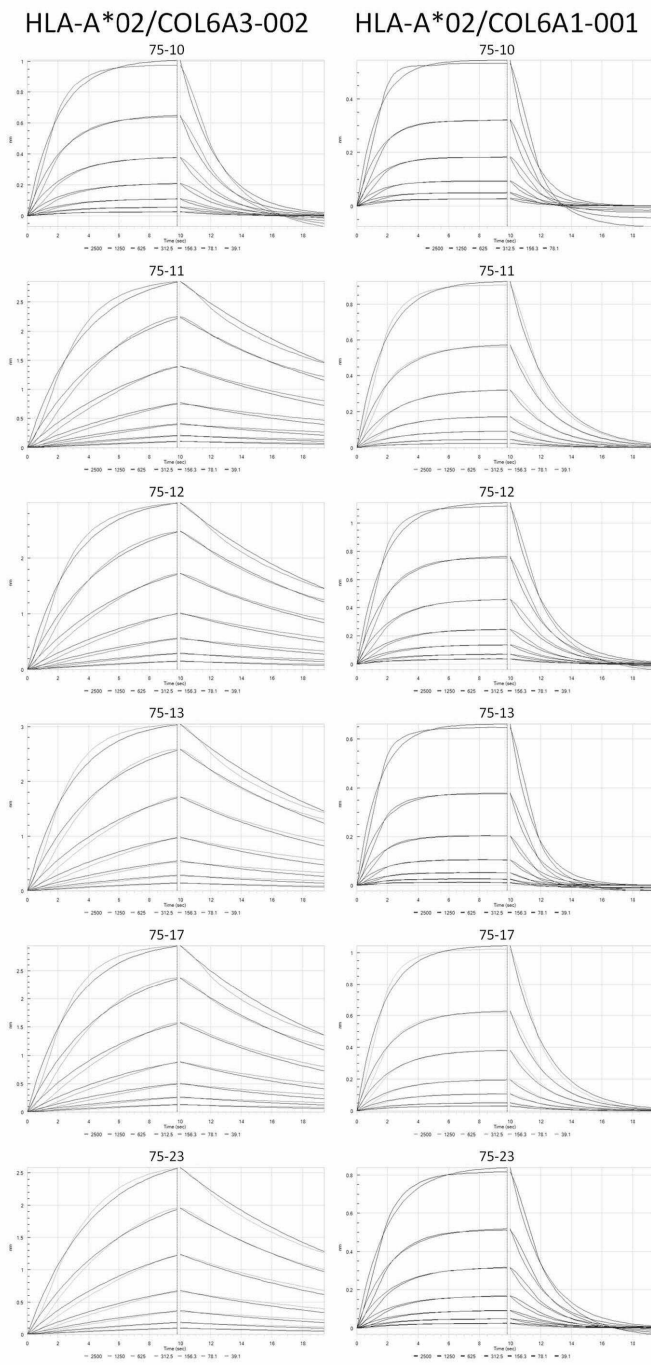
도면5a



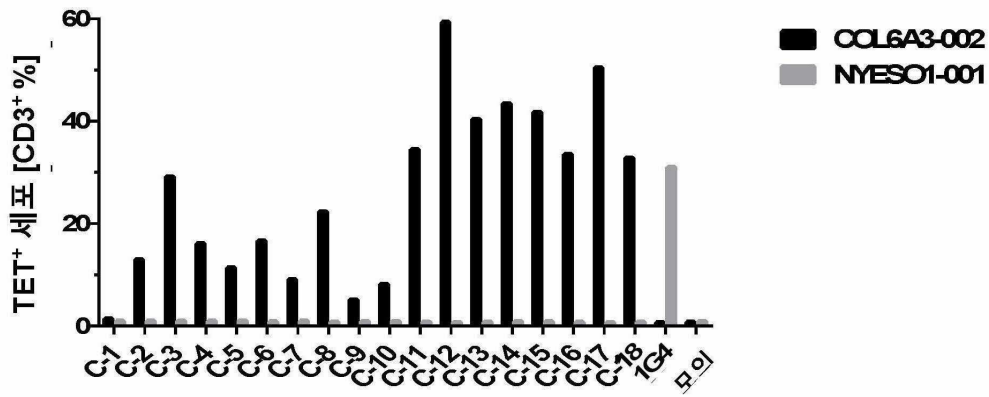
도면5b



