



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월16일

(11) 등록번호 10-2499753

(24) 등록일자 2023년02월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)
C40B 40/02 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/70503 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7013544(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년07월26일
심사청구일자 2021년06월03일
- (85) 번역문제출일자 2021년05월04일
- (65) 공개번호 10-2021-0061439
- (43) 공개일자 2021년05월27일
- (62) 원출원 특허 10-2015-7004164
원출원일자(국제) 2013년07월26일
심사청구일자 2018년07월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/052283
- (87) 국제공개번호 WO 2014/018863
국제공개일자 2014년01월30일
- (30) 우선권주장
61/676,373 2012년07월27일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
PNAS, 2000.12.19., 97권, 26호, 14578-14583 페이지*
Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, Vol. 96,
pp.5651-5656 (1999. 5.)*
US20100113300 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
더 보오드 오브 트러스티스 오브 더 유니버시티
오브 일리노이즈
미국 61801 일리노이 어바나 사우스 라이트 스트리트 506 헨리 어드미니스트레이션 빌딩 352
- (72) 발명자
스미스, 시나 엠.
미국, 일리노이 61801, 어배너, 506 사우스 라이트 스트리트, 352 헨리 어드미니스트레이션 빌딩 내
크란츠, 데이비드 엠.
미국, 일리노이 61801, 어배너, 506 사우스 라이트 스트리트, 352 헨리 어드미니스트레이션 빌딩 내
- (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 정지혜

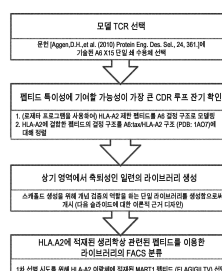
(54) 발명의 명칭 T 세포 수용체 조작

(57) 요약

신규한 특이성의 시험관내 조작을 위한 스캐폴드로서 모델 T 세포 수용체 (TCR)의 용도를 제공한다. 특이적인 펩티드-주조직적합 복합체 (MHC) 생성물에 대해 신규한 결합을 하는 TCR은 1) T 세포 수용체 단백질 코딩 서열을 돌연변이화하여 다양한 돌연변이체 집단 (라이브러리)을 생성함으로써, 2) 유도 진화 공정, 및 "디스플레이" 방

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



법 (예컨대, 효모, 파지, 포유동물 세포) 및 펩티드-MHC 리간드를 사용하는, 특이적인 펩티드-MHC를 이용한 TCR 돌연변이체의 라이브러리의 선별에 의해 분리될 수 있다. 본 공정을 반복함으로써 선택 펩티드-MHC 리간드에 대한 친화도가 개선된 TCR 변이체를 확인할 수 있다.

(52) CPC특허분류

C40B 40/02 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

야생형 T 세포 수용체로부터 유래된 V α 및 V β 를 포함하는 변형된 T 세포 수용체로서, 여기서

V α 및 V β 각각은 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하고,

V α , V β , 또는 그 둘 모두는 야생형 T 세포 수용체와 비교하여, 하나 이상의 상보성 결정 영역 (CDR)에 돌연변이를 포함하고, 변형된 T 세포 수용체는 야생형 T 세포 수용체가 결합하지 않는 비-동족 펩티드-MHC에 결합하고,

상기 비-동족 펩티드는 Mart1:HLA.A2, SL9 HIV:HLA.A2, WT-1:HLA.A2, 및 SURV:HLA.A2로 이루어진 군에서 선택되고,

야생형 T 세포 수용체는 동족 펩티드:HLA.A2에 결합하지만 비-동족 펩티드-MHC에는 결합하지 않고,

야생형 T 세포 수용체는 서열 번호 1에 기재된 V α 아미노산 서열 및 서열 번호 2에 기재된 V β 아미노산 서열을 포함하고,

상기 변형된 T 세포 수용체는 CDR1 α 31, CDR3 α 98, CDR3 β 99, CDR3 α 97, CDR3 β 102, CDR3 α 99, CDR3 β 100, CDR1 α 32, 및 CDR1 β 30 중 하나 이상에서 아미노산 치환을 포함하는, 변형된 T 세포 수용체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명의 기술분야

[0002] 본 개시내용은 T 세포 수용체 (TCR) 스캐폴드 및 TCR 라이브러리 뿐만 아니라, 변형된 TCR 및 단쇄 TCR 제조 방법, 및 치료, 진단 및 영상화 방법을 위한 그에 상응하는 TCR의 용도에 관한 것이다.

[0003] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0004] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2012년 7월 27일자 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/676,373호의 이점을 주장하며, 상기 가출원은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0005] 연방 정부 후원 연구 또는 개발에 관한 진술

[0006] 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.

[0007] 서열 목록에 관한 진술

[0008] 본 출원과 관련된 서열 목록은 서류 사본 대신 텍스트 포맷으로 제공되며, 이는 본 명세서에서 참조로 포함된다. 서열 목록을 포함하는 텍스트 파일의 파일명은 IMMU_002_01WO_ST25.txt이다. 텍스트 파일은 65 KB로서, 이는 2013년 7월 26일 작성된 것이며, 이는 EFS-Web를 통해 전자 제출되었다.

배경 기술

[0009] 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 구조적 복합체 (MHC)의 생성물과 관련하여 제시된 항원성 펩티드 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 세포에게 그의 TCR을 통하여, 세포내에서 짧은 펩티드로 프로세싱되고, 세포 내 MHC 분자에 결합하고, 펩티드-MHC 복합체 (pepMHC)로서 표면으로 전달되는, 세포에 의해 발현되는 세포내 항원 (바이러스 단백질 포함)의 전체 어레이를 인식할 수

있는 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).

[0010] TCR과 pepMHC의 상호작용은 결합 친화도 (또는 해리 속도)에 따라 다양한 상태의 활성화로 T 세포를 유도할 수 있다. TCR 인식 과정은 다양한 레퍼토리의 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 펩티드에 대하여 T 세포 활성을 자극시키기 위한 역치보다 높은 결합 친화도로 존재할 확률은 높다 (문헌 [Manning and Kranz (1999) Immunology Today, 20, 417-422]).

[0011] 현재까지, 시험관내 배양에 의해 확인된 인간 또는 마우스 T 세포로부터 단리된 야생형 TCR은 상대적으로 낮은 결합 친화도를 가지는 것으로 나타났다 ($K_D = 1-300 \mu M$) (문헌 [Davis et al. (1998) Annu Rev Immunol, 16, 523-544]). 휴선에서 발생된 T 세포는 자가-pepMHC 리간드에 대해 음성적으로 선별되며 (내성 유도), 이로써 더 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 매개하는 데 있어서 TCR과 상승 작용을 하는 공동-수용체 시스템을 진화시켰다. CD8은 특히 이 과정에서 효과적인데, 이를 통해서 친화도가 매우 낮은 (예컨대, $K_D=300 \mu M$) TCR은 강력한 항원-특이 활성을 매개할 수 있다.

[0012] 유도 진화는 특이적인 pepMHC에 대하여 더 높은 친화도를 가지는 TCR을 생성하는 데 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 펩티드-MHC 항원과의 결합에 의해 선별되었다.

[0013] 이러한 각각의 TCR-조작 접근법이 가지는 주된 문제점은 펩티드 항원 (동족 항원)에 대해 특이적인, 더 높은 고친화도의 TCR 돌연변이체, 또는 구조상 유사한 그의 변이체 개발을 위해 특이적인 펩티드 항원에 대해 반응성을 가지는 T 세포 클론으로부터 단리된 상이한 TCR을 필요로 한다는 점이다. 각종 암으로부터 300개 이상의 펩티드 항원이 정의되어 있고, 바이러스로부터의 다수의 항원이 존재하는 바, 같은 TCR은 시험관내 조작을 사용하여 구조상 매우 다른 항원 (비-동족 항원이라고 지칭됨)에 대한 TCR을 생성하기 위한 플랫폼으로서 사용될 수 있다는 점이 유리할 것이다. 본 발명은 이러한 요구 등을 다루게 된다.

발명의 내용

[0014] 본 발명의 요약

[0015] 본 발명은 예를 들어, 및 단지 일례로서, 신규한 결합 특이성을 가지는 생성물을 생성하는 데 유용한 T 세포 수용체 (TCR) 스캐폴드에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 효모, 파지, 또는 포유동물 세포의 표면 상에 디스플레이된 T 세포 수용체 단백질의 라이브러리; 원래의 TCR에 의해 인식되지 못한 비-동족 항원과의 결합에 대해 라이브러리로부터 선별된 TCR 단백질; 및 시험관내에서 선별된 TCR 단백질의 치료학적, 진단학적, 또는 영상화 적용을 위한 용도에 관한 것이다.

[0016] 본 발명의 한 측면은 야생형 T 세포 수용체로부터 유래된 $V\alpha$ 및 $V\beta$ 를 포함하는 변형된 T 세포 수용체, 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 여기서 $V\alpha$, $V\beta$, 또는 그 둘 모두는 야생형 T 세포 수용체와 비교하여, 하나 이상의 상보성 결정 영역 (CDR)에 돌연변이를 포함하고, 여기서 변형된 T 세포 수용체는 야생형 T 세포 수용체가 결합하지 않는 비-동족 펩티드-MHC에 결합하는 것인, 변형된 T 세포 수용체, 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[0017] 일 실시형태에서, 야생형 T 세포 수용체는 서열 번호 1에 기재된 $V\alpha$ 아미노산 서열 및 서열 번호 2에 기재된 $V\beta$ 아미노산 서열을 포함한다. 관련된 실시형태에서, 변형된 T 세포 수용체는 서열 번호 1에 기재된 $V\alpha$ 아미노

산 서열과 적어도 80%의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 V α , 및 서열 번호 2에 기재된 V β 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 V β 를 포함하며, 여기서 변형된 T 세포 수용체는 야생형 T 세포 수용체가 결합하는 동족 펩티드-MHC에 결합하지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 변형된 T 세포 수용체는 CDR1 α 31, CDR3 α 98, CDR3 β 99, CDR3 α 97, CDR3 β 102, CDR3 α 99, CDR3 β 100, CDR3 β 101, CDR1 α 32, CDR1 β 30, CDR3 β 98 중 하나 이상에 아미노산 치환을 포함한다. 추가로 또 다른 실시형태에서, 변형된 T 세포 수용체는 CDR2 α 51번 위치에 야생형 아미노산을 포함한다. 일 실시형태에서, 변형된 T 세포 수용체는 추가로 CDR1 α 31번 위치에 야생형 아미노산을 포함한다. 관련된 실시형태에서, 변형된 T 세포 수용체는 추가로 CD1 α 28 및 CD1 α 52번 위치에 야생형 아미노산을 포함한다.

[0018] 일 실시형태에서, 야생형 T 세포 수용체는 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단쇄 T 세포 수용체 A6-X15이다. 또 다른 실시형태에서, 비-동족 펩티드-MHC는 Mart1:HLA.A2, SL9 HIV:HLA.A2, WT-1:HLA.A2, 또는 SURV:HLA.A2를 포함한다. 관련된 실시형태에서, 변형된 T 세포 수용체는 1) 서열 번호 33, 41, 또는 42 중 하나에 기재된 아미노산 서열의 V α 영역과 적어도 90%의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 V α 영역, 및 2) 서열 번호 33, 41, 또는 42 중 하나에 기재된 아미노산 서열의 V β 영역과 적어도 90%의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 V β 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 아미노산 서열은 서열 번호 33, 41, 또는 42 중 하나에 기재되어 있다.

[0019] 또 다른 실시형태에서, 변형된 T 세포 수용체는 돌연변이체 T 세포 수용체의 효모 디스플레이 라이브러리의 시험관내 선별에 의해 생성된 것이다. 일 실시형태에서, 야생형 T 세포 수용체는 인간의 것이다. 또 다른 실시형태에서, 변형된 T 세포 수용체는 단쇄 T 세포 수용체이다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 야생형 T 세포 수용체는 HLA-A2에 결합한다. 일 실시형태에서, 변형된 T 세포 수용체를 코딩하는 폴리펩티드를 제공한다. 관련된 실시형태에서, 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 측면은 야생형 T 세포 수용체로부터 유래된 V α 및 V β 를 포함하는 변형된 T 세포 수용체, 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 여기서 V α 는 서열 번호 34의 아미노산 잔기 140 내지 256을 포함하고, 여기서 V β 는 서열 번호 34의 아미노산 잔기 1 내지 122를 포함하는 것인, 변형된 T 세포 수용체, 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 측면은 야생형 T 세포 수용체로부터 유래된 V α 및 V β 를 포함하는 변형된 T 세포 수용체, 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 여기서 V α 는 서열 번호 43의 아미노산 잔기 140 내지 255를 포함하고, 여기서 V β 는 서열 번호 43의 아미노산 잔기 1 내지 122를 포함하는 것인, 변형된 T 세포 수용체, 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0022] 본 발명의 한 측면은 a) 야생형 T 세포 수용체, 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 단리시키는 단계; b) 돌연변이체 T 세포 수용체, 또는 그의 항원 결합 단편이 야생형 T 세포 수용체와 비교하여 하나 이상의 상보성 결정 영역에 돌연변이를 포함하는 것인, 돌연변이체 T 세포 수용체, 또는 그의 항원 결합 단편의 라이브러리를 생성하는 단계; c) 표면 디스플레이 시스템에서 돌연변이체 T 세포 수용체를 발현시키는 단계; 및 d) 비-동족 펩티드-MHC에 결합하는 돌연변이체 T 세포 수용체를 선별하는 단계를 포함하는, 원하는 특이성을 가지는 T 세포 수용체, 또는 그의 항원 결합 단편을 조작하는 방법을 제공한다.

[0023] 일 실시형태에서, 야생형 T 세포 수용체는 서열 번호 1에 기재된 V α 아미노산 서열 및 서열 번호 2에 기재된 V β 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 야생형 T 세포 수용체는 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단쇄 T 세포 수용체 A6-X15이다. 일 실시형태에서, 표면 디스플레이 시스템은 효모 디스플레이 시스템이다. 또 다른 실시형태에서, 비-동족 펩티드-MHC는 Mart1:HLA.A2, SL9 HIV:HLA.A2, WT-1:HLA.A2, 또는 SURV:HLA.A2이다. 일 실시형태에서, 본 방법은 추가로 친화도 성숙 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 비-동족 항원에 특이적인 더 높은 친화도를 가지는 TCR을 조작하기 위한 단일 스캐폴드의 합리적인 디자인 방법을 보여주는 다이어그램이다.

도 2a는 A6 TCR:pepMHC 복합체 (A6; PDB:1A07)의 구조 단면도를 보여주는 3차원 다이어그램이다. α 쇄 및 β 쇄의 가변 (V) 및 불변 (C) 영역이 표시되어 있다. 제시되어 있는 구조에는 A6 TCR의 C α 영역은 포함되어 있지 않다. HLA-A2 (α 1, α 2, α 3, 및 β 2m)은 회색으로 표시되어 있고, Tax 펩티드 (LLFGYPVYV; 서열 번호 5)는 검은색으로 표시되어 있다.

도 2b는 펩티드-MHC (Tax-HLA.A2) 상의 CDR의 풋프린트를 보여주는 3차원 다이어그램이다.

도 3는 A6 wt 및 5개의 예측 구조에서 상응하는 펩티드의 3.0 Å 이내에 존재하는 가장 많이 조우하는 5개의 잔기의 풋프린트의 오버레이이다.

도 4a는 V α 2-함유 TCR의 결정 구조를 도시하고, TCR CDR1 α 및 CDR2 α 루프 중의 예측상 중요한 MHC 접촉 위치를 보여주는 것이다 (문헌 [Borbulevych et al. (2011) J Immunol, 187, 2453-63]으로부터 변형).

도 4b는 고친화도 A6 TCR X15, 및 각각은 4개의 잔기 중 하나에 알라닌 치환을 가지는 것인 4개의 변이체의, 다양한 농도의 Tax (LLFGYPVYV, 서열 번호 5):HLA-A2 이량체 (BD 파르미젠(BD Pharmingen)으로부터 입수한 다이머X(DimerX))에의 결합을 보여주는 것이다.

도 5는 A6 V β (서열 번호 2) 및 V α (서열 번호 1) 영역의 아미노산 서열을 보여주는 것으로서, 회색으로 음영 표시된 위치는 축퇴성 라이브러리가 안정화된 변이체 A6-X15 (서열 번호 3)에서 구축된 것을 나타낸다. 각 V 도메인의 CDR은 표지화되어 있고, 효모 디스플레이 벡터 중 두 V 영역을 연결하는 링커의 서열 또한 제시되어 있다.

도 6은 효모 디스플레이를 사용한 단쇄 T 세포 수용체 (scTCR)의 개략도이다.

도 7은 인간 A6 X15 scTCR의 축퇴성 라이브러리인 RD1 라이브러리로부터 선별된, 10개의 클론에 대한 아미노산 서열 정렬을 보여주는 것이다.

도 8은 동족 항원 (Tax:HLA.A2)을 이용한 분류 후, RD1 라이브러리의 유세포 분석 히스토그램을 보여주는 것이다. 회색은 오직 2차 항체로만 염색된 효모 세포를 나타낸다.

도 9는 비-동족 항원 (Mart1:HLA.A2)을 이용한 분류 후, RD1 라이브러리의 유세포 분석 히스토그램을 보여주는 것이다. 회색은 오직 2차 항체로만 염색된 효모 세포를 나타낸다.

도 10a는 동족 리간드, Tax (LLFGYPVYV; 서열 번호 5):HLA-A2 이량체를 이용한 4차 분류 후 단리된 6개의 클론에 대한 서열 정렬을 보여주는 것이다.

도 10b는 축퇴성 위치의 6개의 RD1 스캐폴드 변이체에 대한 DNA 서열 정렬을 보여주는 것이다. 각 코돈 하단에는 NNS 라이브러리 내의 가능한 코돈 조합 개수와 함께 상기 코돈에 의해 코딩되는 아미노산이 제시되어 있다.

도 11a는 N-말단 태그에 대한 항-HA 항체로의 양성 염색을 도시한 히스토그램으로서, 이는 AGA2 융합체의 표면 발현을 나타내는 것이다. 세포를 항-HA 항체 및 염소 항-마우스 IgG 알렉사 647 2차 항체 (검은색 선 히스토그램) 또는 대조군으로서 오직 2차 항체로만 (회색으로 채운 히스토그램) 염색하였다. HA 염색된 세포에 대한 음성 피크 (검은색 선)는 모든 효모 디스플레이에서 관찰되었고, 이는 플라스미드를 상실한 효모에 기인하는 것이며, 이는 각각의 유도된 효모 샘플에 대한 내부 대조군으로서의 역할을 한다.

도 11b는, 상기 클론에는 C-말단 c-myc 태그가 없기 때문에, c-myc에 대해 음성 염색을 나타내는 히스토그램이다. 세포를 닭 항-c-myc 항체 및 염소 항-닭 IgY 알렉사 647 2차 항체 또는 대조군으로서 오직 2차 항체로만 (회색) 염색하였다.

도 11c는 명시된 농도로 다양한 농도의 선택 동족 항원, Tax:HLA.A2 이량체로의 A6-X15 클론 염색을 보여주는 히스토그램이다.

도 11d는 다양한 농도의 비-선택 비-동족 항원, Mart1:HLA.A2로의 A6-X15 클론 염색을 보여주는 히스토그램이다.

도 11e는 4-500 nM에서의 다양한 농도의 펩티드:HLA.A2 이량체 Tax 또는 Mart1 펩티드:HLA.A2 이량체로의 염색으로부터의 평균 형광 강도 (MFI)의 플롯이다.

도 12a는 비-동족 리간드, Mart1 (ELAGIGILTV; 서열 번호 7):HLA-A2 이량체를 이용한 5차 분류 후 단리된 5개의 클론에 대한 서열 정렬을 보여주는 것이다.

도 12b는 축퇴성 위치의 5개의 RD1 스캐폴드 변이체에 대한 DNA 서열 정렬을 보여주는 것이다. 각 코돈 하단에는 NNS 라이브러리 내의 가능한 코돈 조합 개수와 함께 상기 코돈에 의해 코딩되는 아미노산이 제시되어 있다.

도 13a는 N-말단 태그에 대한 항-HA 항체로의 클론의 양성 염색을 보여주는 히스토그램으로서, 이는 AGA2 융합체의 표면 발현을 나타내는 것이다. 세포를 항-HA 항체 및 염소 항-마우스 IgG 알렉사 647 2차 항체 (검은색 선

히스토그램) 또는 대조군으로서 오직 2차 항체로만 (회색으로 채운 히스토그램) 염색하였다.

도 13b는, 상기 클론이 C-말단 c-myc 태그를 포함하기 때문에, c-myc로의 양성 염색을 나타내는 히스토그램이다. 세포를 닭 항-c-myc 항체 및 염소 항-닭 IgY 알렉사 647 2차 항체 또는 대조군으로서 오직 2차 항체로만 (회색) 염색하였다.

도 13c는 명시된 농도로 다양한 농도의 선택 비-동족 항원, Mart1:HLA.A2 이량체로의 A6-S5-4 클론 염색을 보여주는 히스토그램이다.

도 13d는 다양한 농도의 비-선택 동족 항원, Tax:HLA.A2로의 A6-S5-4 클론 염색을 보여주는 히스토그램이다.

도 13e는 4-500 nM에서의 다양한 농도의 펩티드:HLA.A2 이량체 Mart1 또는 Tax 펩티드:HLA.A2 이량체로의 염색으로부터의 평균 형광 강도 (MFI)의 플롯이다.

도 14는 스캐폴드 A6 단쇄 TCR 야생형 A6 V α 및 V β 영역, 및 RD1 라이브러리로부터 단리된 2개의 고친화도 변이체의 아미노산 서열을 보여주는 것으로서, 이는 라이브러리 중에 5개의 축퇴성 위치를 포함한다. 2개의 클론은 Tax (클론 S4-3; 단쇄 안정화된 TCR A6-X15와 동일; 서열 번호 3), 및 Mart1 (클론 S5-4; 서열 번호 33)을 이용한 선별로부터 단리된 것이다. X는 임의의 아미노산을 나타낸다. 별표는 야생형 A6 구조에 어떤 링커도 존재하지 않는 위치를 표시하기 위해 사용된 것이다.

도 15a는 비-동족, 선택 항원인 MART1 (ELAGIGILTV; 서열 번호 7)/HLA.A2을 이용한 분류 후, RD1-MART1-S5-4 CDR3 라이브러리의 유세포 분석 히스토그램을 보여주는 것이다.

도 15b는 200 nM, 1 μ M, 및 5 μ M MART1 (ELAGIGILTV; 서열 번호 7)/HLA.A2 UV-교환 단량체, 이어서, PE-컨쥬게이트된 스트렙타비딘을 이용한, CDR3 친화도 성숙 라이브러리를 위한 주형으로서 사용된 RD1-MART1-S5-4 클론의 염색을 보여주는 히스토그램이다.

도 15c는 200 nM, 1 μ M, 및 5 μ M MART1 (ELAGIGILTV; 서열 번호 7)/HLA.A2 UV-교환 단량체, 이어서, PE-컨쥬게이트된 스트렙타비딘을 이용한, RD1-MART1-S5-4 CDR3 라이브러리의 2차 분류 후에 단리된 RD1-MART1^{hi} 클론의 염색을 보여주는 히스토그램이다.

도 16a는 10 nM MART1/HLA-A2 이량체 (BD 파르미젠으로부터 입수한 다이머X) 및 양성 대조군으로서 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체로 염색된 RD1-MART1 클론을 보여주는 히스토그램이다. 회색은 오직 2차 항체로만 염색된 효모 세포를 나타낸다.

도 16b는 500 nM 널(null) Tax/HLA-A2 이량체 (BD 파르미젠으로부터 입수한 다이머X) 및 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체로 염색된 RD1-MART1^{hi} 클론을 보여주는 히스토그램이다.

도 16c는 500 nM 널 WT1/HLA-A2 이량체 (BD 파르미젠으로부터 입수한 다이머X) 및 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체로 염색된 RD1-MART1^{hi} 클론을 보여주는 히스토그램이다.

도 16d는 500 nM 널 서비빈/HLA-A2 이량체 (BD 파르미젠으로부터 입수한 다이머X) 및 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체로 염색된 RD1-MART1^{hi} 클론을 보여주는 히스토그램이다.

도 17a-d는 먼저 펩티드 없이 (도 17a), Tax (도 17b), WT1 (도 17c), 또는 MART1 (도 17d)과 함께 인큐베이션된 후, 이어서, 비오틴-표지화된 RD1-MART1^{hi} TCR과 함께 인큐베이션된 인간 T2 (HLA-A2+) 세포의 유세포 분석식 분석을 보여주는 일련의 히스토그램이다.

도 17e는 RD1-MART1^{hi} TCR의 친화도 (K_D 값)가 28 nM 이상이라는 것을 보여주는 적정을 도시한 선 그래프이다.

도 18은 스캐폴드 A6 단쇄 TCR (야생형), 및 라이브러리에 5개의 축퇴성 위치를 포함하는 것인, RD1 라이브러리로부터 단리되고, 친화도 성숙된 고친화도 변이체의 아미노산 서열을 보여주는 것이다. 클론 중 2개는 Tax (클론 RD1-Tax-S4-3; 안정화된 TCR A6-X15의 단쇄와 동일) 및 MART1 (클론 RD1-MART1-S5-4)을 이용한 선별로부터 단리되었다. RD1-MART1-S5-4 CDR3 친화도 성숙 라이브러리로부터 선별된 고친화도 클론이 제시되어 있다 (RD1-MART1^{hi}). X는 임의의 아미노산을 나타낸다. 별표는 야생형 A6 구조에 어떤 링커도 존재하지 않는 위치를 표시한다.

도 19a는 MART1 (ELAGIGILTV; 서열 번호 7)/HLA.A2 (PDB: 1JF1) (문헌 [Sliz et al. (2001) J Immunol, 167, 3276-84]) 및 WT1 (RMFPNAPYL; 서열 번호 9)/HLA.A2 (PDB: 3HPJ) (문헌 [Borbulevych et al. (2010) Mol Immunol, 47, 2519-24]) 결정 구조의 오버레이에 아주 근접한 A6:Tax (LLFGYPVYV; 서열 번호 5)/HLA.A2 결정 구조 (PDB: 1A07)의 3차원 다이어그램이다. 굵은체로 표시된 위치 (TCR α D27, G29, 및 S99; TCR β L99 및 W100)는 NNK 핵산 조성에 기초하여 축퇴성인 위치가 되었다. TCR α Q31은 야생형 잔기인 글루타민 또는 트레오닌이 선택될 수 있는 2원 위치이다. CDR3 β 의 100-103 위치는 4개의 인접한 잔기가 A6 야생형 (AGGR, 서열 번호 44) 또는 A6-X15 (MSAQ, 서열 번호 45)로서 선택될 수 있는 2원성이다.

도 19b는 선택 동족 항원 Tax/HLA.A2를 이용한 분류 후, RD2 라이브러리의 유세포 분석 히스토그램을 보여주는 것이다. 회색은 오직 2차 항체로만 염색된 효모 세포를 나타낸다.

도 19c는 비-동족 항원 MART1/HLA.A2를 이용한 분류 후, RD2 라이브러리의 유세포 분석 히스토그램을 보여주는 것이다.

도 20은 선별 전 다양성을 보이는 인간 A6 scTCR의 제2 세대 축퇴성 라이브러리 (RD2)로부터 단리된 5개의 클론에 대한 서열 정렬을 보여주는 것이다.

도 21a는 RD2 라이브러리의 3차 분류 후 선별되고, 2 μ M MART1/HLA.A2 UV-교환 단량체, PE-컨쥬게이트된 스트렙타비딘으로 염색된, RD2-MART1-S3-3 클론을 보여주는 히스토그램이다.

도 21b는 RD2 라이브러리의 3차 분류 후 선별되고, 2 μ M MART1/HLA.A2 UV-교환 단량체, PE-컨쥬게이트된 스트렙타비딘으로 염색된, RD2-MART1-S3-4 클론을 보여주는 히스토그램이다.

도 21c는 RD2 라이브러리의 3차 분류 후 선별되고, 2 μ M 널 Tax/HLA.A2 UV-교환 단량체, PE-컨쥬게이트된 스트렙타비딘으로 염색된, RD2-MART1-S3-3 클론을 보여주는 히스토그램이다.

도 21d는 RD2 라이브러리의 3차 분류 후 선별되고, 2 μ M 널 Tax/HLA.A2 UV-교환 단량체, PE-컨쥬게이트된 스트렙타비딘으로 염색된, RD2-MART1-S3-4 클론을 보여주는 히스토그램이다.

도 21e는 스캐폴드 A6 단쇄 TCR 및 MART1을 이용한 RD2 라이브러리 선별로부터 단리된 고친화도 변이체의 서열을 보여주는 것이다. A6 TCR의 야생형 A6 V α 및 V β 영역의 서열 (문헌 [Garboczi et al. (1996) Nature, 384, 134-141]), 고친화도의 단쇄 변이체 A6-X15 (문헌 [Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72]), 및 MART1을 이용한 선별로부터 단리된 2개의 클론 (클론 RD2-MART1-S3-3 및 클론 RD2-MART1-S3-4)의 서열이 제시되어 있다.

도 22는 대체 스캐폴드인 인간 TCR T1-S18.45의 아미노산 서열을 보여주는 것이다.

도 23a는 MART-1 펩티드 (1 μ M) 또는 널 펩티드인 SL9 (1 μ M)가 미리 적재된 항원 제시 세포주 T2 (HLA-A2+) 상에서의 비오틴화된 T1-S18.45 scTv의 적정을 보여주는 히스토그램이다. 세포를 명시된 바와 같이, 3.9 nM, 7.8 nM, 15.2 nM, 31.1 nM, 62.5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M, 및 5 μ M 비오틴화된 T1-S18.45 scTv로 염색한 후, SA:PE로 염색하였다. 제시된 데이터는 4회에 걸쳐 수행된 실험의 대표값이다.

도 23b는 scTv-비오틴 농도에 대하여 플롯팅된, 도 23a의 히스토그램의 평균 형광 단위 (MFU) 값을 보여주는 선 그래프이다.

도 24는 스캐폴드 라이브러리로부터 단리된 고친화도의 단쇄 TCR의 예시적인 치료학적 적용을 도시한 다이어그램이다. 도 24a는 가용성 치료학적 생성물로서 사용하기 위한 TCR의 포맷의 5가지 예를 보여주는 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) 프레임 내에서 단쇄 Fv (VL-링커-VH)와 함께 연결된 단쇄 TCR.

도 24b는 1) 키메라 항원 수용체 (CAR) 중 단쇄 수용체로서, 및 2) 전장의 α 및 β TCR로서 입양 T 세포 요법에서 T 세포에 의한 발현을 위해 포유동물 세포 벡터 내로 삽입된 TCR 스캐폴드를 사용하여 고친화도 결합을 위해 효모 디스플레이에 의해 단리된 가변 도메인 (V)을 보여주는 것이다.

서열의 간단한 설명

서열 번호 1은 A6 TCR의 V α 영역의 아미노산 서열이다.

서열 번호 2는 A6 TCR의 V β 영역의 아미노산 서열이다.

서열 번호 3은 단쇄 TCR A6-X15 및 동일한 클론 RD1-Tax-S4-3 및 RD1-Tax-S4-5의 아미노산 서열이다.

서열 번호 4는 RD1 라이브러리의 아미노산 서열이다.

서열 번호 5는 Tax 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 6은 Mart1-9mer 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 7은 Mart1-10mer 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 8은 SL9 HIV 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 9는 WT-1 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 10은 서비빈(Survivin) 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 11은 NY-ESO-1 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 12는 PPI 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 13은 MDM2 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 14는 HBE183 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 15는 gp100 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 16은 MUC1 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 17은 MAGE A3 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 18은 HER-2/neu 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 19는 EGFRvIII 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 20은 CEA 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 21은 RD1 라이브러리의 링커의 아미노산 서열이다.

서열 번호 22-31은 RD1 라이브러리의 클론 번호 1-10의 아미노산 서열이다.

서열 번호 32는 클론 RD1-Tax-S4-1, 및 동일한 클론 RD1-Tax-S4-2, RD1-Tax-S4-4, 및 RD1-Tax-S4-6의 아미노산 서열이다.

서열 번호 33은 클론 RD1-Mart1-S5-1, 및 동일한 클론 RD1-Mart1-S5-2, RD1-Mart1-S5-3, RD1-Mart1-S5-4, RD1-Mart1-S5-5, 및 RD1-Mart1-S5-6의 아미노산 서열이다.

서열 번호 34는 클론 RD1-Mart1^{3J}의 아미노산 서열이다.

서열 번호 35는 RD2 라이브러리의 아미노산 서열이다.

서열 번호 36-40은 RD2 라이브러리의 클론 번호 1-5의 아미노산 서열이다.

서열 번호 41은 클론 RD2-Mart1-S3-3의 아미노산 서열이다.

서열 번호 42는 클론 RD2-Mart1-S3-4의 아미노산 서열이다.

서열 번호 43은 클론 T1-S18.45의 아미노산 서열이다.

서열 번호 44는 A6 야생형 TCR의 CDR3 중 100-103번 위치의 아미노산 서열이다.

서열 번호 45는 A6-X15의 CDR3 중 100-103번 위치의 아미노산 서열이다.

서열 번호 46은 문헌 [Kessels et al. ((2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97, 14578-14583)]에 의해 변형된 TCR의 동족 항원의 아미노산 서열이다.

서열 번호 47은 문헌 [Kessels et al. ((2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97, 14578-14583)]에 의해 변형된 TCR

의 구조상 유사한 펩티드의 아미노산 서열이다.

서열 번호 48은 효모 및 E. 콜라이(*E. coli*), 둘 모두에 대하여 최적화된 RD1 유전자의 5' 영역의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호 49는 효모 및 E. 콜라이, 둘 모두에 대하여 최적화된 RD1 유전자의 3' 영역의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호 50은 pCT302 오버행을 부가하는 데 사용되는 정방향 프라이머의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호 51은 pCT302 오버행을 부가하는 데 사용되는 역방향 프라이머의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호 52는 CDR3 β 1 라이브러리를 생성하는 데 사용되는 정방향 프라이머의 폴리뉴클레오티드 서열이다 (스플라이스 4L(Splice 4L)).

서열 번호 53은 CDR3 β 1 라이브러리를 생성하는 데 사용되는 역방향 프라이머의 폴리뉴클레오티드 서열이다 (스플라이스 4L).

서열 번호 54는 CDR3 β 1 라이브러리를 생성하는 데 사용되는 정방향 프라이머의 폴리뉴클레오티드 서열이다 (T7).

서열 번호 55는 CDR3 β 1 라이브러리를 생성하는 데 사용되는 역방향 프라이머의 폴리뉴클레오티드 서열이다 (T7).

서열 번호 56은 CDR3 β 2 라이브러리를 생성하는 데 사용되는 정방향 프라이머의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호 57은 CDR3 β 2 라이브러리를 생성하는 데 사용되는 역방향 프라이머의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호 58은 CDR3 α 라이브러리를 생성하는 데 사용되는 정방향 프라이머의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호 59는 CDR3 α 라이브러리를 생성하는 데 사용되는 역방향 프라이머의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호 60은 RD2 라이브러리 서열에 부가되는 N-말단 DNA 측면 서열의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

서열 번호 61은 RD2 라이브러리 서열에 부가되는 C-말단 DNA 측면 서열의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 하기 설명은 본 개시내용의 이해를 돕기 위한 것이며, 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [0026] 일반적으로, 본원에서 사용되는 용어 및 어구는 그의 관련 기술분야에 알려져 있는 의미를 가지며, 이는 통상의 기술자에게 공지된 표준 교재, 저널 참고 문헌 및 맥락을 참조함으로써 살펴볼 수 있다. 하기 정의는 본 개시내용의 맥락에서의 그의 구체적인 용도를 명확하게 하기 위해 제공된다.
- [0027] 본원에서 사용되는 바, "연결된"이라는 것은 공유 또는 비-공유 회합될 수 있는, 두 기 사이의 회합을 의미한다. 기는 다양한 길이의 펩티드 쇠, 비-아미노산 화학기 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 수단을 사용하여 연결될 수 있다. 링커 영역은 단백질 또는 펩티드의 두 작용성 또는 구조적 도메인을 작동가능하게 연결시키는 아미노산 서열일 수 있다.
- [0028] 본원에서 사용되는 바, "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.
- [0029] 본원에서 사용되는 바, "유효량"이라는 용어는 예컨대, 제약상 유효량 또는 치료학상 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.
- [0030] 본원에서 사용되는 바, "암 세포"라는 용어는 관련 기술분야에서 광범위하게 이해되는 바와 같은 정의를 포함한다. 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, 피부

암, 난소암, 백혈병, 폐암, 간암, 고환암, 식도암, 및 다른 유형의 암을 포함한다.

- [0031] 본원에서 사용되는 바, "동족 항원"이라는 용어는 원래의 TCR이 그에 결합하고, 그에 대하여 특이성을 가지는 것으로 나타난 항원을 의미한다. 유사하게, "비-동족 항원"이라는 용어는 TCR이 결합하지도 않고, 그에 대해 특이성을 가지지도 않는 항원을 의미한다. 더욱 구체적으로, "동족" 펩티드란, 주조직적합 복합체 (MHC)에 의해 코딩된 단백질과의 복합체의 일부일 때, 원래의 TCR의 결합이 이루어지는 항원성 펩티드를 의미한다. "비-동족" 펩티드란, MHC에 의해 코딩된 단백질과의 복합체의 일부일 때, 원래의 TCR의 결합이 이루어지지 않는 펩티드를 의미한다.
- [0032] "야생형" 및 "wt"라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 이는 동족 항원에 대한 특이성을 가지는, 천연적으로 발생된 또는 비-변형된 TCR, 예컨대, 원래의 또는 모체 T 세포 클론으로부터 단리된 가변 영역을 코딩하는 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 TCR과 관련하여 사용된다.
- [0033] 아미노산 서열을 제공하는 도 및 표에서, 야생형은 "wt"로 표시된다. 상단 서열 아래 제공된 서열에서, 대시(-) 표시는 아미노산이 wt 또는 정렬 중 상단 서열에 제공된 것과 동일하다는 것을 의미한다. 문자는 상기 위치에서 상단 서열로부터 치환이 이루어졌다는 것을 나타낸다.
- [0034] 본원에서 사용되는 바, "변형된," "변이체," "돌연변이체," "돌연변이화된" 및 "유래된"이라는 용어는 하나 이상의 돌연변이를 가지는 것으로서, 원래의 T 세포로부터 단리된 것으로서, 가변 영역의 TCR 서열을 의미한다. 변형된 TCR의 예로는 더 높은 친화도를 가지는 TCR 및 비-동족 항원에 대하여 결합 특이성을 가지는 TCR을 포함한다.
- [0035] 코돈 서열은 단백질의 아미노산 서열, 또는 기능적인 RNA, 예컨대, tRNA 또는 rRNA를 코딩하는 유전자 또는 cDNA의 일부이다.
- [0036] 보체 또는 상보성 서열은 왓슨 크릭(Watson-Crick) 염기쌍 형성 법칙에 따라 뉴클레오티드의 또 다른 서열과 수소 결합 이중체를 형성하는 뉴클레오티드의 서열을 의미한다.
- [0037] 하류란 DNA 또는 RNA 중의 상대적인 위치를 의미하고, 이는 가닥의 3' 단부쪽 영역이다.
- [0038] 발현이란 유전자의 구조 RNA (rRNA, tRNA) 또는 메신저 RNA (mRNA)로의 전사, 및 이어서, mRNA의 단백질로의 번역을 의미한다.
- [0039] 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.
- [0040] 상동성이란 두 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 동일성 정도를 의미한다.
- [0041] 구체적으로 예시된 TCR 서열과 기능적으로 등가인 아미노산 서열은 단일 또는 다중 아미노산 치환에 의해, 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 것인 아미노산 서열이다. 기능적으로 등가인 뉴클레오티드 서열은 구체적으로 예시된 세포 결합 또는 가용성 TCR 단백질과 실질적으로 동일한 생물학적 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 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 응집체를 형성하지 않음).
- [0042] "단리된"이라는 용어는 인공적으로 천연 상태에서부터 변경된 조성물, 화합물, 물질, 또는 분자를 의미한다. 예를 들어, 자연적으로 발생된 조성물 또는 물질이 그의 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, 그의 자연 상태의 공존하는 물질로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 단리된 것이다.
- [0043] 핵산 구축물은 천연적으로 발생된 유전자로부터 단리되었거나, 다르게는 자연상에는 존재하지 않는 방식으로 조합되고, 병치된 핵산 세그먼트를 함유하도록 변형된 핵산 분자이다.
- [0044] 핵산 분자는 3'-5'-포스포디에스테르 결합에 의해 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드를 함유하는 단일 또는 이중 가닥 선형 폴리뉴클레오티드를 의미한다.
- [0045] 연결 성질이, 서로 비교하여 두 서열의 정상적인 기능에 영향을 줄 수 있는 서열의 능력을 방해하지 않는다면,

두 DNA 서열은 작동가능하게 연결되어 있는 것이다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열에 영향을 줄 수 있다면, 프로모터 영역은 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다.

- [0046] 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산의 선형 중합체이다.
- [0047] "프로모터"라는 용어는, 일반적으로 길이가 80-120 염기쌍이고, 유전자의 개시 부위의 상류에 위치하는 것으로서, RNA 중합체가 그에 결합하여 올바른 전사를 개시할 수 있는, 시스-작용 DNA 서열을 의미한다. 전사 조절을 작동/비작동시키고/거나, 하류 코딩 서열의 발현 증진 (증가)시키는 추가의 전사 조절 서열이 회합되어 있을 수 있다.
- [0048] 재조합 핵산 분자, 예를 들어, 재조합 핵산 분자는 2개 이상의 비상동성 DNA 분자의 결합을 통해 시험관내에서 형성된 신규한 핵산 서열 (예를 들어, 1개 이상의 클로닝 부위로 클로닝된 외래 DNA의 하나 이상의 삽입체를 함유하는 재조합 플라스미드)이다.
- [0049] "형질변환" 및 "형질감염"이라는 용어는 세포의 게놈의 대상체 세포의 게놈 내로의 흡수 및 통합을 유도하는, 상이한 유전자형의 또 다른 세포로부터의 정제된 재조합 DNA의 외부 적용에 의한 세포의 게놈의 지정된 변형을 의미한다. 박테리아에서, 재조합 DNA는 전형적으로 박테리아 염색체 내로 통합되지 않고, 대신 플라스미드로서 자율적으로 복제된다. "형질전환된" 또는 "형질감염된"이라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0050] 상류란 DNA 또는 RNA 중 임의 부위의 5'측 상의 것을 의미한다.
- [0051] 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 일반적으로 선별가능한 마커, 예컨대, 항생제 저항성을 코딩하는 유전자, 및 대개 삽입된 DNA의 발현을 위한 인식 서열 (예컨대, 프로모터)을 포함한다. 일반 벡터는 플라스미드 벡터 및 과지 벡터를 포함한다.
- [0052] 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. 상기 범위는 야생형의 친화도인 10^{-4} 내지 10^{-6} M로 보고된 값 내지 유도 진화에 의해 단리된 값 (약 10^{-12} M) 사이인 친화도를 포함한다.
- [0053] 시토키인은 다른 세포에 영향을 주는 세포에 의해 제조된 단백질, 펩티드 또는 당단백질이다.
- [0054] 포유동물로는 인간 및 비-인간 포유동물, 둘 모두를 포함한다.
- [0055] 유전자 코드의 축퇴성에 기인하여 기능상 등가인 다수의 뉴클레오티드 서열이 동일한 아미노산 서열을 코딩한다는 것은 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다.
- [0056] T 세포 수용체
- [0057] T 세포 수용체 (TCR)는 T 세포의 표면 상에서 쌍을 형성하여 이중이량체 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 철저히 연구되고 있다. α 및 β 쇄는 각각 2개의 도메인: 세포막 중의 단백질을 고정시키고, CD3 신호전달 기구의 불변 서브유닛과 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 주조 직적합 복합체에 의해 코딩된 단백질에 결합된 항원성 펩티드 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.]).
- [0058] TCR의 분자 유전학을 통해, 조합되어 V 도메인의 코딩 영역을 형성하는 다중 유전자 사이의 유전자 재조합 과정이 밝혀졌다. 상기 과정은, 중쇄 및 경쇄 유전자가 재배열됨으로써 B 세포로부터 유래된 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 $J\beta D\beta$

J β 유전자 재배열의 접합부는 각 쇄의 CDR3 루프를 코딩하고, 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 세포만이 존재하기 때문에 인간에서는 달성가능한 다양성을 훨씬 초과한다 (문헌 [Mason (1998) Immunol Today, 19, 395-404]). 상기 루프는 V 유전자 내에서 코딩되고, TCR에서는 생체내 체세포 돌연변이가 일어나지 않는 바, 각 쇄의 가능한 CDR1 및 CDR2 다양성은 V 유전자의 개수로 표현된다. 비록 CDR3 루프와 비교하여, CDR1 및 CDR2 루프의 다양성이 상대적으로 제한되기는 하지만, 펩티드 항원 및/또는 MHC 생성물에 기초하여 특정 V 영역에 대한 선택이 이루어지는 예가 다수 존재한다.

[0059]

부류 I MHC 생성물은 길이가 8 내지 10개의 아미노산인 펩티드에 결합하고, 이는 체내 모든 유핵 세포 상에서 발견된다 (문헌 [Rock and Goldberg (1999) Annu Rev Immunol, 17, 739-79]에 의해 리뷰). 항체-항원 상호작용의 결합 에너지들은 모두 외래 항원에 집중되는 반면, TCR-펩티드: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 제공하는 데, 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]).

[0060]

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 항체 Fc 영역, 독성 약물, 또는 항체 scFv, 예컨대, 항-CD3 항체)를 부착시킴으로써 (소위 더 높은 친화도를 가지는 TCR이라고 불리는) 펩티드-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 U S A, 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 통해서도 또한 그로써 그의 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 300개 이상의 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]). 이들 종양 항원으로는 돌연변이화된 펩티드, 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 상기 부류의 항원을 인식하도록 진화된 것인 바, 이는 치료제에 대한 이상적인 후보 물질이 된다.

[0061]

유사하게, TCR은 감염된 세포에서 천연적으로 프로세싱되고, 세포 표면 상의 MHC 분자에 의해 디스플레이된 바이러스 단백질로부터 유래된 펩티드를 검출할 수 있다. HIV 및 HTLV 중 바이러스 게놈으로부터 유래된 펩티드를 비롯한, 다수의 바이러스 항원 표적은 지난 25년간에 걸쳐 확인되었다 (예컨대, 문헌 [Addo et al. (2007) PLoS ONE, 2, e321]; [Tsonides et al. (1994) J Exp Med, 180, 1283-93]; [Utz et al. (1996) J Virol, 70, 843-51]). 그러나, 상기 질환을 앓는 환자에는 감염된 세포의 결합 및 파괴를 위해 최적인 TCR이 없을 수도 있다. 최종적으로, TCR은 고도로 특이적인 과정에서 자가면역 표적의 수용체 길항체로서, 또는 국소 면역 세포 반응을 면역억제시키는 전달체로서 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]).

[0062]

변형된 T 세포 수용체

[0064]

유도 진화는 특이적인 pepMHC에 대하여 더 높은 친화도를 가지는 TCR을 생성하는 데 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 조작하여 TCR의 돌연변이체의 친화도가 동족 pepMHC (즉, T 세포가 그에 대해 특이적인 것인 원래의 항원)에 대해 증가된 친화도를 가지도록 하는 것인 단계를 포함한다. 따라서, 야생형 TCR은 하나 이상의 CDR에 돌연변이 유발된 라이브러리를 제조하기 위한 주형으로서 사용되었고, 이어서, 더 높은 친화도를 가지는 돌연변이체는 동족 펩티드-MHC 항원과의 결합에 의해 선별되었다.

- [0065] 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]). 상기 시스템은 더 높은 친화도를 가지는 TCR, 단쇄 항체, 피브로넥틴, 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 단쇄 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 이중이량체로서 (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 V α 2로 명명되는 인간 V α 영역의 이례적으로 우수한 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 포맷의 시험관내에서 조작된 고친화도 T 세포 수용체를 사용하여, 효모의 표면 상에서, 및 E. 콜라이로부터의 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 펩티드 (펩티드: Tax₁₁₋₁₉, 서열 번호 5)에 특이적인 A6 scTv, 및 인간 면역결핍 바이러스 Gag 단백질로부터 유래된 펩티드 (펩티드: SL9₇₇₋₈₅, 서열 번호 8)에 특이적인 868 scTv를 포함하였다. 상기 두 TCR 모두 V α 2 유전자 (IMGT: TRAV12 패밀리를 사용하였지만, 이들은 TCR의 단리 기점이 된 원래의 T 세포 클론으로부터 유래된 CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β , 및 CDR3 β 잔기를 가졌다. 따라서, 상기 scTCR의 더 높은 친화도를 가지는 돌연변이체는 각각 그의 동족 펩티드-MHC 항원에 대한 그의 원래의 (모체) TCR로부터 유래된 것이다.
- [0066] 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 비롯한, 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 이황화 결합 도입에 의해 상기 TCR의 파지 디스플레이를 할 수 있었다. 따라서, 상기 시스템은 그의 동족 펩티드-MHC에 대한 조작을 위해 원래의 T 세포 클론으로부터 유래된 전장의 (V α C α /V β C β) 이중이량체 단백질을 이용한다.
- [0067] TCR 조작을 위한 것으로 보고된 세번째 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]). 상기 TCR α 및 β 쇄를 TCR-음성 T 세포 하이브리도마 내로 도입하는 데 레트로바이러스 벡터를 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, 서열 번호 46, 대 ASNENMETM, 서열 번호 47)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 서브유닛과 복합체를 형성한, 그의 천연 입체형태로 표면 상에서 발현되었고, 이를 통해 완전히 기능적인 T 세포 (신호전달 적격)가 허용되었다. 그의 천연 숙주내 전장의 이중이량체 TCR 또한 본 방법을 사용하여 조작되었다.
- [0068] TCR 스캐폴드
- [0069] 본 발명은 원하는 항원 (예컨대, 동족 또는 비-동족 항원)에 대하여 더 높은 친화도를 가지는 TCR을 조작하기 위한 "플랫폼"으로서의 단일, 예컨대, 인간 TCR의 용도를 제공한다. 특정 실시형태에서, 본원에 기술된 TCR 스캐폴드 기반 TCR 조작 방법은 예를 들어, 단일 TCR의 부위 지정, 돌연변이화된 라이브러리를 생성한 후, 비-동족 항원에의 결합에 대하여 선별하는 것을 포함할 수 있다. 조작은 원래의, 단일, 또는 모체 TCR의 구조 분석을 가이드로 한다. 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.

[0070] 일반적으로, 특이 항원에 대한 TCR 돌연변이체를 조작하는 데 사용될 수 있는 TCR 스캐폴드를 제공한다. TCR은 예컨대, 암, 바이러스 질환 및 자가면역 질환 치료를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 많은 목적에 유용하다. 특정 실시형태에서, 단쇄 V α V β TCR (scTCR) 스캐폴드를 제조하고, TCR이 결합하는 위치 (예컨대, 종양)에 효과기 분자를 전달하기 위하여 페이로드, 예컨대, 시토카인, 독소, 방사성 동위 원소, 화학치료제, 또는 약물 (항체-약물 컨쥬게이트와 유사)과 함께 사용될 수 있다. TCR은 또한 예컨대, 암 세포 또는 바이러스 감염 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 술폰히드릴-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.

[0071] 일 실시형태에서, 본원에 기술된 scTCR 스캐폴드는 효모, 파지, 또는 포유동물 세포의 표면 상에 디스플레이될 수 있고, 비-동종 항원에 대하여 더 높은 친화도를 가지는 TCR을 조작하는 데 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 본원에 기술된 scTCR 스캐폴드는 예를 들어, 원핵 세포, 예컨대, 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*), 아스퍼질러스 니거(*Aspergillus niger*), 아스퍼질러스 피쿠움(*Aspergillus ficuum*), 아스퍼질러스 아와모리(*Aspergillus awamori*), 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*), 트리코데마 리제이(*Trichoderma reesei*), 뮤코르 미에헤이(*Mucor miehei*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*) 또는 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 곤충 세포 (예컨대, 드로소필라(*Drosophila*)), 세포주, 예컨대, 차이니즈 햄스터 난소 세포주 (CHO)를 비롯한 포유동물 세포, 또는 식물 종 (예컨대, 카놀라, 대두, 옥수수, 감자, 보리, 호밀, 밀), 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 단백질 발현 공급원에서 발현될 수 있고, 다량으로 제조될 수 있다. TCR 스캐폴드는 특정 항원에 대하여 생성될 수 있고, 예를 들어, 및 단지 일례로, 세포 표면 상의 특이적인 펩티드/MHC를 검출하는 데 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 개시된 scTCR 유전자는 DNA 구축물 내에서 코딩된 적합한 펩티드 서열의 사용에 의해 신호전달 도메인에 대한 유전자에 연결될 수 있고, 표적화된 세포를 제거할 수 있는 T 세포 내로 도입될 수 있다. 상기 구축물은 키메라 항원 수용체 (CAR)로 명명되었으며, 이는 현재 scTCR을 포함하는 CAR의 사용을 비롯하여, 관련 기술분야에서 널리 사용되고 있다.