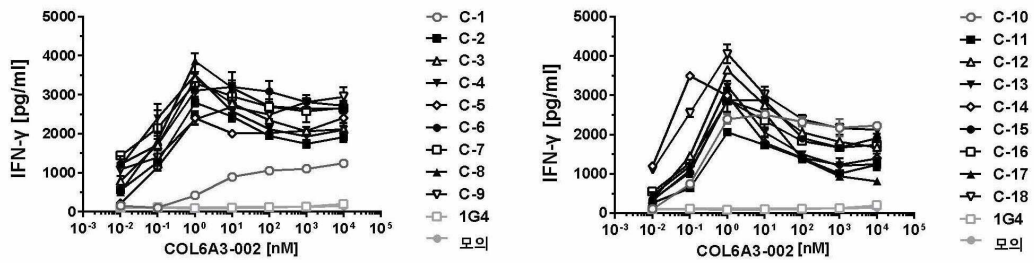
도면6



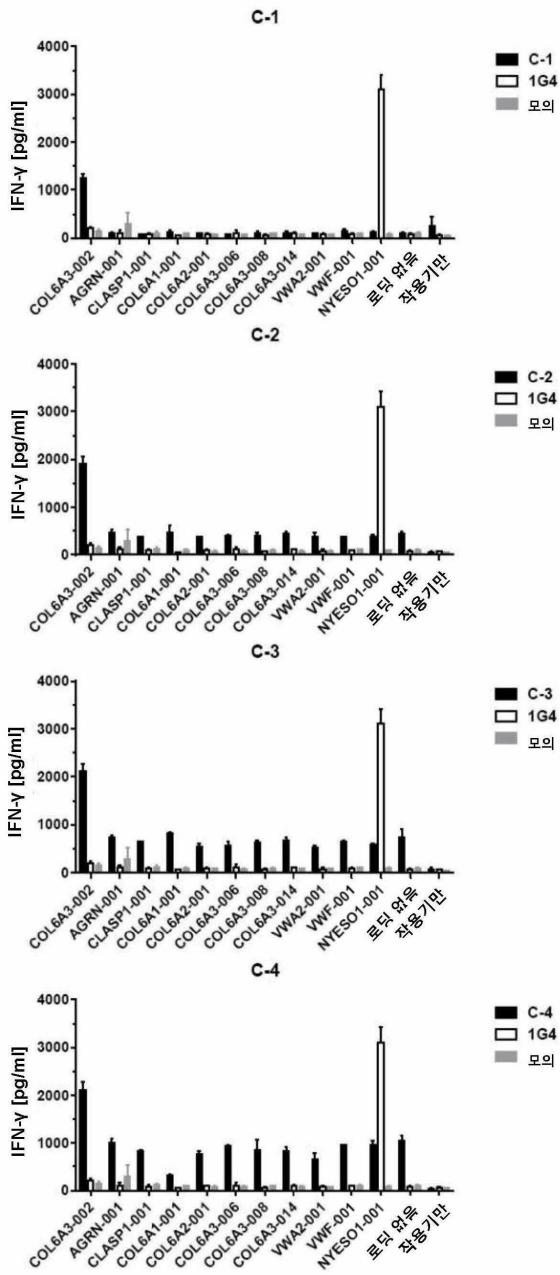
도면7