[0072] 또 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 단쇄 V α V β T 세포 수용체 (sc V α V β TCR) 스캐폴드의 아미노산 서열 및 상기 형태를 제공한다. 제공된 sc V α V β TCR 스캐폴드에서, 가변 알파 및 가변 베타 쇄는 관련 기술분야에 공지된 것을 비롯한, 임의의 적합한 펩티드 링커를 사용하여 예컨대, 항체 단쇄 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 펩티드이고, V β 는 TCR 가변 β 영역이고, V α 는 TCR 가변 α 영역임)를 가지는 가용성 인간 단쇄 TCR를 제공한다. 일 실시형태에서, V β 가 13군의 TCR 가변 β 영역이고, V α 가 2군의 TCR 가변 α 영역인 모델 V α V β TCR은 A6이라고 명명된다 (문헌 [Utz, U., et al., 1996]). 일 실시형태에서, 모델 V α V β TCR은 A6 X15로 알려져 있는, A6의 안정화된 단쇄 변이체이다 (문헌 [Aggen, D.A., et al., 2011]). 일 실시형태에서, 링커 펩티드는 5개 이상의 리신 잔기를 포함한다. 일 실시형태에서, 링커 펩티드는 5 내지 30개의 아미노산을 포함한다. 일 실시형태에서, 링커 펩티드는 GSADDAKKDAAKKDGKS (서열 번호 21)의 아미노산 서열을 가진다. 일 실시형태에서, 제공된 sc V α V β TCR 스캐폴드는 불변 영역을 함유하지 않는다. sc V α V β TCR 스캐폴드라는 용어가 사용될 때, sc V β V α TCR 스캐폴드라는 용어도 관련 기술분야에서 이해되고, 사용되는 바, 상기 용어 또한 포함하는 것으로 이해하여야 한다. 따라서, V α 및 V β 쇄는 링커를 통해 임의의 배열로 서로 연결될 수 있다.

[0073] 본 개시내용의 한 측면에서, 본 개시내용의 sc V α V β TCR 스캐폴드는 약 10⁻⁶ M 내지 10⁻¹² M 사이의 평형 결합 상수 K_D로 리간드에 특이적으로 결합한다. 본 개시내용의 상기 측면의 일 실시형태에서, 리간드는 펩티드/MHC 리간드이다. 일 실시형태에서, 본 개시내용의 sc V α V β TCR은 정상적인 야생형 TCR의 친화도와 비교하여 리간드에 대하여 증진된 친화도를 가진다.

[0074] HLA-A, B, 및 C 대립 유전자 집합체에 결합하는 TCR은 인구 중 큰 일부를 포함하는 질환을 치료하는 데 사용될

수 있다. 예를 들어, 상기 집단에서 다수의 HLA 대립 유전자의 빈도가 측정되었고, 상기 대립 유전자와 관련된 것으로 기술된 암 펩티드 항원이 다수 존재한다 (문헌 [Marsh, Parham, and Barber, The HLA Facts Book, copyright 2000 by Academic Press, ISBN 0-12-545025-7]).

[0075] 일례로, 백인 인구 중 평균 빈도 (및 범위)는 HLA-A1, 14%; HLA-A2, 25%; HLA-A3, 12%; HLA-A11, 7%; HLA-A24, 10%; HLA-B7, 9%; HLA-B44, 11%; HLA-Cw4, 12%; HLA-Cw7, 23%이다. 상기 인구 내에서 발견되는 범위는 HLA-A1 (5-28%); HLA-A2 (7-40%); HLA-A3 (3-20%); HLA-A11 (2-25%); HLA-A24 (5-18%); HLA-B7 (1-16%); HLA-B44 (5-22%); HLA-Cw4 (6-19%); HLA-Cw7 (13-39%)이다.

[0076] TCR 스캐폴드 접근법을 다양한 방식으로 다른 인간 HLA 대립 유전자로 확장시킬 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 TCR 스캐폴드의 구조 기반 디자인을 사용함으로써, 다른 대립 유전자에 대한 리드를 생성하기 위해 MHC 나선과 접촉하는 CDR 루프 중의 돌연변이화된 라이브러리에 초점을 맞출 수 있다. 예를 들어, HLA-A2와의 복합체의 A6 TCR의 구조로부터 CDR2알파와 라이브러리는 HLA-A2의 알파2 나선의 영역에서 결합하는 변이체를 생성하는 것으로 알려져 있다. TCR A6 잔기 Y51은 HLA-A2 알파2 나선 위치(들) E154, Q155, 및 A158 근처에 상주하고 있다. HLA-A1 대립 유전자는 오직 158번 위치에서만 차이를 보이는데, 이는 알라닌이 아닌 발린이다. 따라서, A6 TCR은 HLA-A1 대립 유전자에 대해 기본 친화도를 가질 수 있는데, 이는 51번 위치를 포함하는 CDR2 돌연변이체의 라이브러리를 생성한 후, HLA-A1 대립 유전자에의 더 높은 고친화도 결합에 대해 선별함으로써 개선될 수 있다.

[0077] 또 다른 예는 상이한 대립 유전자에 대해 특이적인 TCR로부터 유래된 스캐폴드 (즉, 상기 MHC 대립 유전자의 생성물에 결합하는 펩티드)를 사용한다. 여기서, 상기 대립 유전자의 대체 비-동족 펩티드-MHC 복합체와 반응할 수 있는, A6 TCR 스캐폴드에 대한 것으로 제시된, CDR 라이브러리를 생성할 수 있다. 예를 들어, MAGE-A3으로부터의 암 항원 펩티드는 HLA-A1에 결합하고, 이는 TR 라이브러리의 선별을 위해 사용될 수 있다.

[0078] 생물학적 활성 기

[0079] 생물학적 활성 기를 포함하는, 본원에 기술된 sc V α V β TCR 스캐폴드 또한 제공한다. 본원에서 사용되는 바, "생물학적 활성 기"는 생물계에서 측정가능한 또는 검출가능한 효과를 일으키는 기이다. 일 실시형태에서, 생물학적 활성 기는 항-종양제, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 혈관신생 억제제, 효소 억제제, 미세소관 억제제, DNA 인터칼레이터 또는 가교결합제, DNA 합성 억제제; 시토키인, 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 A쇄 (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.

[0080] 본 개시내용의 상기 측면의 일 실시형태에서, 생물학적 활성 기는 (예컨대, "항체 약물 컨쥬게이트"에서) 대개 약물로 지칭되는 세포독성 분자이다. 본원에서 사용되는 바, "세포독성"이란 세포에 독성인 것을 의미한다. 세포독성 분자의 예로는 독소루비신, 메토타렉세이트, 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-Greenfield 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.

[0081] 일 실시형태에서, 본원에 기술된 TCR은 프로드럭을 약물로 전환시킬 수 있는 효소에 연결된다. 이는 예를 들어, TCR에 의해 표적화되는 위치 (예컨대, 종양 부위)에서 활성 형태의 약물이 생성되도록 함으로써 유용하다.

[0082] 일 실시형태에서, 생물학적 활성 기는 링커를 통해 단쇄 TCR에 결합되며, 이는 표준 화학 반응을 통해, 예컨대, TCR의 유리 아민 기, 또는 술프히드릴 기를 이용하여 달성될 수 있다.

[0083] 또 다른 실시형태에서, TCR은 단쇄 항체 단편 (scFv)에 부착됨으로써 이중특이성 작용제를 생성할 수 있다. 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]).

[0084] 검출가능한 기를 포함하는, 본원에 기술된 단쇄 VαVβ TCR 또한 제공한다. 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; 흡수 기, 또는 검출가능한 생성물을 생성하는 특성을 가지는 효소, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 또는 알칼리성 포스파타제를 포함한다.

[0085] 관련 기술분야에 공지되어 있는 바와 같이, 생물학적 활성 기, 검출가능한 기 또는 TCR에 부착되는 다른 기는 가용성 펩티드 링커를 사용하여, 또는 화학적 컨쥬게이션에 의해 부착될 수 있고, TCR에 공유적으로, 또는 비공유적으로 부착될 수 있다.

[0086] 항원 특이성

[0087] 본원에서는 특이 항원을 인식 (또는 표적화)하는 sc VαVβ TCR 스캐폴드 또한 제공한다. 일 실시형태에서, TCR은 바이러스 또는 그의 단편을 인식하는 데 특이적이다. 일 실시형태에서, TCR은 암 특이 에피토프를 인식하는 데 특이적이다. 일 실시형태에서, TCR은 자가면역 관련 에피토프를 인식하는 데 특이적이다. 다른 표적으로는 문헌 [The HLA Factsbook (Marsh et al. (2000))]에 열거되어 있는 것 및 관련 기술분야에 공지되어 있는 것을 포함한다. 특이 표적 항원으로는 종양 관련 항원 (문헌 [van der Bruggen P et al. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immun 2013. cancerimmunity.org/peptide/]; [Cheever et al. (2009) Clin Cancer Res, 15, 5323-37]), 바이러스 항원 (문헌 [Addo et al. (2007) PLoS ONE, 2, e321]; [Anikeeva et al. (2009) Clin Immunol, 130, 98-109])), 및 자가면역 관련 에피토프 (문헌 [Bulek et al. (2012) Nat Immunol, 13, 283-9]; [Harkiolaki et al. (2009) Immunity, 30, 348-57]; [Skowera et al. (2008) J Clin Invest, 118, 3390-402]))를 포함한다. 일 실시형태에서, 표적 항원은 하기 표 1에 열거되어 있는 MART-1 (문헌 [Kawakami Y et al. J Exp Med 1994; 180:347-352]; [Romero et al. 2002. Immunol. Rev. 188, 81-96]), WT-1 (문헌 [Gessler et al. Nature 343 (6260), 774-778 (1990)]), SURV (문헌 [Schmidt SM et al. Blood 2003; 102: 571-6]; [Schmitz M et al. Cancer Res 2000; 60: 4845-9]), NY-ESO-1 (문헌 [Barfoed AM et al. Scand J Immunol 2000; 51: 128-33.]), PPI (문헌 [Bulek 2012 Nature Immunology]), MDM2 (문헌 [Asai et al 2002 Cancer Immunity]), MDM4, HBE183, gp100 (문헌 [Bakker AB et al. Int J Cancer 1995; 62: 97-102]; [Kawakami Y et al. J Immunol 1995; 154: 3961-3968]), MUC1 (문헌 [Brossart P et al. Blood 1999; 93: 4309-17]), MAGE A3 (문헌 [van der Bruggen P et al. Eur J Immunol 1994; 24: 3038-43]), HER-2/neu (문헌 [Fisk B et al. J Exp Med 1995; 181: 2109-2117]), EGVFvIII (문헌 [Sampson Semin Immunol 2008;20:267-75]), CEA (문헌 [Tsang KY et al. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 982-990]), 및 SL9/HIV gag (문헌 [Altfeld et al. 2001 J. Virol. 75:1301]) 중 하나이다. 표 1의 순위화 점수는 문헌 [Cheever et al. (2009) Clin Cancer Res, 15, 5323-37]로부터의 것이다. MART-1/HLA-A2 (펩티드 ELAGIGILTV, 서열 번호 7, HLA 분자 A2에 결합)로 명명되는 것으로서, 특이 비-동족 항원을 인식하는, A6 스캐폴드로부터 유래된 scVαVβ TCR 돌연변이체 또한 제공한다.

표 1

[0088]

항원	유형	펩티드 서열										서열 번호	순위화
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
MART-1	암	E	L	A	G	I	G	I	L	T	V	서열 번호:7	14
WT-1	암	-	R	M	F	P	N	A	P	Y	L	서열 번호:9	1
SURV	암	-	L	T	L	G	E	F	L	K	L	서열 번호:10	21
NY-ESO-1	암	-	S	L	L	M	W	I	T	Q	C	서열 번호:11	10
PPI	자가면역	-	A	L	W	G	P	D	A	A	A	서열 번호:12	-
MDM2 (또한 mdm4)	암	-	V	L	F	Y	L	G	Q	Y	-	서열 번호:13	-
HBE183	바이러스	-	F	L	L	T	R	I	L	T	I	서열 번호:14	-
gp100	암	-	K	T	W	G	Q	Y	W	Q	V	서열 번호:15	16
MUC1	암	-	S	T	A	P	P	V	H	N	V	서열 번호:16	2
MAGE A3	암	-	F	L	W	G	P	R	A	L	V	서열 번호:17	8

HER-2/neu	암	-	K	I	F	G	S	L	A	F	L	서열 번호:18	6
EGFRvIII	암	-	L	E	E	K	K	G	N	Y	V	서열 번호:19	5
CEA	암	-	Y	L	S	G	A	N	L	N	L	서열 번호:20	13
SL9/HIVgag	바이러스	-	S	L	Y	N	T	V	A	T	L	서열 번호:8	-

[0089] 본원에서는 포유동물에서, 치료학상 유효 분자에 연결된 변형된 TCR을 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 포유동물에서 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한 인간 TCR 또한 제공한다. 특정 실시형태에서, 포유동물은 인간이다. 또 다른 실시형태에서, 포유동물은 반려 동물 (예컨대, 개, 고양이, 토끼, 설치류, 말), 또는 가축 (예컨대, 소, 말, 돼지)이다.본원에서 사용되는 바, "질환 상태"란 유기체의 비정상적인 기능 또는 상태를 의미한다. 일 실시형태에서, 질환 상태는 암, 바이러스, 박테리아, 또는 자가면역 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원에 기술된 단리된 단쇄 TCR, 및 E. 콜라이에서 단쇄 TCR을 제조하는 방법 또한 제공한다. 본원에 기술된 scTCR 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물 또한 제공한다. T 세포의 표면 상의 활성 TCR을 생성하는 신호전달 도메인에 연결된 본원에 기술된 sc VaVβ 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.

[0090] 변형된 TCR 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드

[0091] 본 개시내용은 단쇄 T 세포 수용체 (scTCR)를 코딩하는 1개 이상의 DNA 세그먼트를 포함하는 DNA 벡터를 고려한다.

[0092] 통상의 기술자는 본원에 기술된 검정법과 함께 표준 돌연변이유발 기법을 통해 변형된 TCR 서열을 획득할 수 있고, 그를 특정 결합 친화도 및/또는 특이성에 대해 시험할 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 유용한 돌연변이유발 기법으로는 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).

[0093] 변이체 TCR 코딩 서열을 획득할 때, 생물학적 활성의 손실 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, 특히, 한 아미노산을 크기, 전하, 극성 및 입체형태가 유사한 또 다른 아미노산으로 치환하여도, 단백질 기능이 유의적으로 변경될 가능성은 없다는 것은 주지되어 있다. 단백질의 구성 요소인 20종의 표준 아미노산은 광범위하게 하기와 같이 4개의 보존적 아미노산 군으로 분류된다: 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) 기는 아르기닌, 히스티딘 및 리신을 포함하고; 음으로 하전된 (산성) 기는 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 단백질 중의 한 아미노산을 같은 군 내의 또 다른 아미노산으로 치환하여도, 단백질 생물학적 활성에 유해한 효과를 미칠 가능성은 없다.

[0094] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 scTCR은 가변 도메인의 임의의 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 분자 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.

[0095] 본 발명의 폴리펩티드는 변형된 TCR, 및 그의 항원-결합 단편 (예컨대, scTCR), 및 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함한다. "폴리펩티드," "단백질" 및 "펩티드" 및 "당단백질"이라는 용어는 상호교환적으로 사용되며, 이는 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 쇠가 펩티드 결합에 의해 공유적으로 연결되어 있는 아미노산을 포함하는 것인, 하나 이상의 아미노산 쇠를 의미하며, 여기서 상기 폴리펩티드 또는 단백질은 천연 단백질, 즉, 자연적으로 발생된 및 구체적으로 비-제조함 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 쇠를 포함할 수 있고, 천연 단백질의

아미노산 서열을 가지는 분자, 천연 서열의 하나 이상의 아미노산으로부터의 결실, 그에의 부가, 및/또는 그의 치환을 가지는 분자를 포함할 수 있다. "폴리펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 구체적으로 본 개시내용의 변형된 TCR, 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 변형된 TCR, 또는 그의 항원 결합 단편의 하나 이상의 아미노산으로부터의 결실, 그에의 부가, 및/또는 그의 치환을 가지는 서열을 포함한다. 따라서, "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 ("단량체"로 불리는) 하나의 아미노산 쇠, 또는 ("다량체"로 불리는) 복수 개의 아미노산 쇠를 포함할 수 있다.

[0096] 본원에서 지칭되는 "단리된 단백질"이라는 용어는 대상 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 약 50% 이상으로부터 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 코딩될 수 있거나, 합성 기원의 것일 수 있거나, 또는 그의 임의 조합의 것일 수 있다. 특정 실시형태에서, 단리된 단백질은 그의 용도 (치료학적, 진단학적, 예방학적 용도, 연구 등)를 방해하는 그의 천연 환경에서 발견되는 단백질, 또는 폴리펩티드, 또는 다른 오염 물질을 실질적으로 함유하지 않는다.

[0097] 특정 실시형태에서, 대상 변형된 TCR은 a) 본원에 기술된 변형된 TCR의 알파 쇠 가변 영역과 80% 이상 동일한, 85% 이상 동일한, 90% 이상 동일한, 95% 이상 동일한 또는 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 가지는 TCR 알파 쇠 가변 영역; 및 b) 본원에 기술된 변형된 TCR의 베타 쇠 가변 영역과 80% 이상 동일한, 85% 이상 동일한, 90% 이상 동일한, 95% 이상 동일한 또는 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 가지는 TCR 베타 쇠 가변 영역을 가질 수 있다.

[0098] 특정 실시형태에서, 변형된 TCR은 a) i. 본원에 기술된 선택된 TCR의 알파 쇠 CDR1 영역의 아미노산 서열과 동일한 CDR1 영역; ii. 선택된 TCR의 알파 쇠 CDR2 영역의 아미노산 서열과 동일한 CDR2 영역; 및 iii. 선택된 TCR의 알파 쇠 CDR3 영역의 아미노산 서열과 동일한 CDR3 영역을 포함하는 TCR 알파 쇠 가변 영역; 및 b) i. 선택된 TCR의 베타 쇠 CDR1 영역의 아미노산 서열과 동일한 CDR1 영역; ii. 선택된 TCR의 베타 쇠 CDR2 영역의 아미노산 서열과 동일한 CDR2 영역; 및 iii. 선택된 TCR의 베타 쇠 CDR3 영역의 아미노산 서열과 동일한 CDR3 영역을 포함하는 TCR 베타 쇠 가변 영역을 포함할 수 있고, 여기서 TCR은 선택된 비-동종 항원에 특이적으로 결합한다. 추가의 실시형태에서, 변형된 TCR, 또는 그의 항원 결합 단편은 예외적으로, 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 쇠 및 베타 쇠를 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).

[0099] 일 실시형태에서, 변형된 TCR, 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 다른 관련된 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 변형된 TCR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 변이체일 수 있다. 폴리뉴클레오티드 변이체는 본원에 기술된 변형된 TCR을 코딩하는 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 항체를 코딩하는 서열과 비교하여 70% 이상의 서열 동일성, 바람직하게, 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 통상의 기술자는 코돈 축퇴성, 아미노산 유사성, 리딩 프레임 위치 결정 등을 고려함으로써 두 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단백질의 상응하는 동일성을 측정하기 위해 상기 값은 적절히 조절될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0100] 전형적으로, 폴리뉴클레오티드 변이체는, 바람직하게는 변이체 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 항체의 결합 친화도가 본원에 구체적으로 기술된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 항체와 비교하여 실질적으로 감소되지 않도록 하나 이상의 치환, 부가, 결실 및/또는 삽입을 함유할 것이다.

[0101] 폴리뉴클레오티드 서열을 비교하여, 하기 기술되는 바와 같이, 최대한 일치하도록 정렬되었을 때, 두 서열 중의 뉴클레오티드 서열이 동일하다면, 이 두 서열은 "동일하다"라고 말할 수 있다. 두 서열 사이의 비교는 전형적으로 비교창에 걸쳐 서열을 비교하여 서열 유사성을 확인하고, 그의 국부 영역을 비교함으로써 수행된다. 본원에

서 사용되는 바, "비교창"이란, 두 서열이 최적으로 정렬된 후, 서열이 동일한 개수의 연속하는 위치의 참조 서열과 비교될 수 있는 것인, 약 20개 이상의 연속하는 위치, 보통 30 내지 약 75개, 40 내지 약 50개의 것으로 이루어진 세그먼트를 의미한다.

[0102] 생물정보학 소프트웨어의 레이저진(Lasergene) 슈트 (DNASTAR, 인코퍼레이티드(DNASTAR, Inc.: 미국 위스콘신주 매디슨)) 중 맥얼라인(Megalign) 프로그램을 이용함으로써 디폴트 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 접근법 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 4:1 1 -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)].

[0103] 별법으로, 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(제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group: GCG: 미국 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575)의 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package)의 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, 및 TFasta)의 전산화 실행에 의해, 또는 검사에 의해 수행될 수 있다.

[0104] 서열 동일성(%) 및 서열 유사성(들)을 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 측정하는 데, 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 입수가능하다. 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 그의 최대 달성 값으로부터 X 양만큼 하락하였을 때; 1회 이상의 음의 점수화 잔기 정렬 누적에 기인하여 누적 점수가 0 이하가 되었을 때; 또는 양 서열의 단부가 도달하였을 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.

[0105] 특정 실시형태에서, "서열 동일성(%)은 20개 이상의 위치로 이루어진 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, 갭)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.

[0106] 유전자 코드의 축퇴성의 결과로서 본원에 기술된 바와 같은 항원을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 다수 존재한다는 것을 통상의 기술자는 이해할 것이다. 상기 폴리뉴클레오티드 중 일부는 예컨대, 동일한 비-동족 항원에 결합하는 변형된 TCR을 코딩하는 천연 또는 원래의 폴리뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 서열과 최소의 서열 동일성을 보유한다. 그럼에도 불구하고, 코돈 사용 빈도상의 차이에 기인하여 다른 폴리뉴클레오티드도 본 개시 내용에 의해 명확하게 고려된다. 특정 실시형태에서, 포유동물 발현을 위해 코돈 최적화된 서열이 구체적으로 고려된다.

[0107] 클로닝, DNA 단리, 증폭 및 정제를 위한 표준 기법, DNA 리가제, DNA 폴리머라제, 제한 엔도뉴클레아제 등을 포함하는 효소 반응을 위한 표준 기법, 및 각종 분리 기법은 통상의 기술자에 의해 공지되고, 통상 사용되는 것이

다. 다수의 표준 기법인 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, 예컨대, 본원에서 인용된 것과 같은 전문 저널에서 보편적으로 사용된다.

[0108] 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/시트르산 나트륨 완충제) 및 0.1% SDS (소듐 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) 매우 다양한 컴퓨터 프로그램 또한 이용가능하며, 상업적으로 이용가능한 소프트웨어 및 무료 소프트웨어, 둘 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 이용가능하다.

[0109] 산업상 미생물 균주 (예컨대, 아스퍼질러스 니거, 아스퍼질러스 피쿠움, 아스퍼질러스 아와모리, 아스퍼질러스 오리재, 트리코데마 리제이, 뮤코르 미에헤이, 클루이베로마이세스 락티스, 피치아 파스토리스, 사카로마이세스 세레비시아에, 에스케리키아 콜라이, 바실러스 썩틸리스 또는 바실러스 리케니포르미스), 곤충 (드로소필라), 포유동물 (예컨대, 차이니스 햄스터 난소 세포주, CHO), 또는 식물 중 (예컨대, 카놀라, 대두, 옥수수, 감자, 보리, 호밀, 밀)이 TCR 단백질의 재조합적 제조를 위한 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 고 친화도 TCR 단백질 또는 가용성 단백질의 이중성 발현에서 제1 단계는, TCR 또는 가용성 TCR 코딩 서열 및 제어 서열, 예컨대, 프로모터, 인핸서, 및 종결 인자를 포함하도록 발현 구축물을 조립하는 것이다. 다른 서열, 예컨대, 신호 서열 및 선별가능한 마커 또한 포함시킬 수 있다. TCR의 세포외 발현을 달성하기 위해, 발현 구축물은 분비 신호 서열을 포함할 수 있다. 실시형태에서, 세포질 발현을 원하는 경우, 발현 구축물 상에서 신호 서열은 포함되지 않는다. 실시형태에서, 프로모터 및 신호 서열은 숙주 세포에서 작용성이며, 이는 TCR 또는 가용성 TCR 단백질의 발현 및 분비를 준비한다. 전사 종결 인자는 전사가 확실하게 효율적으로 이루어질 수 있도록 하기 위해 포함될 수 있다. 발현 또는 단백질 정제를 증진시키는 보조 서열 또한 발현 구축물에 포함될 수 있다.

[0110] 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, 이중성 공급원으로부터의 프로모터도 사용될 수 있다.

[0111] 프로모터 선택은 또한 펩티드 또는 단백질 제조의 원하는 효율 및 수준에 따라 달라진다. 유도성 프로모터, 예컨대, tac는 대개 E. 콜라이에서 단백질 발현 수준을 극적으로 증가시키고자 할 때 사용된다. 단백질의 과다발현은 숙주 세포에게 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.

[0112] 본 개시내용에 따라 각종 신호 서열이 사용될 수 있다. TCR 코딩 서열과 상동성인 신호 서열이 사용될 수 있다. 별법으로, 발현 숙주에서의 효율적인 분비 및 프로세싱을 위해 선택되거나, 디자인된 신호 서열 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 적합한 신호 서열/숙주 세포 쌍으로는 B. 썩틸리스(*B. subtilis*)에서의 분비를 위해 B. 썩틸리스 *sacB* 신호 서열, 및 사카로마이세스 세레비시아에 α-메이팅 인자 또는 P. 파스토리스(*P. pastoris*) 분비

를 위해 P. 파스토리스 산성 포스포타제 *phoI* 신호 서열을 포함한다. 신호 서열은 신호 펩티다제 절단 부위를 코딩하는 서열을 통해, 또는 하류 TCR 서열의 정확한 리딩 프레임을 보장하는 브릿지인, 보통 10개 미만의 코돈으로 이루어진 짧은 뉴클레오티드 브릿지를 통해 단백질 코딩 서열에 직접 연결될 수 있다.

[0113] 진핵성 단백질 발현 시스템의 경우, 전사 및 번역을 증진시키는 요소가 확인되었다. 예를 들어, 이중성 프로모터의 양측 상에 콜리플라워 모자이크 바이러스 (CaMV) 프로모터 1,000 bp를 배치함으로써 식물 세포에서 전사 수준은 10 내지 400배만큼 상승시킬 수 있다. 발현 구축물은 또한 적절한 번역 개시 서열을 포함하여야 한다. 적절한 번역 개시를 위해 코작(Kozak) 컨센서스 서열을 포함하도록 발현 구축물을 변형시키면, 번역 수준은 10 배만큼 증가될 수 있다.

[0114] 선택성 마커가 흔히 사용되는데, 이는 발현 구축물의 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, *bla*가 암피실린에 대한 저항성을 부여하고, *nptII*이 매우 다양한 원핵 및 진핵 세포에 카나마이신 저항성을 부여함), 또는 숙주가 최소 배지 상에서 성장할 수 있도록 허용하는 마커 (예컨대, *HIS4*는 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 일반적으로는 배지 1 mL당 항생제 10 내지 600 μ g 범위이다.

[0115] 공지된 재조합 DNA 기법을 사용하여 발현 구축물을 조립한다 (문헌 [Sambrook et al. 1989]; [Ausubel et al., 1999]). 제한 효소 분해 및 결찰은 DNA의 두 단편을 연결시키는 데 사용되는 기초 단계이다. DNA 단편의 단부는 결찰 이전에 변형이 필요할 수 있으며, 이는 오버행을 증진시키거나, 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 촉진시키기 위하여 폴리링커 및 어댑터가 사용될 수 있다. 발현 구축물은 전형적으로 제한, 결찰, 및 E. 콜라이의 형질전환으로 이루어진 라운드를 사용하는 단계로 조립된다. 발현 구축물을 구축하는 데 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), 특정의 것으로 선택하는 것이 본 개시 내용에는 중요하지 않다. 클로닝 벡터 선택은 발현 구축물을 숙주 세포 내로 도입하기 위해 선택되는 유전자 전달 시스템에 의해 영향을 받게 될 것이다. 각 단계 종료시, 생성된 구축물을 제한, DNA 서열, 하이브리드화 및 PCR 분석에 의해 분석할 수 있다.

[0116] 발현 구축물을 선형 또는 환형의 클로닝 벡터 구축물로서 숙주 내로 형질전환시킬 수 있거나, 클로닝 벡터로부터 제거하여 그대로, 또는 전달 벡터 상에 도입하여 사용할 수 있다. 전달 벡터는 선택된 숙주 세포 유형에서 발현 구축물의 도입 및 유지를 촉진시킨다. 발현 구축물은 다수의 공지된 유전자 전달 시스템들 중 임의의 것 (예컨대, 자연적 능력, 화학적으로 매개되는 형질전환, 프로토플라스트 형질전환, 전기천공, 바이오리스틱 형질전환, 형질감염, 또는 건주게이션)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.

[0117] 예를 들어, 프로토플라스트 형질전환 또는 전기천공에 의해 발현 구축물을 S. 세레비지아에 세포 내로 도입할 수 있다. S. 세레비지아에의 전기천공을 쉽게 달성할 수 있으며, 이를 통해 스페로플라스트 형질전환과 유사한 형질전환 효율을 얻을 수 있다.

[0118] 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.

[0119] 특정 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. 검출가능한 신호를 제공하는 물질을 공유적으로 또는 비공유적으로 연결함으로써 TCR을 표지화하는 것이 빈번하게 이루어진다. 적합한 표지로는 방사성 핵종, 효소, 기질, 보조 인자, 억제

제, 형광성 작용제, 화학발광성 작용제, 자기 입자 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 추가로, TCR을 제2 결합 분자에 대한 리간드에 커플링시킬 수 있으며: 예를 들어, TCR은 비오틴화될 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 수행될 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; 제4,444,744; 제4,640,561호; 제4,366,241호; RE 35,500; 제5,299,253호; 제5,101,827호; 제5,059,413호를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0120] 표지화된 TCR은 모니터링 장치 또는 사용된 표지에 적절한 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 표지가 형광성 모이어티일 경우, 형광 현미경 또는 형광 활성화 세포 분류가 사용될 수 있고, 표지가 방사성 핵종일 경우, 예를 들어, 감마 계수, 자가방사선율 또는 액체 섬판 계수가 사용될 수 있되, 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 분자 또는 입자가 존재할 경우, 사용되는 2차 검출 분자 또는 입자가 존재할 수 있다. 관련 기술분야에는 계내 진단학적 영상화를 위해 유용한 화합물이 공지되어 있다; 예컨대, 미국 특허 번호 제5,101,827호; 제5,059,413호를 참조할 수 있다. 생체내 요법 및/또는 영상화에 유용한 방사성 핵종으로는 ¹¹¹인듐, ⁹⁷루비듐, ¹²⁵요오드, ¹³¹요오드, ¹²³요오드, ⁶⁷갈륨, ⁹⁹테크네튬을 포함한다. 독소는 그중에서도 특히 디프테리아 독소, 리신 및 아주카리 독소를 포함하되, 단, 일단 TCR-독소 복합체가 세포에 결합하고 나면, 독성 모이어티는 내재화됨으로써 그의 세포독성 효과를 발휘할 수 있다. 면역독소 기술은 관련 기술분야에 주지되어 있고, 적합한 독성 분자로는 제한 없이, 화학치료 약물, 예컨대, 빈데신, 항염산제, 예컨대, 메토크세이트, 시스플라틴, 미토마이신, 안트라사이클린, 예컨대, 다우노마이신, 다우노루비신 또는 아드리아마이신, 및 세포독성 단백질, 예컨대, 리보솜 불활성화 단백질 (예컨대, 디프테리아 독소, 포크워드 항바이러스 단백질, 아브린, 리신, 슈도모나스 외독소 A 또는 그의 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]를 참조할 수 있다.

[0121] TCR 분자의 일반 구조, 및 펩티드:주조직적합 복합체에의 결합을 비롯한, 그를 제조하고 사용하는 방법이 개시되어 있다. 예를 들어 PCT/US98/04274; PCT/US98/20263; WO99/60120을 참조할 수 있다.

[0122] 제약 조성물 및 치료제

[0123] 특정 표적 리간드에 특이적인 scTCR은 특정 항원과 관련된 질환을 앓는 것으로 여겨지는, 인간을 비롯한, 동물 및 포유동물을 치료하는 데 유용하다.

[0124] 본원에 제시된 물질을 사용하여 치료학적 생성물을 제조할 수 있다. 유효량의 치료학적 생성물은 대상체에서 측정가능한 효과를 발휘하는 최소 용량이다. 치료학적 생성물은 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 형성을 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 이화된 세포에 가교결합하는, 예컨대, 항-CD3과 같이 단백질 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 예컨대, 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 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다.

- [0125] scTCR 조성물은 관련 기술분야에 공지된 수단 중 임의의 것에 의해 제제화될 수 있다. 상기 조성물은 전형적으로는 액체 액체 또는 현탁제로서 특히 정맥내, 복강내, 또는 활막 투여 (경로는 특정 질환에 의해 결정됨)용 주사제로서, 또는 비내 또는 경구용 투여를 위한 제제로서 제조될 수 있다. 주사 전에 액체 형태의 액체 또는 현탁제로 적합한 고체 형태 또한 제조될 수 있다. 제제는 또한 예를 들어, 유화될 수 있거나, 단백질(들)/펩티드(들)는 리포솜 내로 캡슐화될 수 있다.
- [0126] 활성 성분은 대개 임의적인 제약 첨가제, 예컨대, 제약상 허용되고, 활성 성분과 화합성인 부형제 또는 담체와 혼합된다. 적합한 부형제로는 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등, 및 그의 조합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 주사제, 에어로졸 또는 비강용 제제 중 scTCR의 농도는 보통 0.05 내지 5 mg/ml 범위이다. 특정의 유효 투여량을 선택하는 것은 공지되어 있고, 통상의 기술자에 의해 과도한 실험 없이 수행된다. 유사한 투여량이 다른 점막 표면에 투여될 수 있다.
- [0127] 추가로, 원하는 경우, scTCR을 포함할 수 있는 백신은 최소량의 제약 첨가제, 예컨대, 보조 물질, 예컨대, 습윤제 또는 유화제, pH 완충화제, 및/또는 백신의 효과를 증강시키는 애주번트를 포함할 수 있다. 효과적인 수 있는 애주번트의 예로는 수산화알루미늄; N-아세틸-무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 (thr-MDP); N-아세틸-노르-무라밀-L-알라닌-D-이소글루타민 (CGP 11637, 노르-MDP로도 지칭됨); N-아세틸무라밀-L-알라닌-D-이소글루타미닐-L-알라닌-2-(1'-2'-디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민 (CGP 19835A, MTP-PE로 지칭됨); 및 2% 스쿠알렌/트윈® 80 에멀전 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 제제 및 투여 모드 또한 사용될 수 있다.
- [0128] 본 개시내용의 scTCR, 및/또는 1차 구조가 TCR 가변 영역과 유사하고 (동일성 90% 이상), 표적 리간드에 대하여 고친화도를 유지하는 결합 단편이 중성 또는 염 형태로서 백신으로 제제화될 수 있다. 제약상 허용되는 염으로는 무기산, 예컨대, 염산 또는 인산; 및 유기산, 예컨대, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 또는 말레산과 형성되는 (펩티드의 유리 아미노기와 형성되는) 산 부가 염을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 유리 카르복실기와 형성되는 염은 무기 염기, 예컨대, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 수산화제2철, 및 유기 염기, 예컨대, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노-에탄올, 히스티딘, 및 프로파인으로부터 유도될 수 있다.
- [0129] 치료학적 용도의 scTCR은 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 예방학상 및/또는 치료학상 효과적인 양 및 방식으로, 및 투여 제제와 화합성인 방식으로 투여된다. 투여량은 일반적으로 1회 용량당 약 100 내지 20,000 μ g의 단백질 범위, 더욱 일반적으로, 1회 용량당 약 1,000 내지 10,000 μ g의 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.
- [0130] 백신 또는 다른 면역원성 조성물은 단일 용량으로; 2회 투약 스케줄로, 예를 들어, 2 내지 8주 간격으로; 또는 다중 투약 스케줄로 제공될 수 있다. 다중 투약 스케줄은, 백신화의 1차 과정이 1 내지 10회 이상의 별개의 투약에 이어서, 면역 반응을 유지시키고/거나, 그를 강화시키는 데 요구되는 바와 같이 순차적인 시간 간격으로, 2차 투약을 위해 1 내지 4개월의 간격으로 투여되는 다른 투약, 및 필요할 경우, 수개월 후에 수행되는 순차적인 투약(들)을 포함할 수 있는 것이다. 본 개시내용의 레트로바이러스-유사 입자로 면역화된 인간 (또는 다른 동물)은 동족 레트로바이러스에 의해 감염으로부터 보호된다.
- [0131] 자가면역 질환은, 면역계가 숙주에 정상적으로 존재하는 항원에 대하여 면역 반응을 일으키는 것인 질환이다. 자가면역 질환으로는 류마티스 관절염, 애주번트 관절염, 중증 근육무력증, 뇌척수염, 다발성 경화증, 갑상샘염, 염증성 장 질환 또는 전신 홍반 루푸스, I형 당뇨병, 비-비만 당뇨병, 그레이브스병, 하시모토병, 골관절염, 피부염, 간염, 심상성 천포창, 복강 질환, 쇼그렌증후군, 애디슨병, 일차성 점액수종, 굿파스처 증후군, 결핵 나병, 강직성 척추염, 라이터 질환, 포도막염, 아밀로이드증, 심상성 건선, 특발성 혈색소침착증 및 건선을 포함한다.
- [0132] 기술되거나, 예시된 성분들로 이루어진 모든 제제 또는 조합물은 달리 언급되지 않는 한, 본 개시내용을 실시하는 데 사용될 수 있다. 통상의 기술자는 동일 물질을 다르게 명명할 수 있다고 공지되어 있는 바, 물질의 구체적인 명칭은 예시적인 것으로 한다. 화합물이 예를 들어, 상기 화합물의 특정 이성질체 또는 거울상 이성질체가 화학식 또는 화학명으로 명시되지 않는 것으로 본원에 기술되었을 때에는 상기 기술 내용은 기술된 화합물의 각 이성질체 또는 거울상 이성질체를 개별적으로 또는 임의의 조합으로 포함하는 것으로 한다. 구체적으로 예시된 것 이외의 방법, 표적 리간드, 생물학적 활성 기, 출발 물질, 및 합성 방법은 과도한 실험에 의존하지 않고 본

개시내용의 실시에서 사용될 수 있다는 것을 통상의 기술자는 이해할 것이다. 임의의 상기 방법, 표적 리간드, 생물학적 활성 기, 출발 물질, 및 합성 방법의 관련 기술분야에 공지된 모든 기능적 등가물이 본 개시내용에 포함되는 것으로 한다. 예를 들어, 온도 범위, 시간 범위, 또는 조성 범위와 같은 범위가 명세서에서 제공될 때에는 언제든지 제공된 범위에 포함되는 모든 중간 범위 및 부분 범위 뿐만 아니라, 모든 개별 범위가 본 개시내용에 포함되는 것으로 한다.

- [0133] 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).
- [0134] 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 유사한 프로그램은 또한 수의학에서도 사용될 수 있다.
- [0135] 치료되는 구체적인 병증 및 선택된 표적 방법에 따라, 상기 작용제는 전신으로 또는 국소적으로 제제화되고, 투여될 수 있다. 제제화 및 투여 기법은 문헌 [Alfonso and Gennaro (1995)]에서 살펴볼 수 있다. 적합한 경로로는 예를 들어, 경구, 직장, 경피, 질, 경점막, 또는 장 투여; 근육내, 피하, 또는 골수내 주사 뿐만 아니라, 경막내, 정맥내, 또는 복강내 주사를 비롯한, 비경구적 전달을 포함할 수 있다.
- [0136] 주사용인 경우, 본 개시내용의 작용제는 수성 용액 중에서, 바람직하게, 생리학상 화합성인 완충제, 예컨대, 헵크스 용액, 링커액, 또는 생리 식염수 완충제 중에서 제제화될 수 있다. 경점막 투여용인 경우, 투과되는 장벽에 적절한 침투제가 제제에 사용된다. 상기 침투제는 일반적으로 관련 기술분야에 공지되어 있는 것이다.
- [0137] 본 개시내용의 실시를 위해 개시된 본원의 화합물을 전신 투여에 적합한 제형으로 제제화하기 위한 제약상 허용되는 담체의 용도는 본 개시내용의 범주 내에 포함된다. 담체 및 적합한 제조 관행을 적절히 선택함에 따라 본 개시내용의 조성물, 특히, 액제로 제제화된 조성물은 비경구적으로, 예컨대, 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있다. 적절한 화합물은 관련 기술분야에 주지된 제약상 허용되는 담체를 사용하여 경구 투여용으로 적합한 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 담체를 통해 본 개시내용의 화합물은 치료하고자 하는 환자에 의해 경구적으로 섭취되는 정제, 환제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리, 현탁제 등으로서 제제화될 수 있다.
- [0138] 세포내로 투여되도록 의도되는 작용제는 통상의 기술자에게 주지된 기법을 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 수성 용액 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 그의 소수성에 기인하여 세포내로 직접 투여될 수 있다.
- [0139] 본 개시내용에서 사용하기에 적합한 제약 조성물은 활성 성분이 의도하는 목적을 달성하는 데 효과적인 양으로 함유되어 있는 조성물을 포함한다. 유효량 결정은 특히, 본원에 제공된 상세한 개시내용에 비추어 통상의 기술자의 능력 범위 내에 잘 포함되어 있다.
- [0140] 활성 성분 이외에도, 상기 제약 조성물은 활성 화합물이 제약상 사용될 수 있는 제제로 쉽게 프로세싱될 수 있게 하는 보조제 및 부형제를 포함하는 적합한 제약상 허용되는 담체를 함유할 수 있다. 경구 투여용으로 제제화된 제제는 정제, 당의정, 캡슐제, 또는 액제 형태일 수 있고, 이는 지연 방출용으로 제제화된 것, 또는 제약이 소장 또는 대장에 도달하였을 때에만 오직 방출되도록 제제화된 것을 포함한다.
- [0141] 본 개시내용의 제약 조성물은 그 자체가 공지된 방식으로, 예컨대, 종래 혼합, 용해, 과립화, 당의정 차폐, 부양, 유화, 캡슐화, 포획화 또는 동결건조 공정에 의해 제조될 수 있다.
- [0142] 비경구적 투여용의 제약 제제는 수용성 형태로 활성 화합물의 수용액을 포함한다. 추가로, 활성 화합물의 현탁액은 적절한 오일성 주사 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클로는 지방 오일, 예컨대, 참깨 오일, 또는 합성 지방산 에스테르, 예컨대, 에틸 올레이트 또는 트리글리세리드, 또는 리포솜을 포함한다. 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점성을 증가시키는 물질, 예컨대, 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨, 또는 텍스트란을 함유할 수 있다. 임의적으로, 현탁액은 또한 적합한 안정제, 또는 고도로 진한 용액을 제조할

수 있도록 화합물의 용해도를 증가시키는 작용제를 함유할 수 있다.

[0143] 경구용 제약 제제는, 활성 화합물을 고체 부형제와 함께 조합하고, 임의적으로 생성된 혼합물을 분쇄시키고, 파립제 혼합물을 프로세싱하고, 필요할 경우, 적합한 보조제를 첨가한 후, 정제 또는 당의정 코어를 수득할 수 있다. 특히 적합한 부형제는 충전제, 예컨대, 락토스, 수크로스, 만니톨, 또는 소르비톨을 비롯한, 당; 셀룰로스 제제, 예컨대, 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트라가칸트 검, 메틸 셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 및/또는 폴리비닐피롤리돈 (PVP)이다. 원하는 경우, 붕해제, 예컨대, 가교결합된 폴리비닐 피롤리돈, 아가, 또는 알긴산, 또는 그의 염, 예컨대, 알긴산 나트륨이 첨가될 수 있다.

[0144] 당의정 코어에 적합한 코팅제가 구비된다. 이러한 목적을 위해, 임의적으로 아라비아 검, 탈크, 폴리비닐 피롤리돈, 카르보폴 겔, 폴리에틸렌 글리콜, 및/또는 이산화티타늄을 함유할 수 있는 진한 당 용액, 래커 용액, 및 적합한 유기 용매 또는 용매 혼합물이 사용될 수 있다. 식별을 위해, 또는 활성 화합물 용량의 상이한 조합을 특징 규명하기 위해 정제 또는 당의정 코팅제에 염료 또는 색소가 첨가될 수 있다.

[0145] 경구적으로 사용될 수 있는 제약 제제는 젤라틴으로 제조된 압입 캡슐제 뿐만 아니라, 젤라틴 및 가소화제, 예컨대, 글리세롤 또는 소르비톨로 제조된 연질, 실링된 캡슐제를 포함한다. 압입 캡슐제는 충전제, 예컨대, 락토스, 결합제, 예컨대, 전분 및/또는 윤활제, 예컨대, 탈크 또는 스테아린산 마그네슘, 및 임의적으로 안정제를 함유할 수 있다. 연질 캡슐제에서, 활성 화합물은 적합한 액체, 예컨대, 지방 오일, 액체 파라핀, 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜 중에 용해되거나, 현탁될 수 있다. 추가로, 안정제가 첨가될 수 있다.

[0146] 실시예

[0147] 하기 실시예는 본 개시내용의 비-제한적인 예를 추가로 기술한다.

[0148] 실시예 1

[0149] 모델 TCR 선택

[0150] TCR은 모두 유사한 Ig 폴드 및 도킹 각도를 채용하며, pepMHC의 TCR 인식은 전적으로 CDR 루프 상의 특이적인 잔기에 의해 매개된다 (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]). 그러므로, 본 발명에 따라, 구조가 공지된 단일 TCR은 MHC 상에 디스플레이된 비-동족 펩티드에 대한 특이성 및 고친화도를 이용한 시험관내 조작을 위한 스캐폴드를 제공한다. 즉, 직접적으로 펩티드와 접촉할 가능성이 가장 큰 CDR 루프 잔기 내 축퇴성 잔기를 이용하여 돌연변이체를 생성함으로써, 비-동족 펩티드-MHC 항원에 대하여 고친화도를 가지는 TCR이 발생될 수 있도록 단일 TCR 내의 돌연변이체의 라이브러리를 생성하였다.

[0151] 단일 스캐폴드로부터 비-동족 항원에 대한 신규의 TCR을 발견하거나, 생성하는 데 사용되는 일반 전략법은 도 1에 제시되어 있다. 본 공정은 구조가 공지된 단일 TCR을 선택하는 단계를 포함한다. 본 실시예에서, A6으로 불리는 인간 TCR을 사용하였다. A6 TCR은 그의 구조에 대한 문제가 풀린 최초의 인간 TCR이며 (문헌 [Garboczi et al. (1996) Nature, 384, 134-141]), 장기간에 걸쳐 이루어진 구조 및 생화학적 연구 시리즈의 주제가 되어 왔다 (예컨대, 문헌 [Armstrong et al. (2008) Biochem J, 415, 183-96; Ding et al. (1999) Immunity, 11, 45-56]; [Hawse et al. (2012) J Immunol, 188, 5819-23]). 추가로, 그의 동족 항원 Tax:HLA.A2에 대해 더 높은 친화도를 가지는 돌연변이체를 조작하기 위하여 이중이량체 형태로 사용되어 왔다 (문헌 [Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54]). 또한, 단쇄 TCR의 안정한 버전 (V β -링커-V α)은 효모 디스플레이 시스템 중 표면 상에서 디스플레이되었다 (문헌 [Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72]).

[0152] 본 공정에서 또 다른 단계는 펩티드 특이성에 기여할 가능성이 가장 큰 TCR (예컨대, A6) 결합 부위 내의 잔기를 확인하는 것이다. 상기 단계는 펩티드 집합체를 HLA.A2 분자로 모델링하고, A6 TCR을 도킹하고, A6 TCR 잔기가 각 펩티드의 3 Å 이내에 상주하는 빈도를 분석하는 것을 포함하였다.

[0153] 상기 기술된 바와 같이, 구조 기반 분석에 의해 확인된 위치에 가변성을 가지는 돌연변이체의 라이브러리를 클로닝하는 것이 다음 단계였다. 상기 라이브러리를 다양한 디스플레이 시스템, 예컨대, 효모 디스플레이로 클로닝할 수 있다. 파지 디스플레이 벡터 및 클로닝을 통해 10¹¹ 크기의 라이브러리를 수득한 반면, 효모 디스플레이 벡터 및 상동성 제조를 통해 10¹⁰ 크기의 라이브러리를 수득하였다 (문헌 [Benatui et al. (2010)

Protein Eng Des Sel, 23, 155-9]).

- [0154] 이어서, 특이적인 비-동족 pep-MHC 리간드에 결합하는 돌연변이체를 선별하였다. 변이체를 선별하는 데 각종 방법이 사용되었는데, 이는 고정된 리간드와의 친화도 기반 결합 (파지 디스플레이) 또는 항원을 이용하는 자기 입자 선별 (효모 디스플레이), 또는 표지화된 펩티드-MHC 항원을 이용하는 형광 활성화 세포 분류 (효모 디스플레이)를 포함하였다. 상기의 각 단계에 관한 예는 하기에 추가로 기술된다.
- [0155] 실시예 2
- [0156] TCR 조작을 위한 스캐폴드로서 TAX:HLA.A2와의 복합체에서의
- [0157] 인간 TCR A6의 분석
- [0158] 예시적인 목적을 위해, A6 TCR을 공지된 구조를 가지는 단일 TCR로서 선택하였다. A6:Tax 펩티드:HLA-A2 복합체 (PDB: 1A07)의 구조 (문헌 [Garboczi et al. (1996) Nature, 384, 134-141])는 1996년 공개되었다. 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). 6개의 CDR 루프를 제외한, TCR이 "제거된" Tax:HLA.A2 복합체의 하향식 단면도. 이 단면도에는 TCR이 펩티드-MHC 상에 대각선 방향의 위치를 채우는 것으로 나타나 있으며, 이러한 관찰 결과는 현재 모든 TCR:펩티드-MHC 구조에서 관찰되었다. 이러한 배향으로, 두 CDR3 루프는 펩티드 상에 배치되어 있으며, 주로 MHC 분자의 나선과 함께 상호작용하는 CDR1 및 CDR2 루프로부터 다양한 잔기가 존재한다. V α 영역이 α 2 MHC 나선 및 펩티드의 N-말단 단부 상에 배치되어 있고, V β 영역이 α 1 MHC 나선 및 펩티드의 C-말단 단부 상에 배치되어 있는 것인 이러한 대각선 방향의 도킹 배향은 현재까지 사실상 모든 복합체에서 관찰되었다. 이러한 상호작용의 보존되는 특징은 스캐폴드로서 단일 TCR을 사용할 수 있으며, 여기서 각종의 중요한 "펩티드-상호작용" 잔기의 돌연변이유발을 통해 신규한 TCR 특이성을 생성할 수 있고, 발견할 수 있다는 것을 제안하였다 (도 2b).
- [0159] 최근 연구에서는 1) 유도 진화 (문헌 [Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54]), 및 2) 부위 지정 디자인을 위한 예측 알고리즘 (문헌 [Pierce et al. (2010) Biochemistry, 49, 7050-9])에 의해 동족 항원 Tax/HLA.A2에 대한 더 높은 친화도를 가지는 TCR을 조작하기 위하여 A6 TCR을 사용하였다. 본 발명에 따라, HLA 생성물에 결합된 비-동족 펩티드에 대한 TCR을 발견하기 위하여 고속 대량 스크리닝과 함께 조합된, 중요 위치에 돌연변이를 포함하는 축퇴성 TCR 라이브러리의 구조 기반의 합리적인 디자인을 사용하는 것이 가능하다는 것이 최초로 밝혀졌다.
- [0160] 실시예 3
- [0161] 펩티드 결합 및 특이성에 기여할 가능성이 가장 큰 CDR 루프 잔기 분석
- [0162] 잠재적인 접촉 및 특이성 결정 잔기를 확인하기 위해, 다양한 접근법을 사용하여 A6 CDR 루프의 어느 잔기가 HLA.A2 펩티드-결합 그루브 중 다수의 펩티드를 수용하고, 그에 결합 에너지를 제공할 가능성이 가장 큰지를 측정하였다. 먼저, HLA.A2 제한 펩티드 패널을 A6 결정 구조로 모델링하였다 (도 3). 출발점으로서 A6:Tax 펩티드:HLA.A2 결정 구조 (PDB:1A07)를 사용하여 (문헌 [Garboczi et al. (1996) Nature, 384, 134-141]), 로제타 백크럽(Rosetta Backrub) 모델링 프로그램을 사용하여 로제타 백크럽 가요성 골격 모델링 알고리즘을 사용함으로써 HLA.A2 제한 펩티드 (즉, Tax, Mart1-9mer, Mart1-10mer, SL9 HIV, WT1, 및 서비빈)를 HLA.A2 그루브로 모델링하였다 (도 3) (문헌 [Lauck et al. (2010) Nucleic Acids Res, 38, W569-75]; kortemmelab.ucsf.edu/backrub/). 펩티드를 수소 결합 거리 (2.5-3.5 Å) 내에 있는 A6 TCR 잔기를 결정하기 위하여 A6:tax:HLA-A2 구조의 결합 그루브로 모델링하였다. 이어서, 각 펩티드에 대해 가장 낮은 에너지 입체형 태 모델에서 어느 CDR 루프 위치가 상기 펩티드와의 접촉을 허용할 가능성이 가장 높은지를 측정함으로써 축퇴성에 대한 후보 잔기를 확인하였다

표 2

HLA.A2 제한 폴리펩티드										
펩티드	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tax (wt) (서열 번호 5)		L	L	F	G	Y	P	V	Y	V
Mart1 9mer (서열 번호 6)	-	A	A	G	I	G	I	L	T	V
Mart1 10mer (서열 번호 7)	E	L	A	G	I	G	I	L	T	V
SL9 HIV (서열 번호 8)		S	L	Y	N	T	V	A	T	L
WT-1 (서열 번호 9)		R	M	F	P	N	A	P	Y	L
SURV (서열 번호 10)		L	T	L	G	E	F	L	K	L

[0163]

[0164]

둘 모두가 그의 HLA-A2에의 결합에 대하여 연구된 바와 같이, Mart1에 대한 2개의 관련된 펩티드가 열거되어 있다. 모델링 목적으로, 10mer의 "0"번 위치의 잔기는 예측으로부터 누락되었다. 6개의 모델 각각에 대하여 펩티드 잔기의 3 Å 이내에 존재하는 CDR 루프 잔기를 확인하였다. 상기 분석 결과, 6개의 잔기 (하기 표 3)는 모델 중 대다수가 (4/6 또는 5/6) 3 Å 이내에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 상기 코돈 위치는 비-동족 펩티드-HLA 항원에 결합하는 신규한 돌연변이체를 발견하는 데 사용하고자 하는 A6 TCR 라이브러리 개발을 위한 관심 대상의 초점으로서의 역할을 한다.