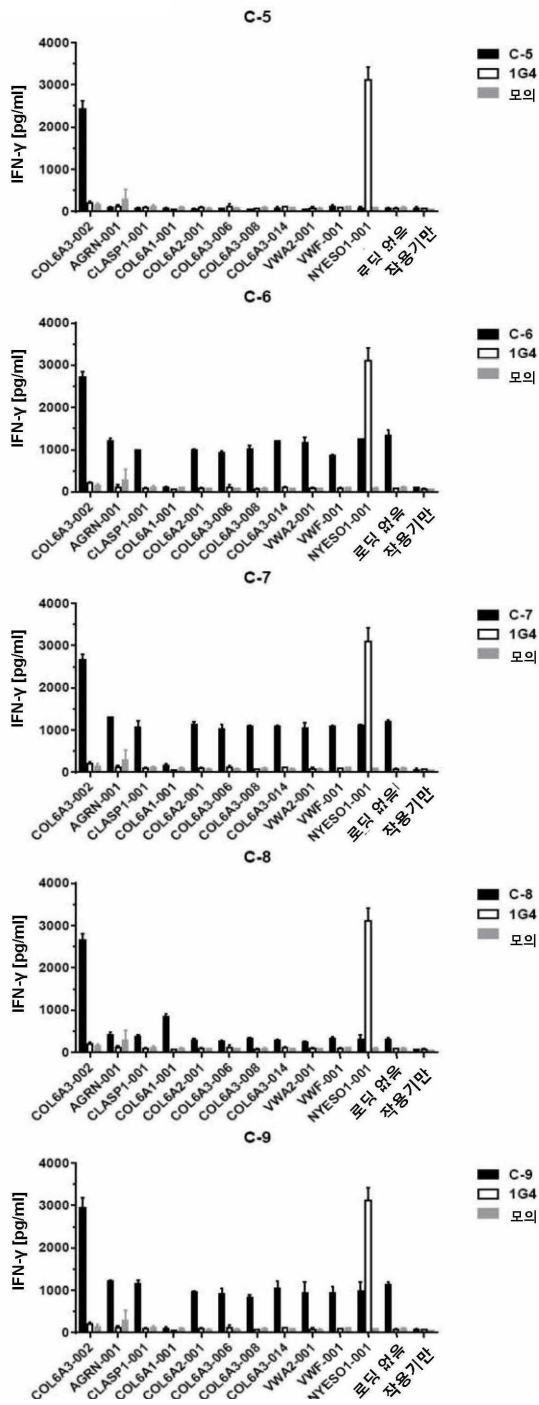
도면8



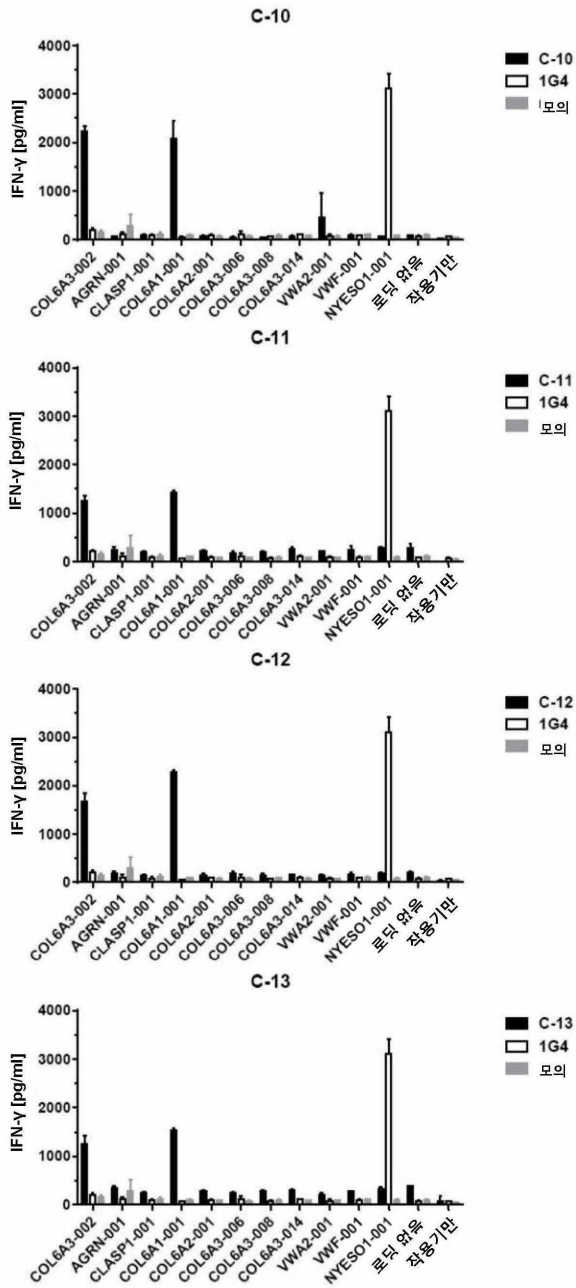
도면9a