표 3

펩티드의 3 Å 이내에 존재하는 CDR 루프 잔기		
루프	접촉 위치	구조 비율(%)
CDR1α	Q31	83%
CDR3α	D98	83%
CDR3β	L99	83%
CDR3α	T97	67%
CDR3β	A102/G102	67%
CDR3α	S99	67%
CDR3β	A100/M100	33%
CDR3β	G101/S101	33%
CDR1α	S32	17%
CDR1β	E30	17%
CDR3β	G98	17%

[0165]

[0166]

표 3에는 6개의 구조에서 펩티드의 3 Å 이내에서 발견되는 A6 TCR 잔기, 및 그가 발견된 구조의 비율(%)이 열거되어 있다. 굵은체로 표시된 위치는 축퇴성 라이브러리를 구축하는 데 사용되었지만, 다른 위치는 다수의 다른 펩티드/HLA 복합체에 대한 TCR을 개발하기 위하여 추가의 라이브러리를 구축하는 데 별개로, 또는 조합하여 함께 사용될 수 있다. A6 TCR 중 5개의 잔기의 위치는 TCR의 단쇄 형태의 서열에 제시되어 있다 (도 5). 추가로, 동족 항원 Tax:HLA.A2에의 고친화도 결합을 위해 앞서 조작된 것인, A6-X15 (서열 번호 3)로 명명되는, 안정화된 A6 단쇄 TCR의 서열이 제시되어 있다. 상기 서열은 또한 앞서 scTCR의 안정성 스크린에서 단리된, 5개의 프레임워크 돌연변이 (S33A, E59D, N63D, N66K, K121I, 이들 모두 Vβ 도메인 중의 것) 및 2개의 CDR 돌연변이 (A52V 및 Q106L, 상기 둘 모두는 Vβ 도메인 중의 것)를 포함한다. 상기 돌연변이체는 또한 Tax:HLA.A2에의 더 높은 고친화도 결합을 나타내는 4개의 CDR3β 돌연변이 (A100M, G101S, G102A, 및 R103Q)를 포함하였다 (문헌 [Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54]). A6-X15는 또한 고도로 안정한 Vα2 세그먼트 (IMGT:

TRAV12-2)를 이용하지만, 안정성 개선을 위해 Phe49Ser Va 돌연변이를 포함한다.

[0167] 실시예 4

[0168] 결합에 기여하는 수개의 CDR 잔기 분석

[0169] 수개의 CDR 잔기가 HLA.A2 나선 및/또는 Tax 펩티드에의 결합에 관여하는 것으로 예측되었다 (문헌 [Borbulevych et al. (2011) J Immunol, 187, 2453-63]; [Marrack et al. (2008) Annu Rev Immunol, 26, 171-203]). HLA.A2에 결합된 상이한 펩티드에 결합하는 A6 TCR 돌연변이체를 조작하는 공정은 그와 HLA.A2 나선와의 상호작용에 결합 에너지를 제공하는 상기 아미노산 측쇄를 유지하는 것으로부터 이익을 얻게 될 것이다. Tax 펩티드 및 tax 펩티드 변이체, 둘 모두를 가지는 A6:pepHLA-A2의 결정 구조는 주로 α 쇄 잔기에 의해 매개되는 pepMHC-접촉을 보였다 (문헌 [Ding et al. (1999) Immunity, 11, 45-56]; [Garboczi et al. (1996) Nature, 384, 134-141]). Va2를 함유하는 TCR에 관한 최근 연구에서는 HLA.A2 나선을 인식하도록 진화된 Va2 세그먼트 중의 추정적 보존적 잔기가 상세하게 기술되었다.

[0170] 도 4에는 Tax:HLA.A2의 결합에의 그의 기여에 대해 선별된 A6 TCR 잔기의 분석이 제시되어 있다. CDR1 또는 CDR2 중 상기 잔기가 MHC 제한을 유지하는 데 중요하다는 것을 제안한 연구에 따라, 문헌 [Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72]의 4개의 잔기를 알라닌으로 치환하고, 결합에 대해 시험하였다. 표 3에는 A6 X15 알라닌 돌연변이체의 친화도 근사치 및 야생형에 대해 상대적인 결합 친화도의 변화 배수가 제시되어 있다. HLA.A2의 나선과 접촉하는, CDR2 α 의 51번 위치에 존재하는 티로신이 결합에 가장 중요하다는 결과가 나왔다. 따라서, 상기 잔기는 본원에 기술된 라이브러리에서 유지되었다.

표 4

[0171]

알라닌 치환		
돌연변이체	결보기 K_D	변화 배수
wt	44 nM	-
S52A	27 nM	0.6X
R28A	68 nM	1.6X
Q31A	>4 μ M	>100X
Y51A	>4 μ M	>100X

[0172] CDR2 α 잔기 Y51 및 S52는 상이한 α 쇄간에 보존되며, 이는 빈번하게는 같은 위치에서 HLA.A2에 결합한다 (문헌 [Marrack et al. (2008) Annu Rev Immunol, 26, 171-203]). 비록 접촉하는 정확한 HLA 잔기는 달라질 수 있지만, CDR1 α 잔기 R28 및 Q31이 MHC 접촉에 중요하다는 것이 MHC의 결정 구조 분석을 통해 밝혀졌다. Q31은 또한 HLA-A2 이외에도 펩티드와 접촉하는 것으로 나타났다 (문헌 [Borbulevych et al. (2011) J Immunol, 187, 2453-63]). 비록 상기 Va2 잔기 (R28, Q31, Y51, 및 S52)가 HLA.A2 분자 접촉에 중요하기는 하지만, 각 접촉의 결합 에너지 기여는 앞서 기술된 바 없다. 어느 잔기가 큰 결합 에너지에 기여하는지, 및 이에 라이브러리에서 유지되어야 하는지를 판정하기 위하여, A6 X15 구축물 각 위치에서 부위 지정 알라닌 돌연변이체를 제조하고, Tax (LLFGYPVYV, 서열 번호 5): HLA-A2 이량체로 염색하였다 (도 4b). 가장 큰 결합 에너지에 기여하는 잔기는 CDR2 α 위치 Y51이었다. 상기 잔기가 A6 wt 구조에서 MHC 나선에 배타적으로 접촉하기 때문에, 상기 잔기는 라이브러리에서 야생형으로서 유지되었다. 그 다음으로 가장 높은 결합 에너지에 기여하는 잔기는 CDR1 α 잔기 Q31이었지만; 상기 잔기는 또한 A6 wt 구조 중의 펩티드와 접촉하는 바, 동족 리간드와의 임의의 교차 반응성을 막기 위해 RD1 라이브러리에서 무작위화하였다. 조사된 나머지 두 잔기, R28 및 S52는 A6:tax:HLA.A2 상호작용에 대하여 실질적으로 결합 에너지에는 기여하지 않았지만, MHC 나선에 대해 증가된 펩티드-비의존성 반응성을 막기 위해 야생형으로서 유지시켰다.

[0173] 실시예 5

[0174] 효모 디스플레이 및 라이브러리 구축

[0175] 본 실시예는 돌연변이체 TCR의 라이브러리의 제조를 기술한다. 단일 스캐폴드로부터 신규한 TCR을 확인하기 위해, 비-동족 항원에 결합하는 회귀 돌연변이체(들)에 대해 TCR 돌연변이체의 라이브러리를 스크리닝할 수 있는 디스플레이 시스템을 사용하는 것이 필요하다. 더 높은 고친화도를 위해 TCR을 조작하는 데 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, 동족 항원에 대해 친화도가 낮은 야생형 TCR을 시스템으로 클로닝하고, 이를 동족 항원에 대한 더 높은 친화도를 가지는 TCR을 조작하기 위한 주형으로서 사용하였다. 상기 시스템 중 임의의 것이 본원에 기술된 접근법에 적용될 수 있었고, 여기서 단일 스캐폴드 TCR (본 경우에는 A6)은 라이브러리의 합리적인 디자인, 및 비-동족 항원에 대한 TCR의 선별을 위한 주형으로서 사용된다.

[0176] 본 실시예에서, 효모 디스플레이를 플랫폼으로서 사용하였다. 단쇄 A6-X15 TCR은 효모 표면 상에서 적절하게 폴딩된 형태로 안정적으로 발현되기 때문에, 이는 주형으로서 사용되었다 (도 6). 도 3C 및 도 4에 제시된 상위 5개의 위치 중 각 위치에 축퇴성 코돈을 함유하는 유전자를 진스크립트(Genscript: 미국 뉴저지주 피스카타웨이)에 의해 합성하고, RD1 라이브러리로 디자인되었다. 이에 완전한 또는 부분적인 코돈 축퇴성을 가지는 유전자는 상업적 공급원에 의해 쉽게 합성될 수 있거나, 또는 다중 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 생성될 수 있다. 합성 유전자는 일반 플라스미드 (예컨대, pET 벡터)로의 클로닝 후 주형으로서, 또는 PCR 생성물 주형으로서 직접 사용될 수 있다. 선형화된 효모 디스플레이 벡터와 상동성인 측면에 위치하는 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 합성하고, 상동성 재조합에 의해 효모 디스플레이 벡터, pCT302 내로 삽입될 수 있는 이중 가닥 PCR 생성물을 생성하기 위해 PCR을 수행하였다. 따라서, 선형화된 pCT302 벡터, A6-X15 RD1 라이브러리 PCR 생성물, 및 적격 EBY100 효모 세포를 조합하여 인간 A6-X15 scTCR 라이브러리를 효모 디스플레이 벡터 내로 도입하였다. 생성된 RD1 라이브러리는 약 6×10^6 개의 독립된 클론을 함유하였고, 전기천공 후, 분취량의 효모를 제한 희석법으로 플레이팅하여 판단하였다. 예상대로, 복합체 중 Tax 펩티드에 근접해 있는 각 잔기의 다양성에 기인하여, 생성된 라이브러리는 펩티드-HLA.A2 다이머X 제제를 사용하여 측정하였을 때, 동족 항원 Tax:HLA-A2 또는 Mart1:HLA-A2 복합체를 사용하는 염색에 대해 양성을 나타내지 않았다.

[0177] 도 6에는, 효모의 표면 상의 scTCR의 발현을 검출하는 데 사용되는, N-말단 헤마글루티닌 (HA) 및 C-말단 c-myc 태그를 포함하는 V β -링커-V α scTCR이 제시되어 있다 (문헌 [Stone et al. (2012) Methods Enzymol, 503, 189-222]). scTCR 구조물은 scTCR이 효모의 표면 상에서 발현되도록 하고, 유세포 분석법을 통해 신속하게 분석되고, 형광 활성화 세포 분류 (FACS)에 의해 스크리닝될 수 있도록 하는 AGA-2 효모 메이팅 단백질과의 융합체로서 발현되었다.

[0178] 5개의 각 코돈 위치에서 RD1 라이브러리의 다양성을 확인하기 위해, 플레이팅된 라이브러리로부터의 10개의 콜로니의 서열을 분석하였다 (도 7). 5개의 각 코돈 위치는 광범위한 다양성을 보였는데, 이는 라이브러리가, HLA.A2에 결합된 펩티드와 접촉할 수 있을 것으로 예측되는 영역 내에 다양한 잠재적인 결합 부위를 포함한다는 것을 나타내는 것이다.

[0179] 실시예 6

[0180] 세포 분류에 의한 효모 디스플레이 A6 TCR 라이브러리 선별

[0181] 본 실시예는 표적 리간드에 결합하는 돌연변이체 TCR을 선별하는 것을 기술한다. 비-동족 펩티드 항원에 결합하는 TCR 돌연변이체를 확인하는 데 A6 스캐폴드 라이브러리가 사용될 수 있는지 여부를 판정하기 위하여, 동족 항원인 Tax:HLA.A2 이외에도 비-동족 항원 Mart1-10mer:HLA.A2를 이용하여 라이브러리를 선별하였다. 이들 두 펩티드는 길이에서 차이를 보일 뿐만 아니라, 정렬되었을 때에는 오직 Mart1-10mer의 2번 위치 (Tax의 1번)의 류신, 및 Mart1의 10번 위치 (Tax의 9번 위치)의 발린만이 동일할 뿐이다. 추가로, 발린은 HLA.A2 고정 잔기인 것으로 간주되며, 이로써 TCR에 노출된 측쇄는 두 경우 사이에는 뚜렷한 차이가 존재한다.

[0182] 라이브러리가 동족 항원에 결합하는 돌연변이체를 포함하는지를 확인하기 위하여, Tax:HLA-A2 이량체를 이용하여 형광 활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하였다 (도 8). 이어서, 하기 표 5에 따라 총 4회의 분류를 위해 순차적으로 10-100 nM Tax (LLFGYPVYV, 서열 번호 5):HLA-A2 이량체 (BD 파르미젠으로부터 입수한 다이머X), APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체를 이용하여 RD1 라이브러리를 분류하였다. 이어서, 매회 분류 후, 분취량의 효모 세포를 100 nM Tax (LLFGYPVYV, 서열 번호 5):HLA-A2 이량체 (BD 파르미젠으로부터 입수한 다이머X), 이어서, APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체와 함께 인큐베이션시켰다. 아미노산 서열이 동일한 클론 사이에도 뉴클레오타이드 서열에는 차이가 나기 때문에, 상기 잔기에 대한 강력한 선택압이 제안되었다.

표 5

[0183]

분류 조건	
분류	조건
1	20 nM Tax (서열 번호 5):HLA-A2 이량체 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체

2	100 nM Tax (서열 번호 5):HLA-A2 이량체 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체
3	10 nM Tax (서열 번호 5):HLA-A2 이량체 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체
4	10 nM Tax (서열 번호 5):HLA-A2 이량체 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체

[0184] 명시된 바와 같이, RD1 라이브러리는 검출가능한 양성 피크를 나타내지는 않았지만, 2차 분류 이후, 양성 집단이 출현하기 시작하였으며, 추가 분석을 위해 4차 분류 후, 세포를 플레이팅하였다. 6개의 클론은 (비록 뉴클레오티드 서열/코돈 사용 빈도는 달랐지만) 6개 중 2개는 A6-X15와 동일한 아미노산 서열을 가졌고, 6개 중 4개는 CDR1 α 의 31번 위치에 트레오닌 치환을 가지는 것으로 밝혀졌다. 클론 모두 유사한 염색 프로파일을 가졌다. 분석된 6개의 클론의 아미노산 및 뉴클레오티드 서열은 도 10에 제시되어 있다. 스캐폴드 접근법이 비-동족 특이성을 가지는 TCR을 생성할 수 있는지 여부를 판정하기 위하여, Mart1-10mer:HLA-A2 이량체를 이용하여 형광 활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하였다 (도 9). 표 5에 따라 총 5회의 분류를 위해 순차적으로 20-500 nM Mart1 (ELAGIGILTV, 서열 번호 7):HLA-A2 이량체 (BD 파르미겐으로부터 입수한 다이머X), APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체를 이용하여 RD1 라이브러리를 분류하였다. 3차 분류 동안, 효모 세포를 또한 닭 항-c-myc 항체, 염소 항-닭 IgY 알렉사 647 2차 항체로 염색하고, 절두된 클론은 배제시키기 위하여 이중 양성인 것은 단리시켰다. (B) 매회 분류 후, 분취량의 효모 세포를 100 nM Mart1 (ELAGIGILTV, 서열 번호 7):HLA-A2 이량체 (BD 파르미겐으로부터 입수한 다이머X), 이어서, APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체와 함께 인큐베이션시켰다.

표 6

[0185]

분류 조건	
분류	조건
1	500 nM Mart1 (서열 번호 7):HLA-A2 이량체 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체
2	500 nM Mart1 (서열 번호 7):HLA-A2 이량체 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체
3	100 nM Mart1 (서열 번호 7):HLA-A2 이량체 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체 및 1:100 항-Cmyc 에피토프 항체 FITC-컨쥬게이트된 염소 항-닭 2차 항체
4	100 nM Mart1 (서열 번호 7):HLA-A2 이량체 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체
5	20 nM Mart1 (서열 번호 7):HLA-A2 이량체 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체

[0186] RD1 라이브러리 및 처음 3회의 분류에서는 검출가능한 양성 피크를 나타내지 않았지만, 4차 분류 이후, 양성 집단이 출현하기 시작하였으며, 추가 분석을 위해 5차 분류 후 세포를 플레이팅하였다. 5개의 클론은 그들 모두 동일한 아미노산 서열을 가지는 것으로 밝혀졌으며, 이는 상기 잔기가 고친화도 결합을 부여하는 데 중요하다는 것으로 나타난다. 비록 아미노산 서열이 동일한 클론 사이의 뉴클레오티드 서열에는 차이가 없었지만, 상기 아미노산 서열에 따라 단 소량의 가능한 코돈 조합이 가능하였다. 아미노산 및 뉴클레오티드 서열은 도 12에 제시되어 있다. 예상대로, Tax 및 Mart1 펩티드 사이의 서열에 있어 뚜렷한 차이가 나는 것에 기인하여, A6 라이브러리의 분류에 의해 도출된 5개의 TCR 잔기는 모두 원래의 고친화도 TCR과 Mart1 선별 사이에서 차이를 보였다. tax:HLA.A2를 사용하여 A6 라이브러리 선별을 수행하였을 때, 야생형 서열은 6개의 서열 중 2개에서 조우하였고 (예컨대, Tax-S4-3), 31번 위치에 트레오닌을 함유하는 변이체는 6개의 서열 중 4개에 존재하였다 (예컨대, Tax-S4-1). Tax-특이 TCR 변이체에서 5개의 잔기는 Leu99 β , Ala102 β , Gln31 α 또는 Thr31 α , Thr97 α , 및 Asp98 α 였다. Mart1-특이 TCR에서 잔기는 Trp99 β , Gly102 β , Thr31 α , Lys97 α , 및 Tyr98 α 였다. 비록 Thr31 α 잔기가 Mart1-특이 TCR 둘 모두 및 Tax-특이 TCR의 한 변이체 (예컨대, Tax-S4-1)에서 발견되기는 하였지만, A6 결정 구조는 상기 위치가 펩티드 및 MHC, 둘 모두를 함유하는 데 있어서 중요한 것으로서 나타난다 (도 4 참

조). 그의 구조상 글루타민과 유사한 것에 기인하여, 트레오닌은 다른 펩티드와의 교차 반응을 유도하지 않으면서 MHC 접촉이 유지될 수 있도록 할 수 있다.

[0187] 실시예 7

[0188] 선별된 고친화도 TCR의 결합 및 특이성 분석

[0189] 항원을 발현하는 세포의 특이적인 표적화를 위하여 본 개시내용에서 TCR을 이용하기 위해서는 그가 펩티드 특이성을 나타내는 것이 중요하다. Tax (서열 번호 5) 및 Mart1 (서열 번호 7) 펩티드에의 결합에 대하여 선별되는 TCR이 선택 펩티드와의 그의 반응에서 특이성을 보이는지 여부를 판정하기 위해, 각각에 대해 대표적인 클론을 다양한 농도의 Tax 및 Mart1:HLA.A2 이량체, 둘 모두로 적정하였다. 4 내지 500 nM 범위의 농도의 Mart1:HLA-A2 다이머X 및 tax:HLA-A2 다이머X로 효모를 적정하여 Mart1:HLA-A2 이량체와의 결합에 대해 선별된 클론 RD1-Mart1-S5-4에 대해 결합 분석을 수행하였다 (도 11 및 13).

[0190] 도 8에 제시되어 있는 바와 같이 Tax:HLA.A2를 이용하여 라이브러리를 4회에 걸쳐 분류한 후, 개별 효모 클론을 배양하고, 유도하고, 세포 표면 수준, 및 펩티드:HLA.A2 결합에 대해 분석하였다. 4차 분류 후 단리된 6개의 클론 중 2개와 아미노산 서열이 동일한 (데이터는 나타내지 않음), X15로 명명되는 A6 고친화도 돌연변이체를 분석하였다.

[0191] 도 9에 제시되어 있는 바와 같이 Mart1:HLA.A2를 이용하여 라이브러리를 5회에 걸쳐 분류한 후, 개별 효모 클론을 배양하고, 유도하고, 세포 표면 수준, 및 펩티드:HLA.A2 결합에 대해 분석하였다. 4차 분류 후 단리된 모든 클론과 아미노산 서열이 동일한 (데이터는 나타내지 않음), S5-4로 명명되는 A6 고친화도 돌연변이체 (서열 번호 33)를 분석하였다.

[0192] Mart1-특이 TCR은 Tax 복합체에는 결합하지 않고, 오직 Mart1 복합체에만 결합하였으며, 1/2 최대 결합 농도는 낮은 나노몰 범위였다. 역으로, Tax-특이 TCR은 Mart1 복합체에는 결합하지 않고, 오직 Tax 복합체에만 결합하였으며, 이 또한 1/2 최대 결합 농도는 낮은 나노몰 범위였다. 심지어 최고 농도에서도 결합하지 않다는 것은 고친화도 TCR 변이체가 선택 리간드, Tax:HLA.A2에 대해 특이성을 유지하였다는 것을 나타내는 것이었다. 유사하게, 심지어 최고 농도에서도 결합하지 않다는 것은 고친화도 TCR 변이체가 선택 리간드, Mart1:HLA.A2에 대해 특이성을 유지하였다는 것을 나타내는 것이었다.

[0193] 실시예 8

[0194] 부위 지정 돌연변이유발법을 통한 MART1-선별된 RD1 스캐폴드 변이체, RD1-MART1-S5-4 scTv의 친화도 성숙

[0195] 선택 리간드 MART1 (서열 번호 7)에 대한 RD1-MART1-S5-4 단리된 scTv (서열 번호 33)의 친화도를 증가시키기 위한 목적으로, 펩티드 MART1/HLA-A2/Ig 이량체에 대한 친화도 증가에 대하여 돌연변이체를 선별하기 위하여 RD1-MART1-S5-4의 CDR3 루프에서 축퇴성 라이브러리를 제조하였다. 총 2회의 분류를 위해 순차적으로 1-200 nM MART1/HLA-A2 이량체 (BD 파르미젠으로부터 입수한 다이머X), APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체를 이용하여 RD1-MART1-S5-4 CDR3 라이브러리를 분류하였다. MART1/HLA-A2/Ig 이량체를 이용하여 FACS하여 2회에 걸쳐 선별을 수행한 후, MART1/HLA.A2에 강력하게 결합한, 양으로 염색된 효모 집단이 출현하였고, 다양한 클론을 단리시키고, 결합에 대해 조사하였다 (도 15a). 이어서, 매회 분류 후, 분취량의 효모 세포를 50 nM MART1/HLA-A2 이량체 (BD 파르미젠으로부터 입수한 다이머X), 이어서, APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체와 함께 인큐베이션시켰다. MART1/HLA.A2 단량체로 염색하였을 때, 한 클론인 RD1-MART1^{sc} (서열 번호 34)은 주형 클론인 RD1-MART1-S5-4로부터 유의적인 결합 증가를 보였다 (도 15b 및 15c).

[0196] 실시예 9

[0197] 선별된 RD1-MART1^{sc} SCTV의 특이성 및 서열

[0198] 단리된 TCR이 오직 선택 리간드 MART1에 대해서 특이적인지 여부를 판정하기 위해, 비-선택 동족 펩티드 Tax/HLA.A2, 비-선택 비-동족 펩티드 WT1/HLA.A2, 및 비-선택 비-동족 펩티드 서비빈/HLA.A2로 RD1-MART1^{sc}를 염색하였다. 염색 결과, 500 nM 펩티드/HLA.A2 이량체의 경우, 검출가능한 신호는 없었으며, 이는 scTv가 선택 항원, MART1에 대하여 고도로 특이적이라는 것을 제안하는 것이었다 (도 16).

[0199] A6 TCR의 야생형 A6 V α 및 V β 영역의 서열은 제시되어 있으며 (문헌 [Garboczi et al. (1996) Nature, 384, 134-141]) 및 고친화도의 단쇄 변이체 A6-X15 (문헌 [Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, &

Selection, 24, 361-72])의 서열은 도 18에 제시되어 있다. 서열 분석 결과, RD1-MART1^{sc} 클론은 RD1-MART1-S5-4 주형으로부터 CDR3 β 에 3개의 돌연변이를 포함하였다 (S101A, Q103G, 및 P104V) (도 18). 따라서, A6과 비교하여, RD1-MART1^{sc}은 TCR α 돌연변이 Q31T, T97K, 및 D98Y, 및 TCR β 돌연변이 L99W, A100M, G101A, R103G, P104V (서열 번호 34)를 포함하였다.

[0200] RD1-MART1^{sc} scTv가 고친화도로 MART1/HLA-A2에 특이적으로 결합하였다는 것으로 추가로 보여주기 위해, 가용성 형태의 RD1-MART1^{sc} scTv를 발현시키고, E. 콜라이 봉입체로부터 리폴딩시키고, C-말단 BirA 태그를 통해 비오티닐화시켰다 (문헌 [Aggen et al. (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 μ M MART1, Tax, 또는 WT1 펩티드와 함께 인큐베이션시키고, 세척하였다. MART-1 펩티드 (1 μ M), 널 펩티드, tax (1 μ M)가 미리 적재된 T2 세포, 또는 펩티드를 포함하지 않는 T2 세포 상에서 비오티닐화된 RD1-MART1^{sc} scTv를 상에서 적정하였다. 세포를 세척하고, SA-PE와 함께 인큐베이션시키고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 오직 MART1 펩티드가 적재된 세포에만 RD1-MART1^{sc} TCR이 결합하였다. 그 결과, 가용성 TCR이 MART-1에 대해 특이적이며, 낮은 나노몰의 결합 친화도를 보이는 것으로 나타났다 (도 17).

[0201] 실시예 10

[0202] 제2 세대 A6 스캐폴드 라이브러리, RD2의 디자인 및 선별

[0203] 스캐폴드 접근법이 A6 TCR 주형을 사용하여 다른 라이브러리와도 작용할 수 있는지를 나타내기 위해, RD1 라이브러리를 생성하는 데 사용된 로제타 모델링 정보 (도 3), 및 MART1/HLA.A2 (PDB: 1JF1) (문헌 [Sliz et al. (2001) J Immunol, 167, 3276-84]) 및 WT1/HLA.A2 (PDB: 3HPJ) (문헌 [Borbulevych et al. (2010) Mol Immunol, 47, 2519-24])의 결정 구조와 오버레이되는 A6:Tax/HLA.A2 결정 구조 (PDB: 1A07) (도 19a)를 사용하여 RD2로 불리는 제2 세대 라이브러리의 생성을 가이드하였다. 상기 라이브러리는 NNK 핵산 조성에 기초하여 5개의 축퇴성 위치 (TCR α D27, G29, 및 S99; TCR β L99 및 W100), 야생형 잔기인 글루타민 또는 트레오닌이 선택될 수 있는 TCR α Q31의 하나의 2원 위치, 및 4개의 인접한 잔기가 A6 야생형 (AGGR, 서열 번호 44) 또는 A6-X15 (MSAQ, 서열 번호 45)로서 선택될 수 있는 CDR3 β 의 s100-103 위치의 2원 서열을 포함하였다 (도 20). 추가로, V α 2의 1번 위치의 글루타민은 누락되었다. 각각의 다양한 위치에서의 RD2 라이브러리의 다양성을 확인하기 위하여, 플레이팅된 라이브러리로부터의 5개의 클론의 서열을 분석하였다 (도 20).

[0204] 5 μ M Tax/HLA.A2 UV-교환 단량체 및 스트렙타아비딘 MACS 비드 (밀테닐 바이오테크(Miltenyl Biotec)로부터 입수)와 함께 인큐베이션시킨 후, RD2 라이브러리의 자기 비드 선별을 2회에 걸쳐 순차적으로 수행하였다 (도 19b). 2차 선별 후, 효모 세포를 1 nM Tax/HLA-A2 이량체 (BD 파르미젠으로부터 입수한 다이머X) 및 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체와 함께 인큐베이션시켰다. 매회 선별 후, 분취량의 효모 세포를 50 nM Tax/HLA-A2 이량체 (BD 파르미젠으로부터 입수한 다이머X), APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체와 함께 인큐베이션시켰다.

[0205] 5 μ M MART1/HLA-A2 UV-교환 단량체 및 스트렙타아비딘 MACS 비드 (밀테닐 바이오테크로부터 입수)와 함께 인큐베이션시킨 후, RD2 라이브러리의 자기 비드 선별을 2회에 걸쳐 순차적으로 수행하였다 (도 19c). 2차 선별 후, 100 nM MART1/HLA-A2 이량체 (BD 파르미젠으로부터 입수한 다이머X) 및 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체와 함께 인큐베이션시켰다. 매회 선별 후, 분취량의 효모 세포를 50 nM MART1/HLA-A2 이량체 (BD 파르미젠으로부터 입수한 다이머X), APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 2차 항체와 함께 인큐베이션시켰다.

[0206] 2회에 걸친 MACS 자기 비드 선별, 이어서, 1회의 FACS를 통해 2개의 펩티드/MHC 리간드, Tax/HLA.A2 (동족) 및 MART1/HLA.A2 (비-동족)를 이용하여 RD2 라이브러리를 선별하였다. 동족 항원인 Tax를 이용하여 선별한 결과, Tax/HLA.A2 단량체를 이용하여 실시한 1차 자기 선별 이후에 양성으로 염색된 집단이 출현한 것으로 나타났다 (도 19B). MART1/HLA.A2를 이용하여 선별하였을 때에는 3차 FACS 선별 이후에 양성으로 염색된 집단이 출현한 것으로 나타났다 (도 19C).

[0207] 실시예 11

[0208] MART1/HLA.A2에 결합하는 RD2 변이체의 단리 및 특징 규명

[0209] MART1/HLA.A2를 이용하여 RD2 라이브러리의 3차 선별을 수행한 후, 6개의 콜로니가 단리되었고, 이를

MART1/HLA.A2에 대한 염색 개선에 대하여 분석하였다 (데이터는 나타내지 않음). 개별 효모 클론을 배양하고, 유도하고, 펩티드/HLA.A2 결합에 대하여 분석하였다. RD2-MART1-S3-3 (서열 번호 41) 및 RD2-MART1-S3-4 (서열 번호 42)로 명명되는 2개의 클론이 MART1/HLA.A2에의 결합 증가를 보였지만 (도 21a 및 21b), 동족 비-선택 Tax/HLA.A2에는 결합하지 않았다 (도 21c 및 21d). 서열 분석을 통해 두 RD2-MART1-S3-3 및 RD2-MART1-S3-4 모두에 대한 A6 야생형 CDR3 루프 서열 AGGR (서열 번호 44)의 선택이 밝혀졌다. 추가로, 두 RD2-MART1-S3-3 및 RD2-MART1-S3-4, 둘 모두 TCR- β M99, TCR- α S27 및 H29, 및 TCR- α 중 2개의 PCR 기반 돌연변이 (S34 및 P40)를 선택하였다. RD2-MART1-S3-3은 CDR1 α 2원 위치 중 31번 위치의 트레오닌을 선택한 반면, RD2-MART1-S3-4 클론은 야생형 Q31을 유지하였다. 추가로, RD2-MART1-S3-4는 L99 및 W100을 선택한 반면, RD2-MART1-S3-3은 TCR α R99 및 S100을 선택하였다 (도 21e).

[0210] 따라서, RD2-MART1-S3-3은 TCR α 돌연변이 D27S, G29H, Q31T, F34S, S40P, S99R, W100S, 및 TCR β 돌연변이 L99M을 함유하였고 (서열 번호 41), RD2-MART1-S3-4는 TCR α 돌연변이 D27S, G29H, F34S, S40P, S99L, 및 TCR β 돌연변이 L99M을 함유하였다 (서열 번호 42).

[0211] 실시예 12

[0212] 대체 스캐폴드의 용도

[0213] 야생형 TCR A6 및 A6 X15로 알려져 있는 A6의 안정화된 변이체 이외에도, 다른 단쇄 TCR을 보여주기 위해, T1-S18.45로 알려져 있는 또 다른 조작된 고친화도 scTCR을 효모 디스플레이 시스템에서 단쇄 스캐폴드에 대한 주형 TCR로서 사용하였다. T1-S18.45는 V α 2 및 V β 16을 사용하고, 이는 MART1/HLA-A2 항원에 대한 것으로 단리되었다 (문헌 [Fleischer et al. (2004) J Immunol, 172, 162-9]). 야생형 단쇄 TCR을 CDR3 라이브러리에 대한 주형으로서 사용하고, 상기와 같이 친화도 성숙을 수행하였다. 고친화도 돌연변이체 T1-S18.45의 서열을 분석한 결과 (도 22), 상기 돌연변이체는 TCR α 돌연변이 N92S, D99S, N100S, A101D, 및 R102F를 함유하는 것으로 나타났다 (서열 번호 43).

[0214] T1-S18.45 scTv가 고친화도로 MART1/HLA-A2에 결합하였다는 것을 추가로 보여주기 위해, 가용성 형태의 T1-S18.45 scTv를 E. 콜라이에서 제조하고, 비오틀화시켰다 (문헌 [Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72]; [Zhang et al. (2007) J Exp Med, 204, 49-55]). 비오틀화된 T1-S18.45 scTv를, MART-1 펩티드 (1 μ M) 또는 널 펩티드인 SL9 (1 μ M)가 미리 적재된 항원 제시 세포주 T2 (HLA-A2+) 상에서 적정하였다. 그 결과, 가용성 TCR이 MART-1에 특이적이고, 이는 낮은 나노몰 결합 친화도를 보이는 것으로 나타났다 (도 23).

[0215] 실시예 13

[0216] 스캐폴드 공정을 이용하여 조작된 TCR의 치료학적 포맷

[0217] 상응하는 항원을 발현하는 세포를 표적화하는 데 더 높은 친화도를 가지는 TCR이 다양한 포맷으로 사용될 수 있다는 것은 현재 주지되어 있다. 따라서, 스캐폴드 전략법으로부터 생성된 TCR은 가용성 형태로, 또는 입양 T 세포 요법을 위한 TCR 유전자 요법으로 사용될 수 있다는 것은 명백하다.

[0218] 도 24에 요약되어 있는 바와 같이, TCR은, 특이적인 펩티드-MHC 항원을 발현하는 표적 세포에 "페이로드"를 나르는 가용성 치료학적 생성물로서 사용하기 위한 것으로 쉽게 포맷화될 수 있다. 상기 포맷은 면역글로불린 융합체, 화학치료제 또는 약물 컨쥬게이트, 및 이중특이성 항체를 포함하는, 관련 기술분야에서 이미 실행되는 있는 것: 1) 결합 적용을 위한 가용성 형태로, 또는 제시된 다른 적용을 위한 플랫폼으로써 발현되는, V α -V β 배향 또는 V β -V α 배향의 단쇄 TCR (여기서, 돌연변이화된, 고친화도 V 도메인은 별표 (*)로 표시); 2) 제품 엔브렐(Enbrel)에서 TNF- α 수용체의 세포외 도메인으로 수행된 바와 같이 (문헌 [Brower (1997) Nat Biotechnol, 15, 1240]), 단쇄 TCR은 프레임 내에서 항체의 불변 영역 도메인과 융합되어 효과기 기능 및 Fc 영역의 다른 특성을 가지는 면역글로불린 융합체로서 제조될 수 있다; 3) 개별 V α 및 V β 도메인은 프레임 내에서 경쇄의 불변 영역 또는 중쇄의 불변 영역에 융합된 융합체와 같이 종래 항체처럼 배열됨으로써 면역글로불린 융합체를 제조할 수 있다; 4) 단쇄 TCR (또는 2 및 3에 제시된 면역글로불린 융합체)은 표적 세포를 사멸시키기 위해 독성 화합물을 펩티드-MHC 표적화 도메인에 부여하기 위한 목적으로 약물에 직접 커플링시킬 수 있다; 5) 단쇄 TCR을 프레임 내에서 항체의 단쇄 Fv (VL-링커-VH)와 함께 단쇄로서 연결시켜 이중특이성 단쇄를 제조할 수 있다; 현재 scFv 기반 이중특이성 항체, 또는 더욱 최근에서는 TCR 기반 이중특이성인 것으로 수행되는 바와 같이, scFv는 T 세포의 활성을 동원하기 위하여 TCR/CD3 복합체의 CD3 서브유닛에 대한 것일 수 있다.

- [0219] 추가로, 도 24b는 TCR 스캐폴드를 사용하여 효모 디스플레이에 의해 고친화도 결합에 대해 단리된 가변 도메인 (V)이 입양 T 세포 요법에서 T 세포에서의 발현을 위해 포유동물 세포 벡터 내로 삽입될 수 있음을 보여주는 것이다. 1) TCR은 현재 주지되어 있는 바와 같이 키메라 항원 수용체 (CAR)에서 단쇄 수용체로서 사용될 수 있거나, 또는 2) 입양 T 세포 포맷으로 종래 TCR 유전자 요법을 위한 전장의 α 및 β TCR로서 클로닝될 수 있다.
- [0220] 항체, 펩티드:HLA-A2, 및 유세포 분석법
- [0221] 효모 표면 발현을 검출하는 데 사용된 항체는 항-HA 에피토프 태그 (클론 HA.11; 코벤스(Covance)), 항-Cmyc 에피토프 태그 (클론 9E10; 몰레큘라 프로브스(Molecular Probes)), 염소-항-마우스 IgG F(ab')₂ 알렉사플루오르 (AlexaFluor) 647 2차 항체 (인비트로젠(Invitrogen)), 및 염소-항-닭 IgG F(ab')₂ 알렉사플루오르 647 2차 항체 (인비트로젠)를 포함하였다. HLA-A2에 결합하는 펩티드 [Tax₁₁₋₁₉: 서열 번호 5, Mart1₂₆₋₃₅ A27L: 서열 번호 7]를 펜실베이니아 주립대 의과 대학 마크로몰레큘라 코어 퍼실리티(Macromolecular Core Facility at Penn State University College of Medicine) (미국 펜실베이니아주 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(BD DimerX))을 사용하였다.
- [0222] A6 RD1 라이브러리 디자인
- [0223] 로제타 백크립 가요성 골격 모델링 알고리즘을 사용하여 어느 CDR 루프 위치가 다양한 펩티드와의 접촉을 허용할 가능성이 가장 높은지를 측정함으로써 축퇴성에 대한 후보 잔기를 확인하였다 (문헌 [Lauck et al. (2010) Nucleic Acids Res, 38, W569-75]; [Smith and Kortemme (2008) J Mol Biol, 380, 742-56]), kortemmelab.ucsf.edu/backrub/). 입력값으로서 A6:Tax 펩티드:HLA-A2 결정 구조 (PDB: 1A07) (문헌 [Garboczi et al. (1996) Nature, 384, 134-141])를 사용함으로써, 로제타를 이용하여 관심의 대상이 되는 다양한 HLA-A2 제한 펩티드 (SL9, Mart1, WT1, 서비빈)에서 멀티플 뮤테이션 뮤타제네시스(Multiple Mutation Mutagenesis) 모듈을 이용함으로써 HLA-A2의 펩티드 결합 그루브로 모델링하였다. 이어서, 각 모델의 최저 에너지 입체형태에 대해 펩티드 잔기의 3 Å 내에 존재하는 CDR 루프 잔기를 결정하고, 앞서 기술된 바와 같이 주형으로서 안정화 돌연변이를 함유하는 A6 X15 scTCR을 이용하여 가장 빈번하게 조우하게 되는 5개의 위치를 축퇴성인 것으로 하였다 (문헌 [Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72]).
- [0224] T 세포 수용체의 그의 동족 펩티드-MHC에 대한 친화도를 개선시키기 위한 컴퓨터 디자인 방법이 기술되었다 (문헌 [Haidar et al. (2009) Proteins, 74, 948-60]; [Hawse et al. (2012) J Immunol, 188, 5819-23]). ZAFFI로 명명되는 상기 디자인 모델에서, 단일 점 돌연변이를 모델링하고, 결합 개선에 대하여 분석하였다. 이어서, 결합을 증가시키는 점 돌연변이를 조합하고, 상가 효과에 대하여 분석하였다. 상기 알고리즘을 사용하여 야생형 TCR보다 99배 더 밀착하여 결합한 4개의 돌연변이를 함유하는 A6 변이체를 기술하였다 (문헌 [Haidar et al. (2009) Proteins, 74, 948-60]). 추후 연구에서, 같은 방법을 사용하여 Mart-1 특이 TCR DMF5의 더 높은 친화도를 가지는 변이체를 디자인하였다. 고친화도 DMF5 변이체는 친화도를 250배 증가시키는 2개의 돌연변이를 함유하였다 (문헌 [Hawse et al. (2012) J Immunol, 188, 5819-23]). 비-동족 리간드에 대하여 신규한 친화도를 가지는 T 세포 수용체를 조작하기 위해 컴퓨터 접근법을 사용하는 것은 기술된 바 없다. 본 발명은 유도 진화를 위해 사용되는 스캐폴드 생성을 가이드하기 위해 컴퓨터 모델링을 사용하는 것을 최초로 제공한다.
- [0225] 로제타 백크립 가요성 골격 모델링 알고리즘을 사용하여 어느 CDR 루프 위치가 다양한 펩티드와의 접촉을 허용할 가능성이 가장 높은지를 측정함으로써 축퇴성에 대한 후보 잔기를 확인하였다 (문헌 [Lauck, 2010 #7691]; kortemmelab.ucsf.edu/backrub/). A6:Tax 펩티드:HLA-A2 결정 구조 (PDB: 1A07)를 사용함으로써, 로제타를 이용하여 관심의 대상이 되는 다양한 HLA-A2 제한 펩티드 (SL9, Mart1, WT1, 서비빈)에서 모델링하였다. 이어서, 각 모델에 대해 펩티드 잔기의 3 Å 내에 존재하는 CDR 루프 잔기를 결정하고, 앞서 기술된 바와 같이 주형으로서 안정화 돌연변이를 함유하는 A6 X15 scTCR을 이용하여 가장 빈번하게 조우하게 되는 5개의 위치를 축퇴성인 것으로 하였다 (문헌 [Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72]).
- [0226] 라이브러리 생성, 디스플레이, 및 선별
- [0227] Trp 배지 중에서의 성장을 허용하는 갈락토스-유도성 AGA2 융합체를 함유하는 효모 디스플레이 플라스미드 pCT302 (V β -L-V α) (문헌 [Boder and Wittrup (1997) Nat. Biotech., 15, 553-557]; [Boder and Wittrup (2000) Methods Enzymol, 328, 430-44])에서 A6 RD1 라이브러리를 발현시켰다. scTv 유전자의 유도는 형질전환된 EBY100 효소 세포의 선별 배지 중에서의 증식 정지기까지의 성장, 이어서, 갈락토스-함유 배지로의 이동을

포함하였다.

[0228] 진스크립트 (미국 뉴저지주 피스카타웨이)에 의해 주형으로서 A6 X15를 사용하여 A6 RD1 라이브러리를 합성하였다 (문헌 [Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72]; [Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54]). 구축물은 링커 영역 GSADDAKKDAKKDGKS (서열 번호 21)에 의해 부착된 가변 단편 (문헌 [Aggen et al. (2011) Protein Engineering, Design, & Selection, 24, 361-72]; [Kieke et al. (1999) Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 5651-6]; [Soo Hoo et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 4759-4763]; [Weber et al. (2005) Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 19033-8]), 및 N-말단 HA 및 C-말단 Cmyc 에피토프 태그로 구성되었다. 하기 유전자를 합성하였다 (여기서, "X"로 표시된 영역은 축퇴성인 위치가 됨):

NAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMAWYRQDPGMGLRLIHYSVGVGI
TDQGDVPDGYKVSRTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASRPGXMSXQPELYFGPG
TRLTVTEDLINGSADDAKKDAKKDGKSQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYS DR
GSXSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQP SDS
ATYLC AVTXXSWGKLQFGAGTQVVVTPDEQKLISEEDL** (서열 번호 4).

[0229]
[0230] 5' 서열 TCT GCT AGC (서열 번호 48) 및 3' 서열 CTC GAG ATC TGA (서열 번호 49)를 사용하여 효모 및 E. 콜라이, 둘 모두에 대해 유전자를 코돈 최적화시켰다.

[0231] 효모에서 상동성 재조합을 수행하기 위해,

정방향 프라이머 5'- CAGGCTAGTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGT
GGTGGTGGTTCTGCTAGCAATGCTGGTGTAAACACAAACGCCAA-3' (서열 번호 50) 및
역방향 프라이머 5'-GGAACAAAGTCGATTTTGTACATCTACACTGTTGTAAACAGATC

[0232] TCGAGTCATTATAAATCTTCTTCAGAGATC-3' (서열 번호 51) 을 사용하여 합성된 라이브러리에 pCT302 오버행을 추가하였다. NheI 및 XhoI로 분해된 pCT302와 함께 PCR 생성물을 전기천공 시킴으로써 EBY100 효모에서의 상동성 재조합에 의해 효모 라이브러리를 생성하였다 (문헌 [Benatuil et al. (2010) Protein Eng Des Sel, 23, 155-9]; [Colby et al. (2004) Methods Enzymol, 388, 348-58]; [Starwalt et al. (2003) Protein Eng, 16, 147-56]; [Swers et al. (2004) Nucleic Acids Res, 32, e36]). 생성된 라이브러리 크기는 6×10^6 이었다. 라이브러리를 48 h 동안 갈락토스-함유 배지 (SG-CAA) 중에서 유도하고, 1 mL 1% PBS/BSA로 세척하고, 하기: 염소-항-마우스 IgG F(ab')₂ 알렉사플루오르 647 2차 항체 (1:100)와 함께 항-HA 에피토프 태그 (1:50), 항-V α 2 항체 (1:50), 및 tax 또는 Mart1 펩티드:HLA-A2 다이머X (100 nM), 및 염소-항-닭 IgG F(ab')₂ 알렉사플루오르 647 2차 항체 (1:100)와 함께 항-cmyc (1:50)로 염색하였다. 세포를 세척하고 (1 mL, 1% PBS/BSA), FACS 아리아(FACS Aria) (BD 바이오사이언스(BD Bioscience)) 고속 분류기를 이용하여 형광성이 가장 큰 세포를 선별하였다. tax:HLA-A2 이량체 (10-20 nM) 및 Mart1:HLA-A2 이량체 (20-500 nM)를 이용하여 선별을 수행하였다.

[0233] RD-MART1 CDR3 효모 디스플레이 라이브러리의 생성, 디스플레이, 및 선별

[0234] RD1 라이브러리로부터 선별되는 RD1-MART1 scTV 클론을 주형으로서 사용하여 한 번에 걸쳐 있는 5개의 인접 코돈을 중복 확장에 의한 스플라이싱(splicing by overlap extension: SOE) PCR에 의해 CDR3 라이브러리를 생성하였다 (CDR3 β 루프에서 2개의 라이브러리; CDR3 α 루프에서 1개의 라이브러리) (문헌 [Horton et al. (1990) Biotechniques, 8, 528-35]). 하기 프라이머 쌍을 사용하여 4개의 라이브러리 각각에 대해 프리-SOE PCR 생성물을 생성하였다:

β 1: 5'- GGC AGC CCC ATA AAC ACA CAG TAT -3' (서열 번호 52) (스플라이스 4L) 및
5'- CGG ACG GGA AGC GCA GAA ATA CAC TGA GGT TTG AGA AGG TGC
AGC GCT TAA CAG ACG CAG CGG -3' (서열 번호 53) 및 5'- ACC TCA GTG TAT
TTC TGC GCT TCC CGT CCG NNK NNK NNK NNK NNK CAG CCT GAA CTG
TAC TTT GGT CCA GGC ACT AGA C -3' (서열 번호 54) 및 5'- TAA TAC GAC
TCA CTA TAG GG -3' (서열 번호 55) (T7); β 2: 스플라이스 4L 및 5'- CGG ACG GGA

AGC GCA GAA ATA CAC TGA GGT TTG AGA AGG TGC AGC GCT TAA CAG
ACG CAG CGG -3' (서열 번호 56) 및 5'- ACC TCA GTG TAT TTC TGC GCT
TCC CGT CCG GGT TGG NNK NNK NNK NNK NNK GAA CTG TAC TTT GGT
CCA GGC ACT AGA CTG ACC G -3' (서열 번호 57) 및 T7; α : 스플라이스 4L 및 5'-
CGT AAC CGC GCA CAA GTA TGT GGC CGA ATC GGA AGG CTG GGA GTC
ACG AAT CAG CAA ACT AAC ATA CTG GC -3' (서열 번호 58) 및 5'- TCC GAT
TCG GCC ACA TAC TTG TGC GCG GTT ACG NNK NNK NNK NNK NNK AAA
CTG CAA TTT GGT GCG GGC ACC CAG GTT GTG G -3' (서열 번호 59) 및 T7.

각 라이브러리에 대한 스플라이스 4L 및 T7, 둘 모두와 함께 각각의 상응하는 프리-SOE를 이용하여 SOE PCR을 수행하였다.

NheI 및 XhoI로 분해된 효모 디스플레이 벡터 pCT302와 함께 PCR 생성물을 전기천공시킴으로써 EBY100 효모에서의 상동성 재조합에 의해 효모 라이브러리를 생성하였다 (문헌 [Benatuil et al. (2010) Protein Eng Des Sel, 23, 155-9]; [Colby et al. (2004) Methods Enzymol, 388, 348-58]; [Starwalt et al. (2003) Protein Eng, 16, 147-56]; [Swers et al. (2004) Nucleic Acids Res, 32, e36]). 생성된 라이브러리 크기는 β 1의 경우: 2.1×10^7 , β 2의 경우: 1.7×10^7 , 및 α 의 경우: 1.1×10^7 이었다. 상대적인 다양성을 반영하는 비로 동일한 세포 개수로 라이브러리를 풀링하고, SD-CAA 중에서 확장시켰다.

조합된 라이브러리를 48시간 동안 갈락토스-함유 배지 (SG-CAA) 중에서 유도하고, 1 mL 1% PBS/BSA로 세척하고, MART1/HLA.A2 다이머X, 염소-항-마우스 IgG F(ab')₂ 알렉사플루오르 647 2차 항체 (1:100)로 염색하였다. 세포를 세척하고 (1 mL, 1% PBS/BSA), FACS 아리아 (BD 바이오사이언스) 고속 분류기를 이용하여 형광성이 가장 큰 세포를 선별하였다. MART1/HLA-A2 이량체 (1-200 nM)를 이용하여 선별을 수행하였다. 항-HA 에피토프 태그 (1:50), 염소-항-마우스 IgG F(ab')₂ 알렉사플루오르 647 2차 항체 (1:100), 및 항-cmyc (1:50), 염소-항-닭 IgG F(ab')₂ 알렉사플루오르 647 2차 항체 (1:100)를 이용하여 발현을 모니터링하였다.

A6 RD2 라이브러리 디자인

PyMOL 소프트웨어 (더 PyMOL 분자 그래픽 시스템(The PyMOL Molecular Graphics 시스템), 버전 1.5.0.4 슈뢰딩거 LLC(Schrodinger, LLC))를 사용하여 A6:Tax/HLA.A2 복합체 (PDB:1A07)의 결정 구조를 MART1/HLA.A2 (PDB: 1JF1) (문헌 [Sliz et al. (2001) J Immunol, 167, 3276-84]) 및 WT1/HLA.A2 (PDB: 3HPJ) (문헌 [Borbulevych et al. (2010) Mol Immunol, 47, 2519-24])의 결정 구조와 오버레이시켰다. 시각적 검사 및 합리적인 디자인을 사용하여 오버레이된 결정 구조에서 MART1/HLA.A2 및 WT1/HLA.A2와 매우 근접한 A6:Tax/HLA.A2 결정 구조 중의 잔기 위치를 선별하였다. 5개의 위치 (TCR α D27, G29, 및 S99; TCR β L99 및 W100)는 NNK 핵산 조성에 기초하여 축퇴성인 위치가 되었다. V α 2의 제1 위치의 글루타민은 합성으로 생략되었다. TCR α 위치 Q31은 야생형 잔기인 글루타민 또는 트레오닌이 선별될 수 있는 2원 위치였고, CDR3 β 중의 100-103번 위치는 인접한 4개의 잔기가 A6 야생형 (AGGR, 서열 번호 44) 또는 A6-X15 (MSAQ, 서열 번호 45)로서 선별될 수 있는 2원인 것이었다.

RD2 효모 디스플레이 라이브러리 생성, 디스플레이, 및 선별

Trp 배지 중에서의 성장을 허용하는 갈락토스-유도성 AGA2 융합체를 함유하는 효모 디스플레이 플라스미드 pCT302 (V β -L-V α) (문헌 [Boder and Wittrup (1997) Nat. Biotech., 15, 553-557]; [Boder and Wittrup

(2000) Methods Enzymol, 328, 430-44])에서 A6 RD2 라이브러리를 발현시켰다. scTv 유전자의 유도는 형질전환된 EBY100 효소 세포의 선별 배지 중에서의 증식 정지기까지의 성장, 이어서, 갈락토스-함유 배지로의 이동을 포함하였다. DNA2.0 (미국 캘리포니아주 멘로 파크)에 의해 주형으로서 A6-X15를 사용하여 A6 RD2 라이브러리를 합성하였다. 구축물은 링커 영역 GSADDAKKDAKKDGKS (서열 번호 21)에 의해 부착된 가변 단편 및 N-말단 HA 및 C-말단 Cmyc 에피토프 태그로 구성되었다. 하기 유전자를 합성하였다 (여기서, "X"로 표시된 영역은 NNS 코돈에 의해 축퇴성인 것으로 하고, "1234"로 표시된 위치는 A6 야생형 CDR3 루프 AGGR (서열 번호 44) 또는 A6-X15 CDR3 루프 MSAQ (서열 번호 45)를 허용하는 2원이고, "#"으로 표시된 위치는 야생형 잔기 Q 또는 돌연변이화된 T를 허용하는 2원이고, "*"로 표시된 위치는 종결 코돈임):

NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMAWYRQDPGMGLRLIHYSVGVGI
TDQGDVPDGYKVSRTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASRPGX1234PELYFGPGT
RLTVTEDLINGSADDAKKDAKKDGKSKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSXRXS
#SFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIIRDSQPSDSAT
YLCVTTDXGKLQFGAGTQVVTPDIEQKLISEEDL** (서열 번호 35).