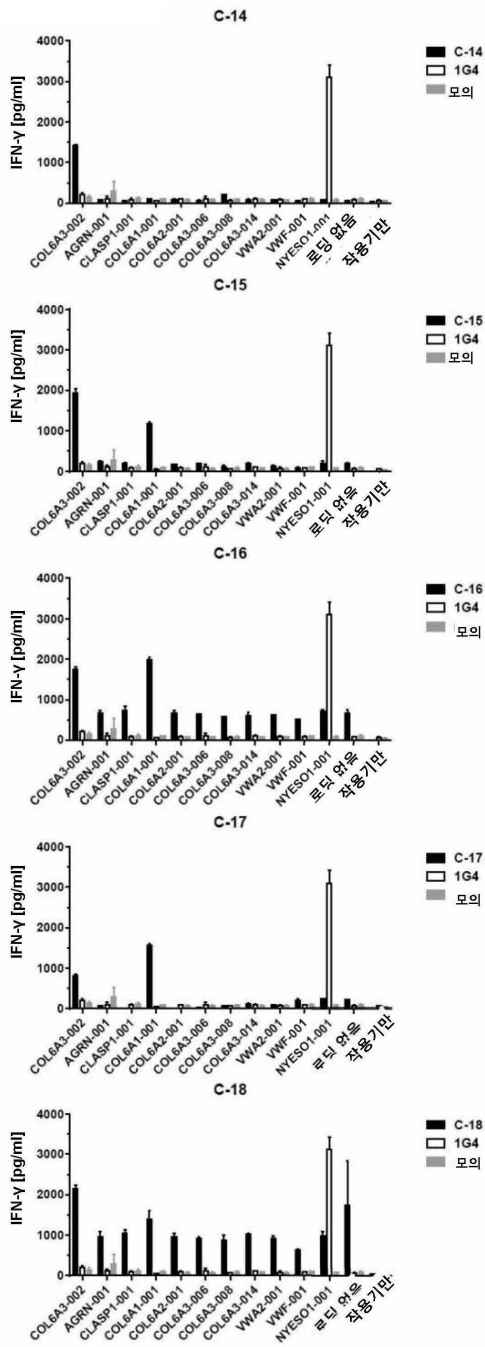
도면9b



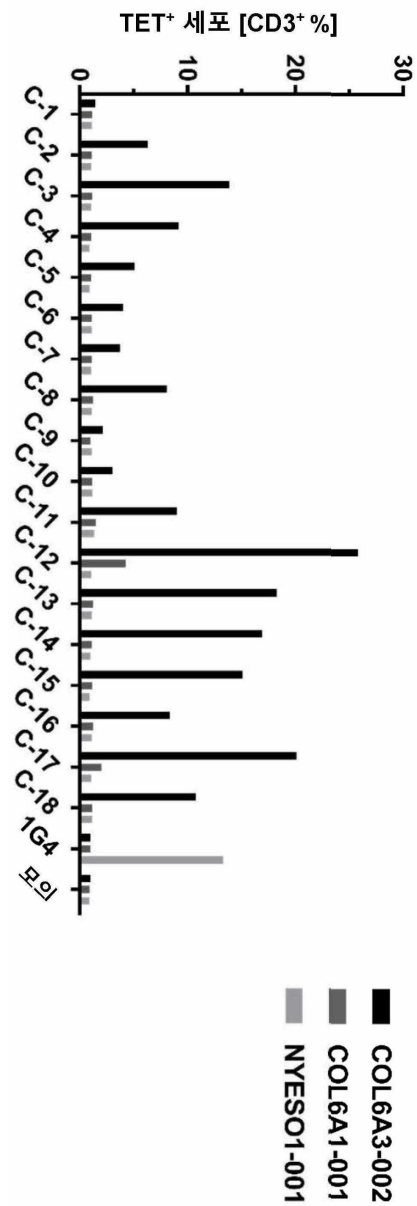
도면9c



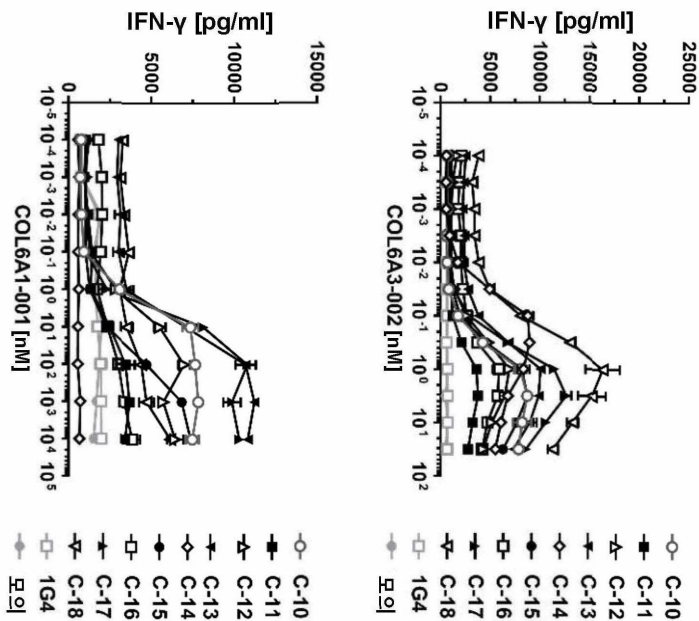
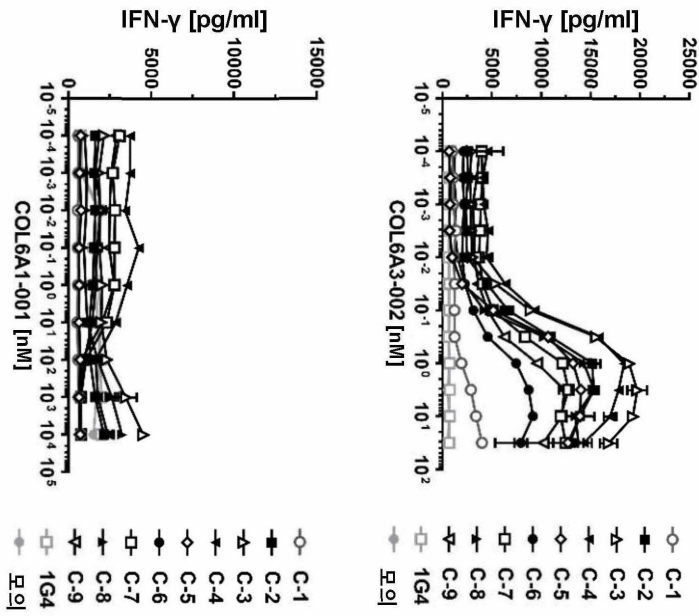
도면9d