[0244]

[0245]

효모에 대해 유전자를 코돈 최적화시키고, T7 및 스플라이스 4L 클로닝 프라이머와 오버레이를 포함하는 하기의 측면 DNA 서열을 추가하였다:

N-말단 DNA 서열: 5' – GGC AGC CCC ATA AAC ACA CAG TAT GTT TTT AAG GAC
AAT AGC TCG ACG ATT GAA GGT AGA TAC CCA TAC GAC GTT CCA GAC TAC
GCT CTG CAG GCT AGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT
GGT GGT GGT GGT TCT GCT AGC – 3' (서열 번호 60), 및 C-말단 DNA 서열:
5' – CTC GAG ATC TGT TAA CAA CAG TGT AGA TGT AAC AAA ATC
GAC TTT GTT CCC ACT GTA CTT TTA GCT CGT ACA AAA TAC AAT ATA CTT
TTC ATT TCT CCG TAA ACA ACA TGT TTT CCC ATG TAA TAT CCT TTT CTA
TTT TTC GTT CCG TTA CCA ACT TTA CAC ATA CTT TAT ATA GCT ATT CAC
TTC TAT ACA CTA AAA AAC TAA GAC AAT TTT AAT TTT GCT GCC TGC CAT
ATT TCA ATT TGT TAT AAA TTC CTA TAA TTT ATC CTA TTA GTA GCT AAA
AAA AGA TGA ATG TGA ATC GAA TCC TAA GAG AAT TGA GCT CCA ATT CGC
CCT ATA GTG AGT CGT ATT A – 3' (서열 번호 61).

[0246]

[0247]

스플라이스 4L 및 T7 프라이머를 사용하여 PCR을 통해 전달된 PCR 생성물을 증폭시키고, NheI 및 XhoI 분해된 효모 디스플레이 벡터 pCT302와 함께 증폭된 PCR 생성물을 전기천공시킴으로써 EBY100 효모에서의 상동성 재조합에 의해 효모 라이브러리를 생성하였다 (문헌 [Benatui et al. (2010) Protein Eng Des Sel, 23, 155-9]; [Colby et al. (2004) Methods Enzymol, 388, 348-58]; [Starwalt et al. (2003) Protein Eng, 16, 147-56]; [Swers et al. (2004) Nucleic Acids Res, 32, e36]). 생성된 라이브러리 크기는 2.4×10^8 이었다.

[0248]

RD2 라이브러리를 48시간 동안 갈락토스-함유 배지 (SG-CAA) 중에서 유도하고, 1 mL 1% PBS/BSA로 세척하고, 5 μ m Tax (서열 번호 5) 또는 MART1 (서열 번호 7) 펩티드/HLA.A2 UV-교환 HLA.A2 단량체 (문헌 [Rodenko et al. (2006) Nat Protoc, 1, 1120-32]; [Toebe et al. (2006) Nat Med, 12, 246-51])로 염색하였다. 퀴드로 MACS™ 분리기(QuadroMACS™ Separator) (밀테닐 바이오테크) 상에서 MACS LS 칼럼을 사용하여 초 2회에 걸쳐 선별하기 위해 스트랩트아비딘 MACS 마이크로비드 (밀테닐 바이오테크)를 사용하여 자기 비드 선별을 수행하였다. 2회에 걸쳐 선별한 후, 선별된 라이브러리를 하기: 선택성 펩티드/HLA.A2 다이머X, 염소-항-마우스 IgG F(ab')₂ 알렉사플루오르 647 2차 항체 (1:100)로 염색하였다. 세포를 세척하고 (1 mL, 1% PBS/BSA), FACS 아리아 (BD 바이오사이언스) 고속 분류기를 이용하여 형광성이 가장 큰 세포를 선별하였다. 각각 동족 항원 Tax 선별을 위해, 및 비-동족 항원 MART1 선별을 위해 1 nM 및 100 nM 펩티드/HLA.A2를 이용하여 선별을 수행하였다. 항-HA 에피토프 태그 (1:50), 염소-항-마우스 IgG F(ab')₂ 알렉사플루오르 647 2차 항체 (1:100), 및 항-cmyc (1:50), 염소-항-닭 IgG F(ab')₂ 알렉사플루오르 647 2차 항체 (1:100)를 이용하여 발현을 모니터링하였다.

[0249]

고친화도 클론 단리 및 염색

- [0250] Tax:HLA-A2를 이용하여 4차 분류 및 Mart1:HLA-A2를 이용하여 5차 분류를 수행한 후, 제한 희석액을 플레이트팅시켜 단일 콜로니를 단리시켰다. 콜로니를 확장시키고, 48시간 동안 갈락토스-함유 배지 (SG-CAA) 중에서 유도하고, 1 mL 1% PBS/BSA로 세척하고, 하기: 염소-항-마우스 IgG F(ab')₂ 알렉사플루오르 647 2차 항체 (1:100)와 함께 항-HA 에피토프 태그 (1:50), 항-V α 2 항체 (1:50), 및 tax 또는 Mart1 펩티드: HLA-A2 다이머X (100 nM), 및 염소-항-닭 IgG F(ab')₂ 알렉사플루오르 647 2차 항체 (1:100)와 함께 항-cmyc (1:50)로 염색하였다. 세포를 세척하고 (1 mL, 1% PBS/BSA), 어큐리(Accuri) C6 유세포 분석기 상에서 분석하였다.
- [0251] 자이모프렙™ 이스트 플라스미드 미니프렙 II(Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II) (자이모 리서치(Zymo Research))를 사용하여 플라스미드를 회수하고, 서브클로닝 에피시언시™ DH5 α ™ 컴피턴트 셀즈(Subcloning Efficiency™ DH5 α ™ Competent Cells) (인비트로젠)로의 열 충격 형질전환을 통해 E. 콜라이로 역도입시켰다. E. 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.
- [0252] 참고 문헌 및 변형에 의한 인용에 관한 진술
- [0253] 본원에서 인용된, 모든 참고 문헌, 예를 들어, 등록된 또는 승인된 특허 또는 공개물을 포함하는 특허 문서; 특허 출원 공개; 및 비특허 문헌 문서 또는 다른 원 자료는 비록 각 참고 문헌이 본 출원의 개시내용과 적어도 부분적으로는 일치하는 정도로 참조로서 개별적으로 포함되기는 하지만, 그의 전문이 본원에서 참조로 포함된다 (예를 들어, 부분적으로 불일치하는 참고 문헌은 참고 문헌 중 부분적으로 불일치하는 부분을 제외하면, 참조로 인용됨).
- [0254] 본 명세서에서 언급된 모든 특허 및 공개 문헌은 본 개시내용이 속하는 통상의 기술자의 기술 수준을 나타낸다. 최신 기술을 언급하기 위해, 일부 경우에는 그의 출원일로서 나타내기 위해 본원에서 인용된 참고 문헌은 그의 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 비롯한, 선행 기술에 공지된 화합물은 본 청구범위에 포함하지 않는 것으로 한다는 것을 이해하여야 한다.
- [0255] 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.
- [0256] "포함한다(comprise)," "포함한다(comprises)," "포함된," 또는 "포함하는"이라는 용어가 본원에서 사용될 때, 하나 이상의 다른 특징, 정수, 단계, 성분, 또는 그의 군들의 존재 또는 부가를 배제하는 것이 아니라, 언급된 특징, 정수, 단계, 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 구성된다/본질적으로 구성된다"라는 용어로 대체됨으로써 반드시 동등적인 것은 아닌 추가의 실시형태를 기술하는 것인 본 개시내용의 별개의 실시형태 또한 포함하는 것으로 한다. 명확하게 하기 위해, 본원에서 사용되는 바, "포함하는"이라는 것은 "가지는," "비롯한," "함유하는," 또는 "~을 특징으로 하는"이라는 것과 동의어로 사용되며, 포괄적이고, 제한을 두지 않는 양단 개방형이며, 추가의 언급되지 않는 요소 또는 방법 단계를 배제시키지 않는다. 본원에서 사용되는 바, "~로 구성된"이라는 것은 청구범위 요소에서 명시되지 않는 임의의 요소, 단계, 성분, 또는 구성 요소는 배제시킨다. 본원에서 사용되는 바, "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 부재 하에서도 적합하게 실시될 수 있다.
- [0257] 본 개시내용은 구체적이고, 바람직한 다양한 실시형태 및 기법을 참조로 하여 기술되었다. 그러나, 본 개시내용의 정신 및 범주 내에서 그대로 유지되면서, 많은 변형 및 수정이 이루어질 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 본원에서는 광범위하게 기술되었는 바, 본원에서 구체적으로 기술된 것 이외의 조성물, 방법, 장치, 장치 요소, 물질, 임의적 특징, 방법 및 기법은 과도한 실험에 의존하지 않고도 본 개시내용을 실시하는 데 적용될 수 있다는 것을 통상의 기술자는 이해할 것이다. 본원에 기술된 조성물, 방법, 장치, 장치 요소, 물질, 방법 및 기법의

관련 기술분야에 공지된 모든 기능적 등가물; 및 그의 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 비롯한, 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.

[0258] 통상의 기술자는 본 개시내용이 본 목적을 수행하고, 언급된 수단 및 이점 뿐만 아니라, 그의 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 생각해줄 수 있을 것이며, 이는 본 개시내용의 정신에 포함될 것이다.

[0259] 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., Insaioo F. K., Piepenbrink K., H., Baker B. M. and Kranz D. M. (2011) Identification and engineering of human variable regions that 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.

[0260]

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., Do P. and Baker B. M. (2010) Structures of native and affinity-enhanced WT1 epitopes bound to HLA-A*0201: implications for WT1-based cancer therapeutics. *Mol Immunol* **47**, 2519-24.
13. Borbulevych O. Y., Santhanagopalan 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.
14. Brower V. (1997) Enbrel's phase III reinforces prospects in RA [news]. *Nat Biotechnol* **15**, 1240.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
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.

[0261]

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. Fleischer K., Schmidt B., Kastenmuller W., Busch D. H., Drexler I., Sutter G., Heike M., Peschel C. and Bernhard H. (2004) Melanoma-reactive class I-restricted cytotoxic T cell clones are stimulated by dendritic cells loaded with synthetic peptides, but fail to respond to dendritic cells pulsed with melanoma-derived heat shock proteins in vitro. *J Immunol* **172**, 162-9.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Hoogenboom H. R. (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* **23**, 1105-16.
33. Horton R. M., Cai Z. L., Ho S. N. and Pease L. R. (1990) Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **8**, 528-35.
34. Jarvis L. M. (2012) Rethinking Antibody-Drug Conjugates. *Chemical and Engineering News* **90**, 12-18.
35. 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.
36. 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.
37. 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.

38. 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.
39. 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* **18**, 980-7.
40. Litvak-Greenfeld D. and Benhar I. (2012) Risks and untoward toxicities of antibody-based immunoconjugates. *Adv Drug Deliv Rev*.
41. Manning T. C. and Kranz D. M. (1999) Binding energetics of T-cell receptors: correlation with immunological consequences. *Immunology Today* **20**, 417-422.
42. 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.
43. Marsh S. G. E., Parham P. and Barber L. D. (2000) *The HLA Facts Book*. Academic Press, London.
44. Mason D. (1998) A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T- cell receptor. *Immunol Today* **19**, 395-404.
45. 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.
46. Molloy P. E., Sewell A. K. and Jakobsen B. K. (2005) Soluble T cell receptors: novel immunotherapies. *Curr Opin Pharmacol* **5**, 438-43.
47. Murphy K. (2012) *Janeway's immunobiology*. Garland Science, New York.
48. Nold M. F., Nold-Petry C. A., Zepp J. A., Palmer B. E., Buffer P. and Dinarello C. A. (2010) IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol* **11**, 1014-22.
49. Pastan I., Hassan R., Fitzgerald D. J. and Kreitman R. J. (2006) Immunotoxin therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 559-65.
50. 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.
51. 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.
52. Reichert J. M. and Valge-Archer V. E. (2007) Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 349-56.
53. Ricart A. D. and Tolcher A. W. (2007) Technology insight: cytotoxic drug immunoconjugates for cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* **4**, 245-55.
54. 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.

55. Richman S. A. and Kranz D. M. (2007) Display, engineering, and applications of antigen-specific T cell receptors. *Biomol Eng* **24**, 361-73.
56. 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.
57. Rodenko B., Toebes M., Hadrup S. R., van Esch W. J., Molenaar A. M., Schumacher T. N. and Ovaa H. (2006) Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. *Nat Protoc* **1**, 1120-32.
58. Rudolph M. G., Stanfield R. L. and Wilson I. A. (2006) How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* **24**, 419-66.
59. Sadelain M., Brentjens R. and Riviere I. (2009) The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol* **21**, 215-23.
60. 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.
61. Schrama D., Reisfeld R. A. and Becker J. C. (2006) Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 147-59.
62. Scott J. K. and Smith G. P. (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**, 386-90.
63. 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.
64. Sliz P., Michielin O., Cerottini J. C., Luescher I., Romero P., Karplus M. and Wiley D. C. (2001) Crystal structures of two closely related but antigenically distinct HLA-A2/melanocyte-melanoma tumor-antigen peptide complexes. *J Immunol* **167**, 3276-84.
65. 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.
66. 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.
67. Starr T. K., Jameson S. C. and Hogquist K. A. (2003) Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 139-76.
68. 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.
69. Stone J. D., Chervin A. S., Aggen D. H. and Kranz D. M. (2012) T cell receptor engineering. *Methods Enzymol* **503**, 189-222.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. Tayal V. and Kalra B. S. (2008) Cytokines and anti-cytokines as therapeutics--an update. *Eur J Pharmacol* **579**, 1-12.
74. Thakur A. and Lum L. G. (2010) Cancer therapy with bispecific antibodies: Clinical experience. *Curr Opin Mol Ther* **12**, 340-9.
75. Toebes M., Coccoris M., Bins A., Rodenko B., Gomez R., Nieuwkoop N. J., van de Kastele W., Rimmelzwaan G. F., Haanen J. B., Ovaa H. and Schumacher T. N. (2006) Design and use of conditional MHC class I ligands. *Nat Med* **12**, 246-51.
76. Tonegawa S. (1988) Nobel lecture in physiology or medicine--1987. Somatic generation of immune diversity. *In Vitro Cell Dev Biol* **24**, 253-65.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. 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., Purbhoo 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.
81. 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.
82. Wong R. L., Liu B., Zhu X., You L., Kong L., Han K. P., Lee H. I., Chavallaz 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.
83. Zhang B., Bowerman N. A., Salama J. K., Schmidt H., Spiotto M. T., Schietinger A., Yu P., Fu Y. X., Weichselbaum R. R., Rowley D. A., Kranz D. M. and Schreiber H. (2007) Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells. *J Exp Med* **204**, 49-55.

[0265]

[0266] 미국 특허

[0267] 제7,569,357호; 출원일: 2004년 4월 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.

[0268] 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.

[0269] 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.

[0270] 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.

[0271] 제6,696,251 호; 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.

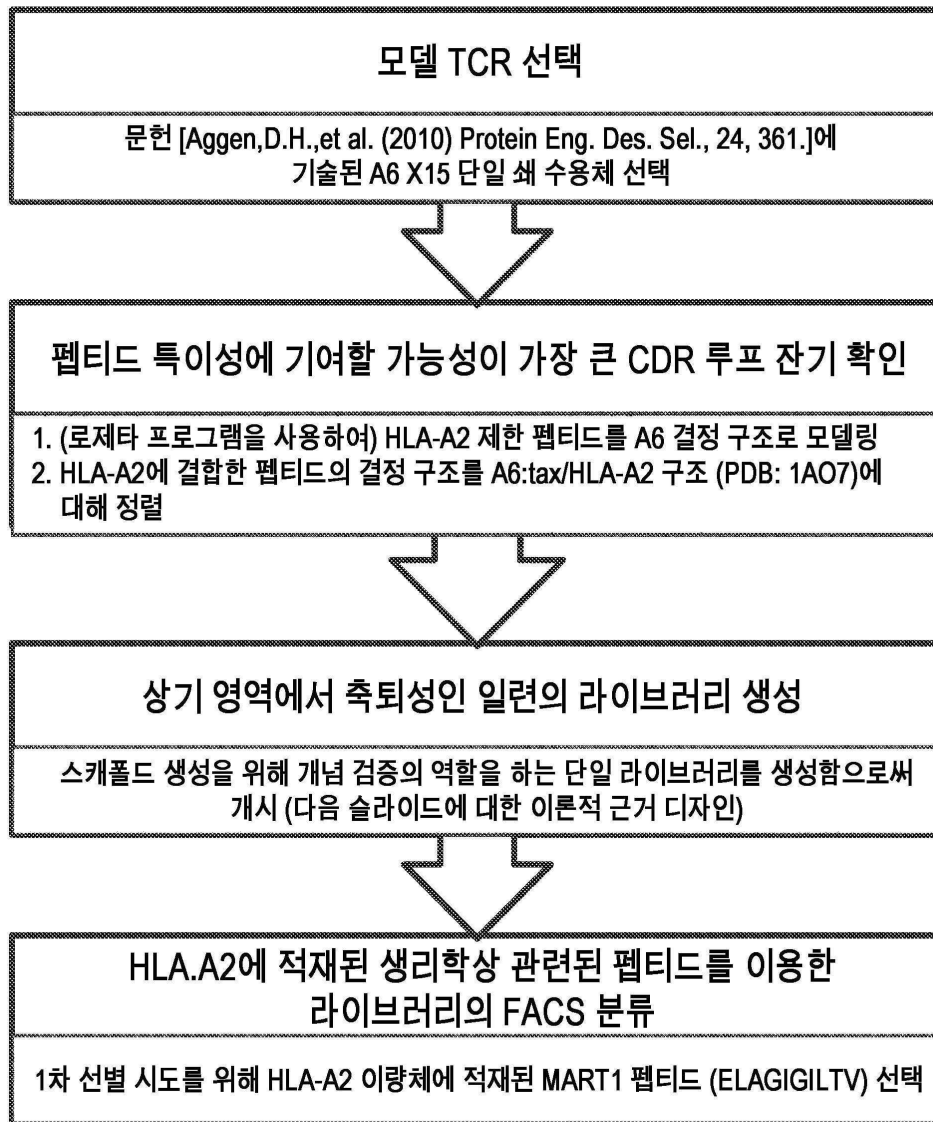
[0272] 제6,423,538호; 출원일: 2000년 11월 28일; 등록일: 2002년 7월 23일; 출원인: 보드 오브 트러스티즈 유니버시티 오브 일리노이. 발명의 명칭: Yeast cell surface display of proteins and uses thereof.

[0273] 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.

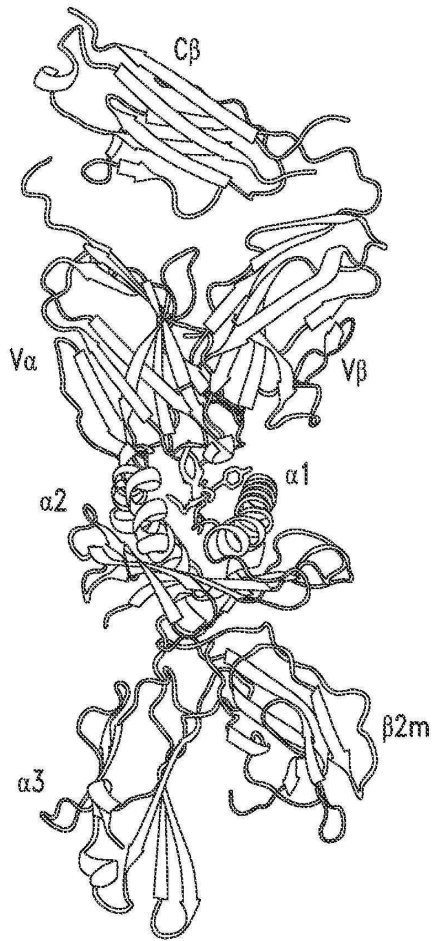
- [0274] 제8,143,376호; 출원일: 2005년 5월 18일; 등록일: 2012년 3월 27일; 출원인: 이뮤노케어 리미티드(Immunocore Limited); 발명의 명칭: High affinity NY-ESO T cell receptor.
- [0275] 제8,088,379호; 출원일: 2007년 9월 26일; 등록일: 2012년 1월 3일; 출원인: 이뮤노케어 리미티드; 발명의 명칭: Modified T cell receptors and related materials and methods.
- [0276] 제8,017,730호; 출원일: 2006년 5월 19일; 등록일: 2011년 9월 13일; 출원인: 이뮤노케어 리미티드; 발명의 명칭: T cell receptors which bind to antigen-HLA-A24.
- [0277] 제7,763,718호; 출원일: 2007년 10월 29; 등록일: 2010년 7월 27일; 출원인: 이뮤노케어 리미티드; 발명의 명칭: Soluble T cell receptors.
- [0278] 제7,666,604호; 출원일: 2003년 7월 9일; 등록일: 2010년 2월 23일; 출원인: 이뮤노케어 리미티드; 발명의 명칭: Modified soluble T cell receptor.
- [0279] 제7,608,410호; 출원일: 2008년 10월 7일; 등록일: 2009년 10월 27일; 출원인: 이뮤노케어 리미티드; 발명의 명칭: Method of improving T cell receptors.
- [0280] 제7,569,664호; 출원일: 2003년 10월 3일; 등록일: 2009년 8월 4일; 출원인: 이뮤노케어 리미티드; 발명의 명칭: Single chain recombinant T cell receptors.
- [0281] 제8,105,830호; 출원일: 2005년 11월 5일; 등록일: 2012년 1월 31일; 출원인: 알토 바이오사이언스 코포레이션(Altor Bioscience Corporation); 발명의 명칭: Polyspecific binding molecules and uses thereof.
- [0282] 제6,534,633호; 출원일: 1999년 10월 21일; 2003년 3월 18일; 출원인: 알토 바이오사이언스 코포레이션; 발명의 명칭: Polyspecific binding molecules and uses thereof.