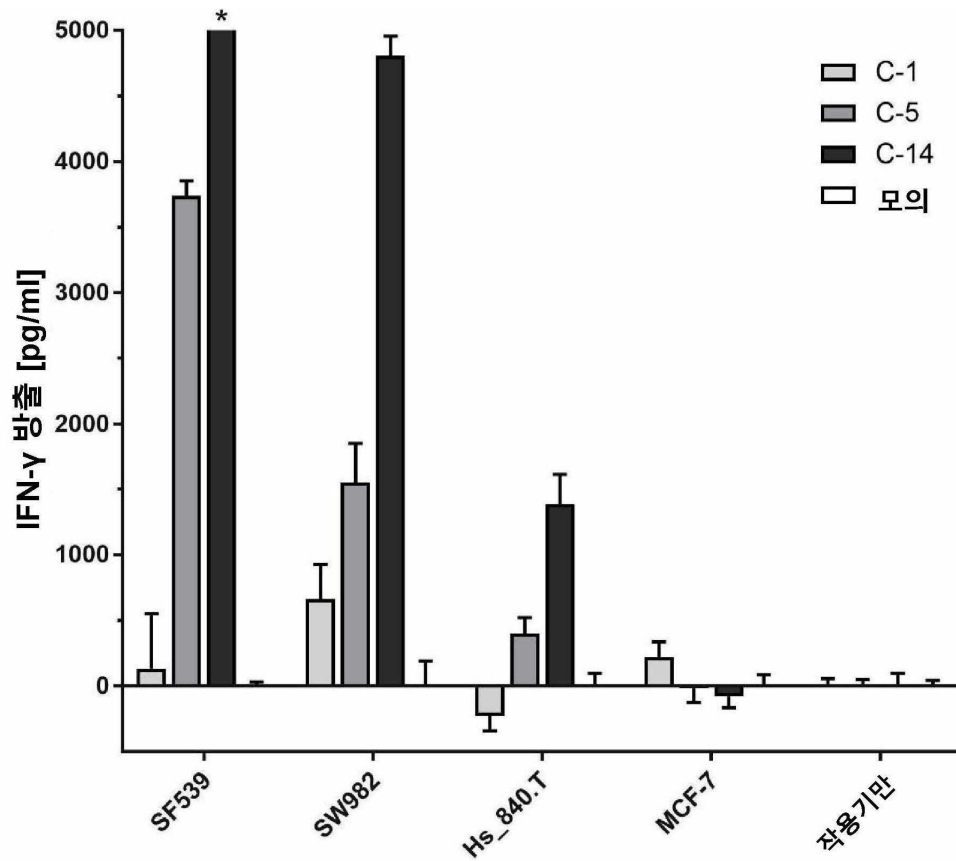
도면10



도면11



도면12



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> NOVEL ENGINEERED T CELL RECEPTORS AND IMMUNE THERAPY USING THE SAME

<130> I33054W0

<140> PCT/EP2018/080176

<141> 2018-11-05

<150> DE 10 2017 125 888.4

<151> 2017-11-06

<150> US 62/582,202

<151> 2017-11-06

<160> 66

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val

1 5

<210> 2

<

211> 274

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Tyr Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175
 Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser

180 185 190
 Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn

195 200 205
 Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro

210 215 220
 Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp

225 230 235 240
 Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu

245 250 255
 Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp

260 265 270
 Ser Ser

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser
 1 5 10 15

Trp Val Trp Ser Gln
 20

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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 Gly 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

Phe 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 Tyr Ser Gly Ala Gly
 85 90 95

Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro
 100 105 110

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Arg Gly Ser Gln Ser
 1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Tyr Ser Asn Gly Asp
 1 5

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Cys Ala Ala Tyr Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr
 1 5 10

<210> 8

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Asn Ile Gln Asn

1

<210> 10

<211> 308

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Gly Phe Arg Leu Leu Cys Cys Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Gly Pro Val Asp Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr
 20 25 30
 Ala Thr Gly Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp
 35 40 45
 Leu Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe
 50 55 60
 Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu
 65 70 75 80
 Glu Arg Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn
 85 90 95
 Leu Ser Ser Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser
 100 105 110
 Ser Val Glu Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu
 115 120 125
 Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
 130 135 140
 Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
 145 150 155 160
 Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
 165 170 175
 Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln
 180 185 190
 Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
 195 200 205
 Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
 210 215 220
 Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
 225 230 235 240

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

245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly

260 265 270

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

275 280 285

Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys

290 295 300

Arg Lys Asp Phe

305

<210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10 15

Gly Pro Val

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp Leu Ser Val

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu Glu Arg Phe

50 55 60

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

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

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

Phe

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Glu Asp Leu Asn Lys

1 5

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Glu Asp Leu Lys Asn

1 5

<210> 19

<211> 374

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val

1 5 10 15

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

 20 25 30

Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala Asn

 35 40 45

Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr Phe

 50 55 60

Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser Pro

65 70 75 80

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

 85 90 95

Asp Asp Asp Lys Gly Gly Gly Ala Ser Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn

 100 105 110

Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys

 115 120 125

Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr
 180 185 190
 Leu Cys Ala Ala Tyr Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly
 195 200 205
 Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly
 210 215 220

 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr Ala Thr Gly Gln
 245 250 255
 Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp Leu Ser Val Tyr
 260 265 270
 Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr
 275 280 285

 Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu Glu Arg Phe Ser
 290 295 300
 Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn Leu Ser Ser Leu
 305 310 315 320
 Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser
 325 330 335
 Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu
 340 345 350

 Asp Leu Asn Lys Ala Ala Ala Gly Gly Ser Gly Gly Glu Gln Lys Leu
 355 360 365
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 370
 <210> 20
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val

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 Tyr Ser Gly Ala Gly
 85 90 95
 Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro

 100 105 110
 Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His
 130 135 140
 Leu Ile Thr Ala Thr Gly Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg
 145 150 155 160
 Ser Gly Asp Leu Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly

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

 225 230 235 240
 Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys
 245 250

 <210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Ala Ala Ala Gly Gly Ser Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 1 5 10 15

Asp Leu

<210> 24

<211> 251

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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 Gly 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 Tyr Ser Gly Ala Gly

 85 90 95
Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro

 100 105 110
Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

 115 120 125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His

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

145 150 155 160
Ser Gly Asp Leu Ser Val Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Leu Asp Gln Gly

 165 170 175
Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly

 180 185 190

Asn Ile Leu Glu Arg Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser

195 200 205

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

210 215 220

Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly

225 230 235 240

Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys

245 250

<210> 25

<211> 251

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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 Gly 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 Tyr Ser Gly Ala Gly

85 90 95

Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro

100 105 110

Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His

130 135 140

Leu Ile Thr Ala Thr Gly Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg
 145 150 155 160
 Ser Gly Asp Leu Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly
 165 170 175
 Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly
 180 185 190
 Asn Ile Ser Glu Arg Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser

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

<210> 26
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Asp Arg Arg Ser Gln Ser

1 5
 <210> 27
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 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 Arg 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 Tyr Ser Gly Ala Gly

85 90 95

Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys

130 135 140

His Leu Ile Thr Ala Thr Gly Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys

180 185 190

Gly Asn Ile Ser Glu Arg Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His

195 200 205

Ser Glu Leu Asn Leu Ser Ser Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr

210 215 220

Phe Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser

225 230 235 240

Gly Thr Arg Leu Thr Val Val

245

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Leu Leu Asp Gly Arg Val Gln Leu

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Arg Leu Leu Asp Gly Ala Phe Lys Leu

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ala Ser Val

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Glu Arg Leu

1 5

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Phe Leu Phe Asp Gly Ser Ala Asn Leu Val

1 5 10

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Phe Leu Phe Asp Gly Ser Ala Asn Leu

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Glu Gly Val

1 5

<210> 35

<211> 9

<

212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Asn Ser Val

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu

1 5

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Ala Arg Trp His Asn Asn

1 5

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Ala Lys Asp His Leu Asn

1 5

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ala Arg Trp His Arg Asn

1 5

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Ala Met Asp His Pro Tyr

1 5

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Ala Thr Asp His Tyr Asn

1 5

<210> 42

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Ala Arg Tyr His Thr Asn

1 5

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Ala Pro Tyr His Leu Asn

1 5

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Ala Lys Asp His Thr Asn

1 5

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Arg Tyr His Arg Asn

1 5

<210> 46

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Ala Arg Trp His Ser Asn

1 5

<210> 47

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Thr Asp His Tyr Asn

1 5

<210> 48

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Arg Trp Gly Asp Leu Asn

1 5

<210> 49

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Ala Arg Asp His Leu Asn

1 5

<210> 50

<211> 514

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

20 25 30

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly

35 40 45

Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

50 55 60

Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys

65 70 75 80

Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala

85 90 95

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val
 355 360 365
 Ile Pro Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 370 375 380
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 385 390 395 400

Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr Ala Thr Gly Gln Arg Val
 405 410 415
 Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp Leu Ser Val Tyr Trp Tyr
 420 425 430
 Lys Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn
 435 440 445
 Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Ser Glu Arg Phe Ser Ala Gln
 450 455 460

Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn Leu Ser Ser Leu Glu Leu
 465 470 475 480
 Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser Ser Tyr
 485 490 495
 Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu
 500 505 510

Lys Asn

- <210> 51
- <211> 258
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 51

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

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser

 20 25 30

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg

 35 40 45

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

50 55 60

Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

 85 90 95

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu

 100 105 110

Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

 115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys

130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

 165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

 180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys

 195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr

 210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

<210> 57

<211> 311

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

1 5 10 15
Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu

 20 25 30
Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His

 35 40 45
Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu

 50 55 60
Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro

65 70 75 80
Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg

 85 90 95
Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser

 100 105 110
Ser Tyr Val Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg

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

 130 135 140
Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr

145 150 155 160
Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser

 165 170 175
Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro

 180 185 190
Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu

 195 200 205

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

260 265 270
 Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala
 275 280 285
 Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val
 290 295 300
 Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
 305 310

<210> 58
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 58

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

1 5 10 15
 Gly Pro Val Asn Ala
 20

<210> 59
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 59

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

Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr Ser Val

35 40 45

Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr Asn Val

50 55 60

Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser Ala Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 60

<211> 179

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

Ser Arg Gly

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val

1 5

<210> 62

<211> 308

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Thr Gly Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Ala Met Asp His

35 40 45

Pro Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe

50 55 60

Leu Ile Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu

65 70 75 80

Glu Arg Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn

85 90 95

Leu Ser Ser Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser
 100 105 110
 Ser Val Glu Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu
 115 120 125
 Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
 130 135 140
 Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
 145 150 155 160

 Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
 165 170 175
 Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln
 180 185 190
 Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
 195 200 205
 Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
 210 215 220

 Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
 225 230 235 240
 Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
 245 250 255
 Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly
 260 265 270
 Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr
 275 280 285

 Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys
 290 295 300
 Arg Lys Asp Phe
 305
 <210> 63
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63

Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser
 1 5 10 15
 Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu
 20 25 30
 Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp
 35 40 45
 Arg Arg Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser
 50 55 60
 Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu
 85 90 95
 Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala
 100 105 110
 Tyr Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Ser Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
 130 135 140
 Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
 145 150 155 160
 Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
 165 170 175
 Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
 180 185 190
 Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
 195 200 205
 Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
 210 215 220
 Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
 225 230 235 240

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

<210> 64
 <211> 515
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 64

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Ala Met Asp His Pro Tyr Val Tyr Trp
 420 425 430

Tyr Lys Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr Tyr
 435 440 445

Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Ser Glu Arg Phe Ser Ala
 450 455 460

Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn Leu Ser Ser Leu Glu
 465 470 475 480

Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser Ser
 485 490 495

Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp
 500 505 510

Leu Lys Asn
 515

<210> 65

<211> 515

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
 35 40 45

Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln

65 70 75 80

Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr
 85 90 95

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser
 355 360 365
 Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 370 375 380
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 385 390 395 400
 Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr Ala Thr Gly Gln Arg
 405 410 415
 Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Ala Met Asp His Pro Tyr Val Tyr Trp
 420 425 430
 Tyr Lys Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe Leu Ile Gln Tyr Tyr
 435 440 445
 Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Ser Glu Arg Phe Ser Ala
 450 455 460
 Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn Leu Ser Ser Leu Glu
 465 470 475 480
 Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser Ser
 485 490 495
 Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp
 500 505 510
 Leu Lys Asn
 515
 <210> 66
 <211> 515
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 66
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

Val Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe Leu Ile
 290 295 300

Gln Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Ser Glu Arg
 305 310 315 320

Phe Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn Leu Ser
 325 330 335

Ser Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Val
 340 345 350

Glu Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val
 355 360 365

Val Glu Asp Leu Lys Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 385 390 395 400

Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala
 405 410 415

Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Arg Ser Gln Ser Phe
 420 425 430

Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser
 435 440 445

Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu
 450 455 460

Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro
 465 470 475 480

Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Tyr Ser Gly Ala Gly Ser
 485 490 495

Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro Asn
 500 505 510

Ile Gln Asn
 515