도면

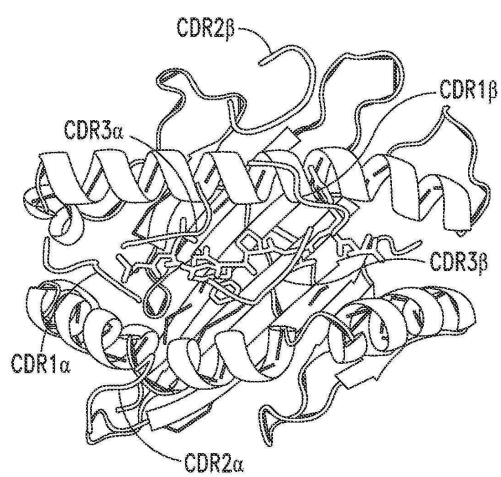
도면1



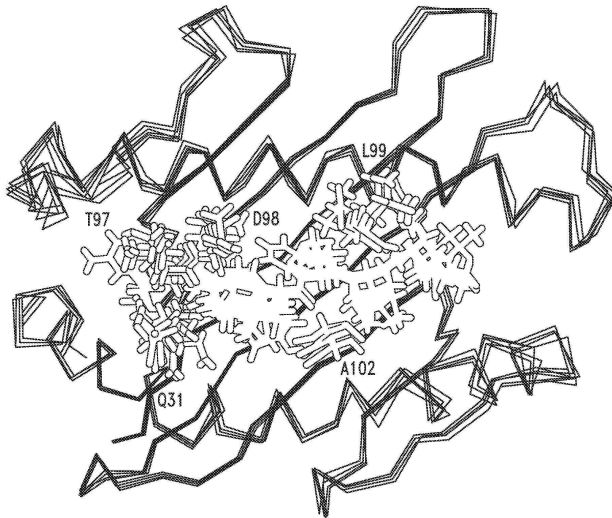
도면2a



도면2b

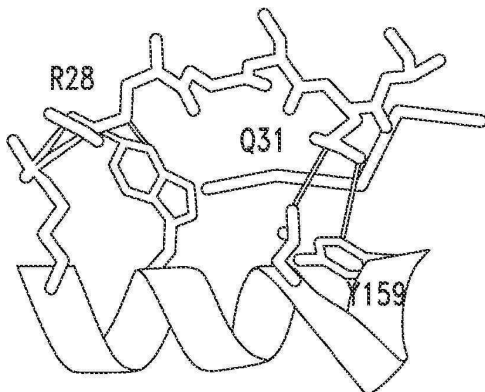


도면3

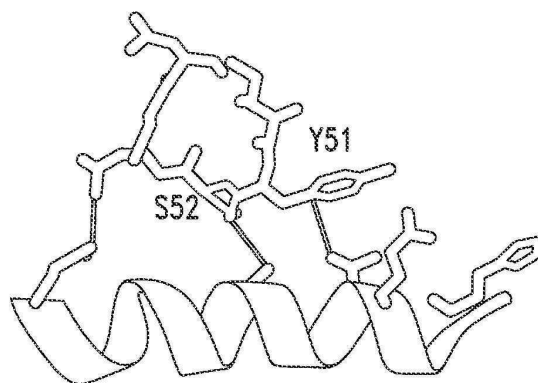


도면4a

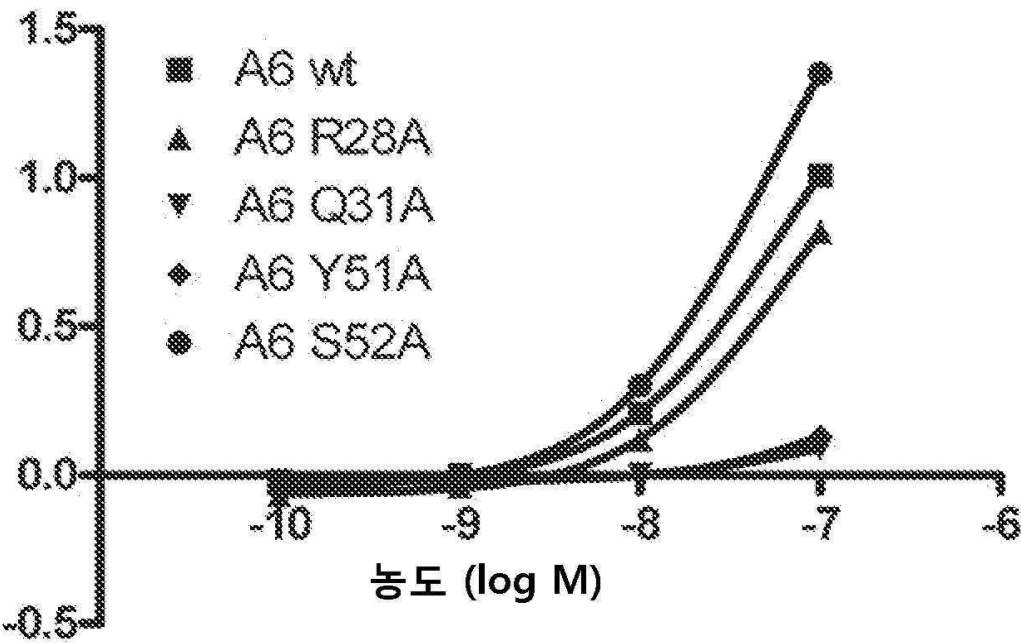
A6 CDR1 α 루프-MHC 나선



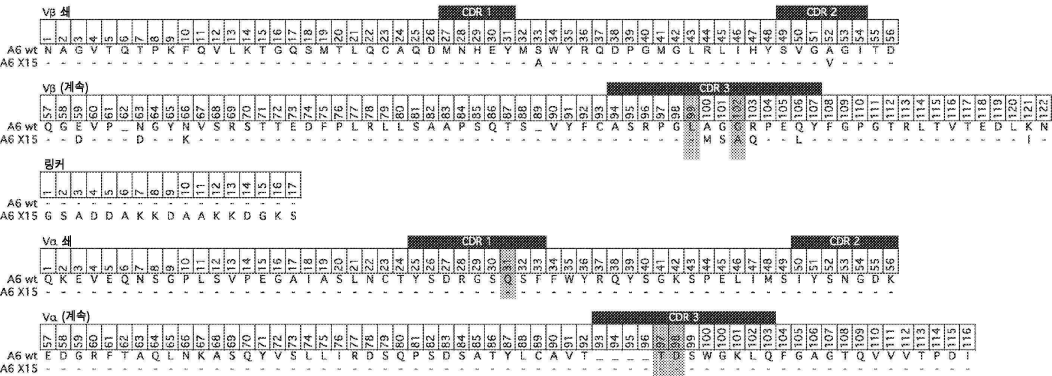
A6 CDR2 α 루프-MHC 나선



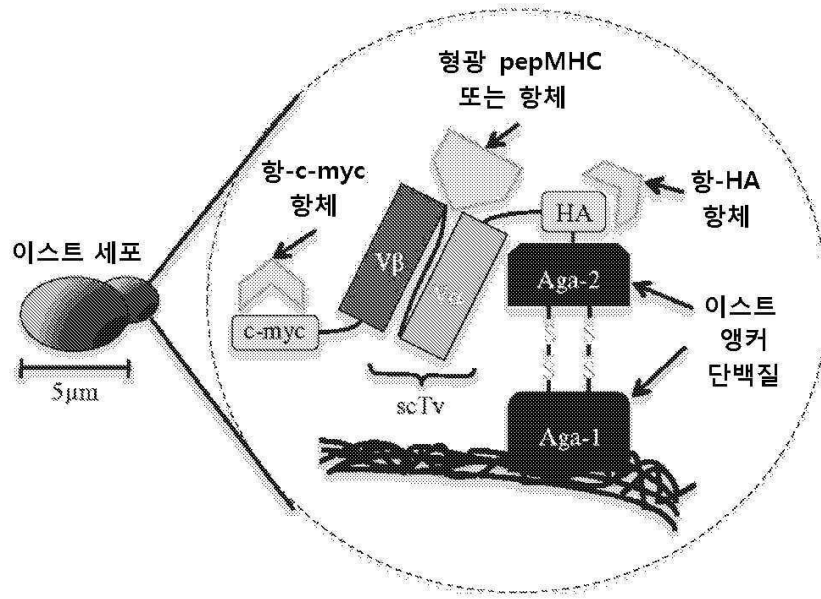
도면4b



도면5



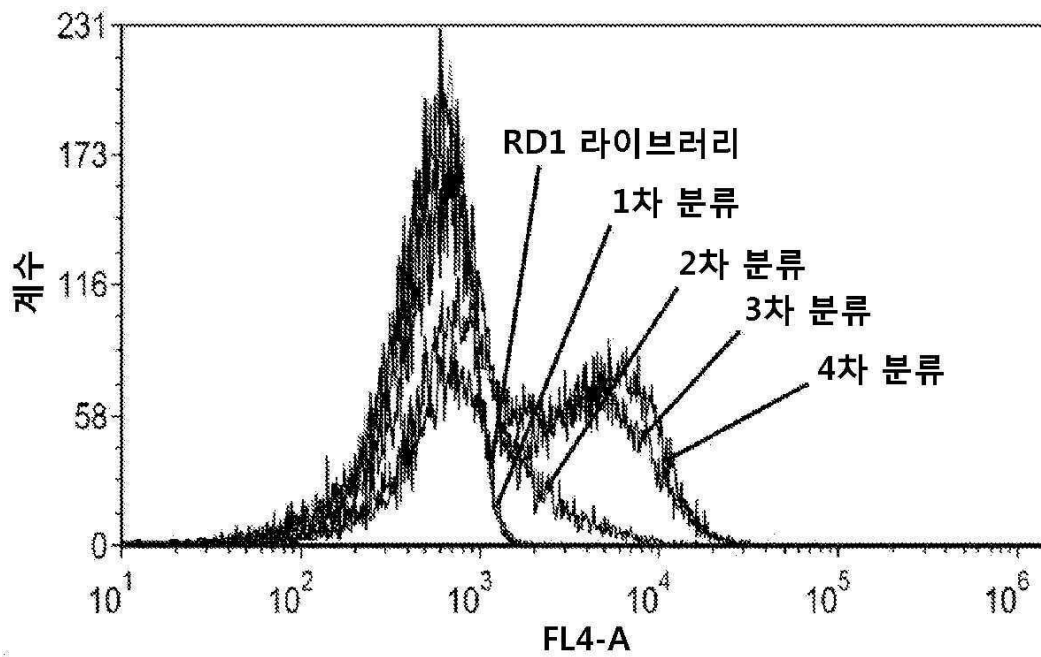
도면6



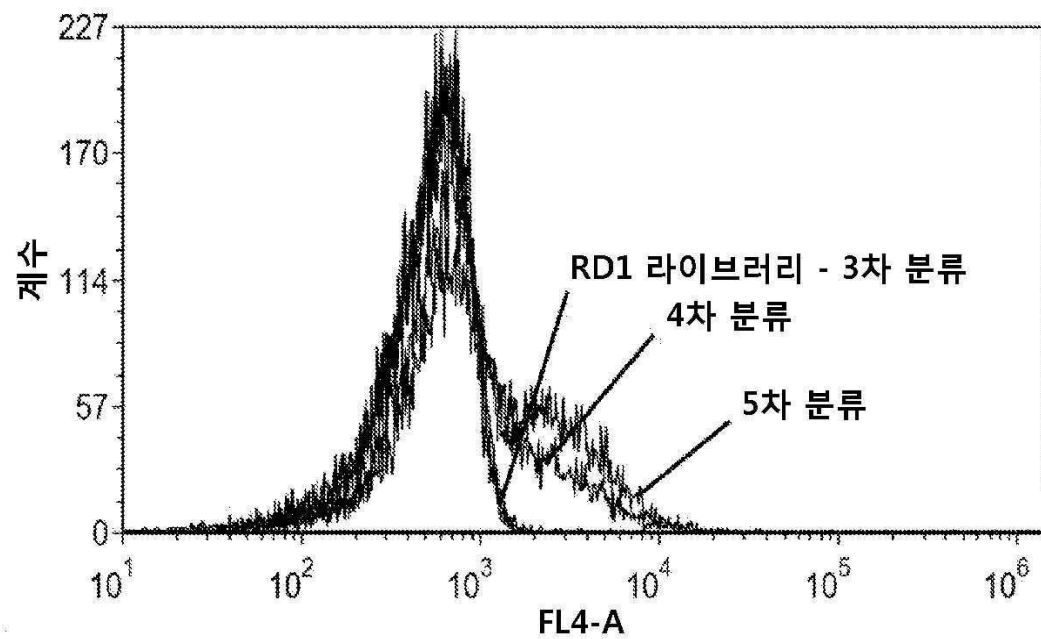
도면7

VP 서		CDR 1										CDR 2									
RD1 라이브러	1	N	A	G	V	T	G	T	P	K	F	I	O	11	12	13	14	15	16	17	18
클론 번호 1-10	2	N	A	G	V	T	G	T	P	K	F	I	O	11	12	13	14	15	16	17	18
VP (계속)		CDR 3										CDR 4									
RD1 라이브러	19	D	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
클론 번호 1-10	20	D	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
링커		CDR 1										CDR 2									
RD1 라이브러	21	G	S	A	D	D	A	K	K	D	A	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
클론 번호 1-10	22	G	S	A	D	D	A	K	K	D	A	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Va 서		CDR 1										CDR 2									
RD1 라이브러	23	Q	K	E	V	E	Q	N	S	G	P	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
클론 번호 1-10	24	Q	K	E	V	E	Q	N	S	G	P	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Va (계속)		CDR 3										CDR 4									
RD1 라이브러	25	G	R	F	I	G	I	C	L	E	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
클론 번호 1-10	26	G	R	F	I	G	I	C	L	E	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

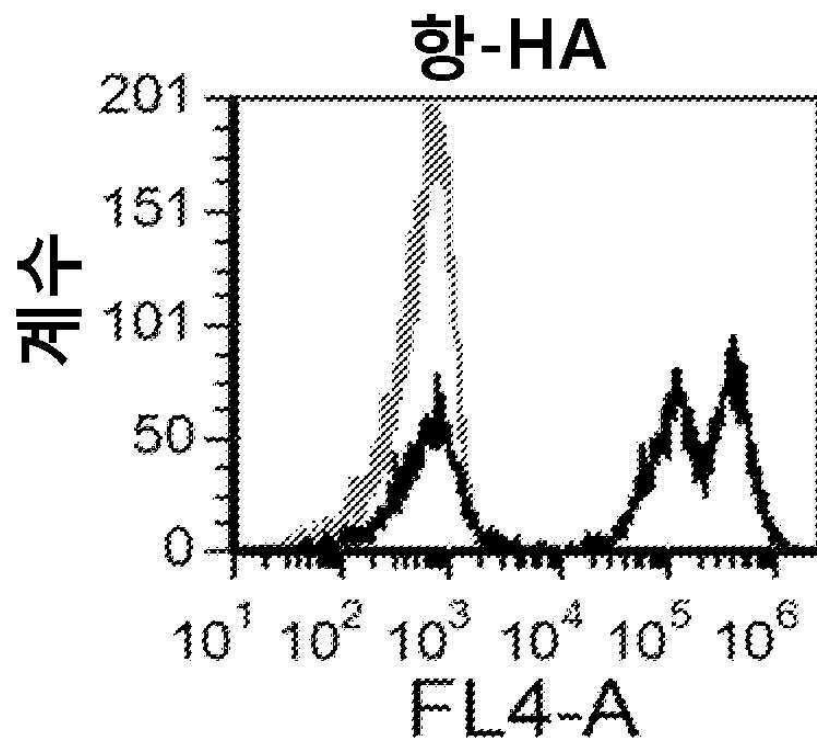
도면8



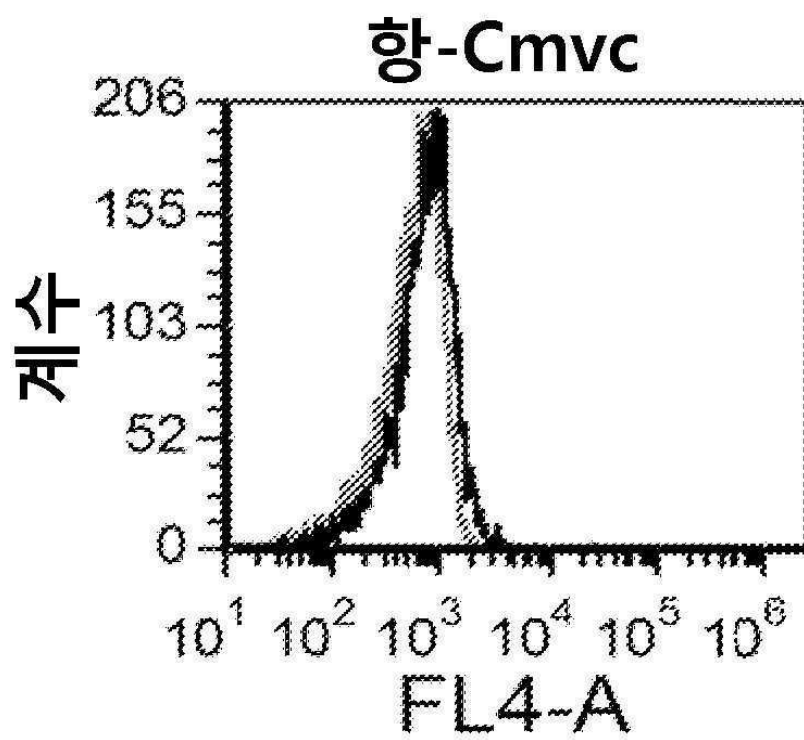
도면9



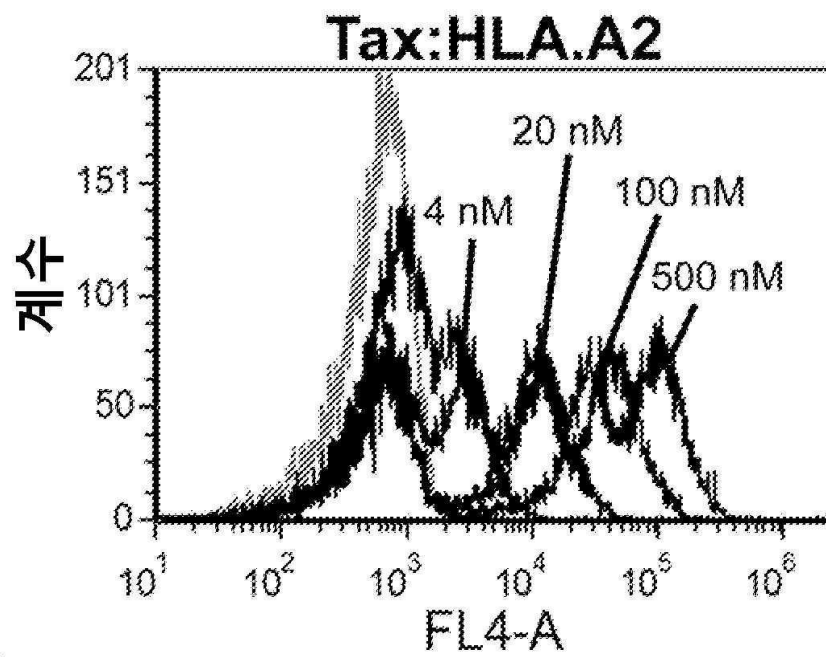
도면11a



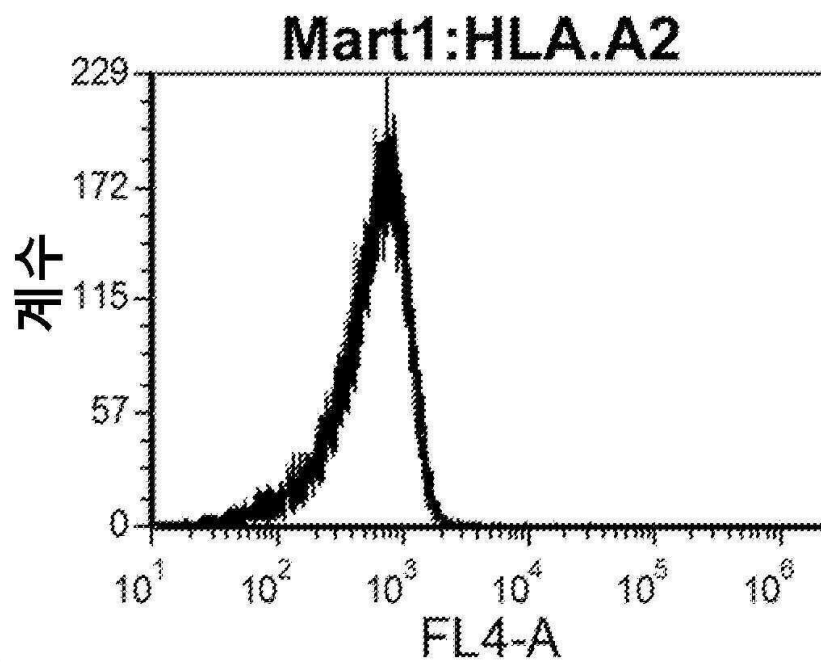
도면11b



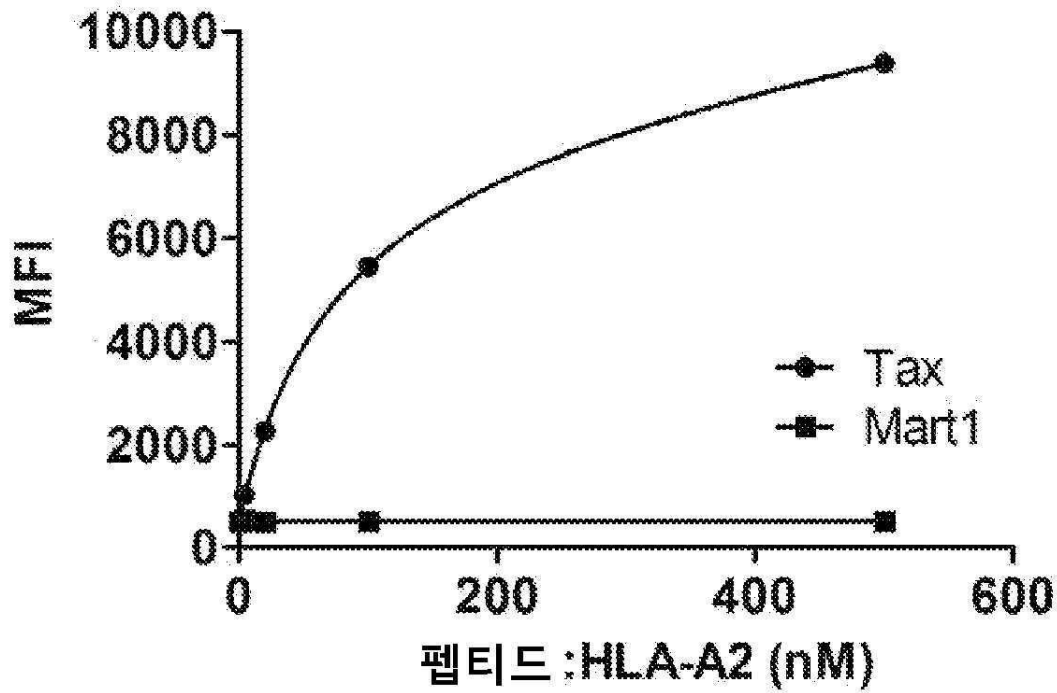
도면11c



도면11d



도면11e



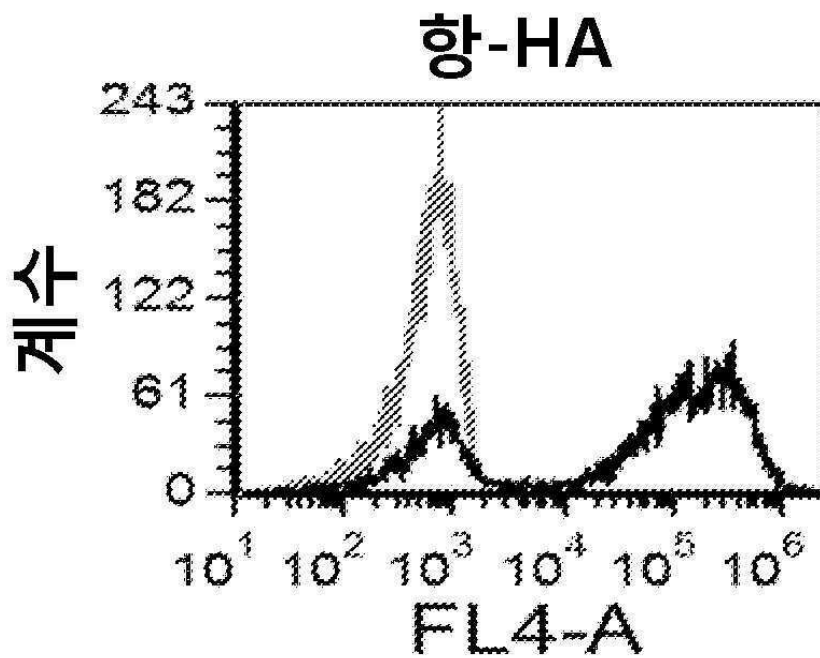
도면12a

VP 섹																					CDR3										CDR2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
A6 wt	N	A	G	V	T	Q	T	R	F	V	L	K	T	G	S	M	T	L	Q	C	A	G	D	M	N	H	E	Y	S	L	T	S	W	F	R	G	D	P	G	M	G	L	R	L	H	V	S	V	G	A	G	T	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
A6 X15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

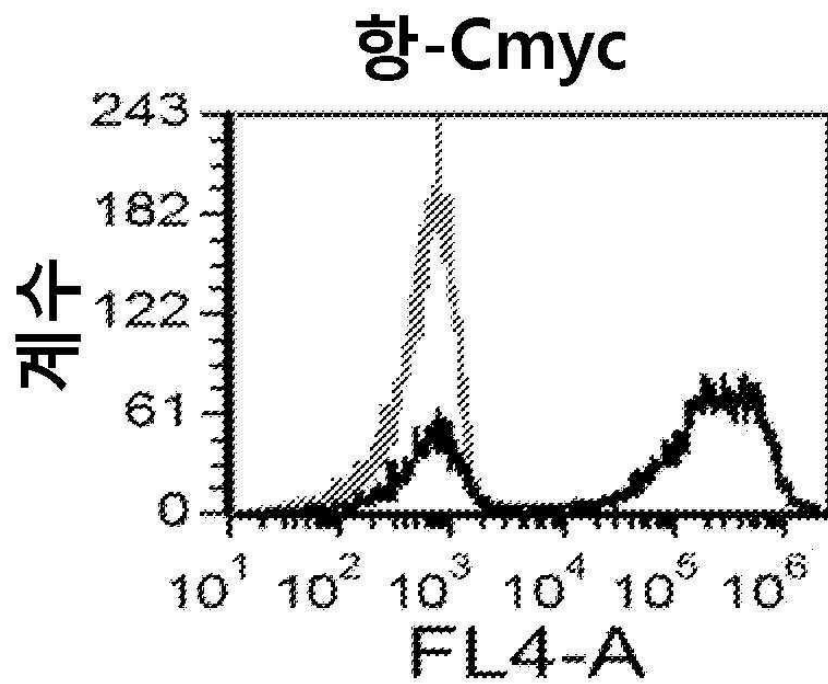
도면12b

위치	1			2			3			4			5		
RD1 라이브러리	N	N	S	N	N	S	N	N	S	N	N	N	N	N	S
	X			X			X			X			X		
RD1-Mart1-S5-1	T	G	G	G	G	C	A	C	G	A	A	G	T	A	C
	W (1)			G (2)			T (2)			K (1)			Y (1)		
RD1-Mart1-S5-2	T	G	G	G	G	C	A	C	G	A	A	G	T	A	C
	W (1)			G (2)			T (2)			K (1)			Y (1)		
RD1-Mart1-S5-3	T	G	G	G	G	C	A	C	G	A	A	G	T	A	C
	W (1)			G (2)			T (2)			K (1)			Y (1)		
RD1-Mart1-S5-4	T	G	G	G	G	C	A	C	G	A	A	G	T	A	C
	W (1)			G (2)			T (2)			K (1)			Y (1)		
RD1-Mart1-S5-6	T	G	G	G	G	C	A	C	G	A	A	G	T	A	C
	W (1)			G (2)			T (2)			K (1)			Y (1)		

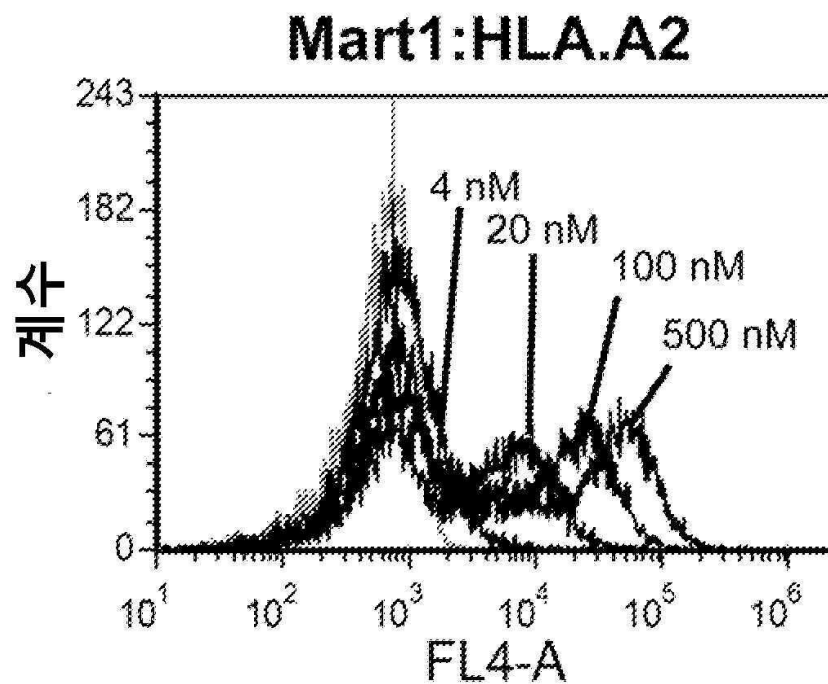
도면13a



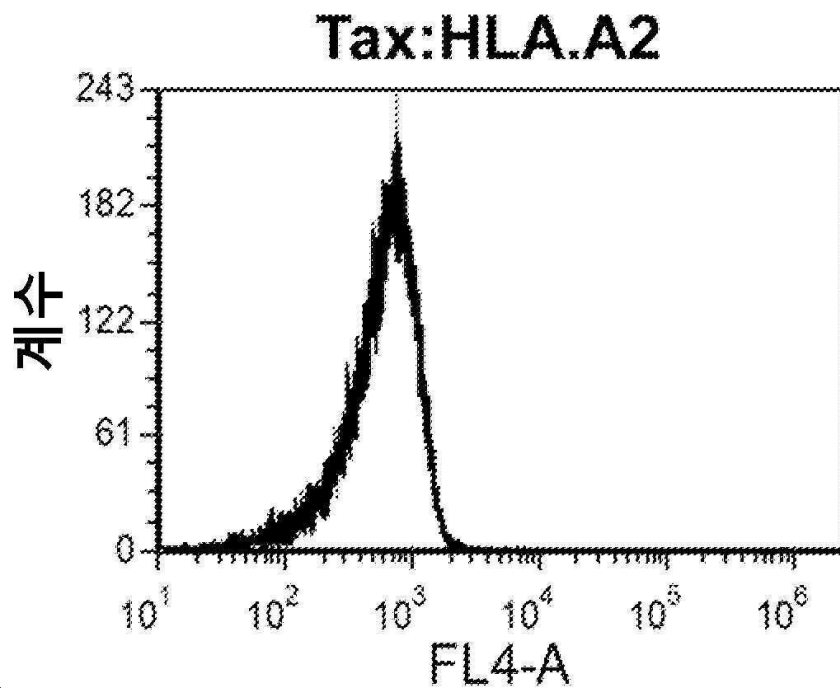
도면13b



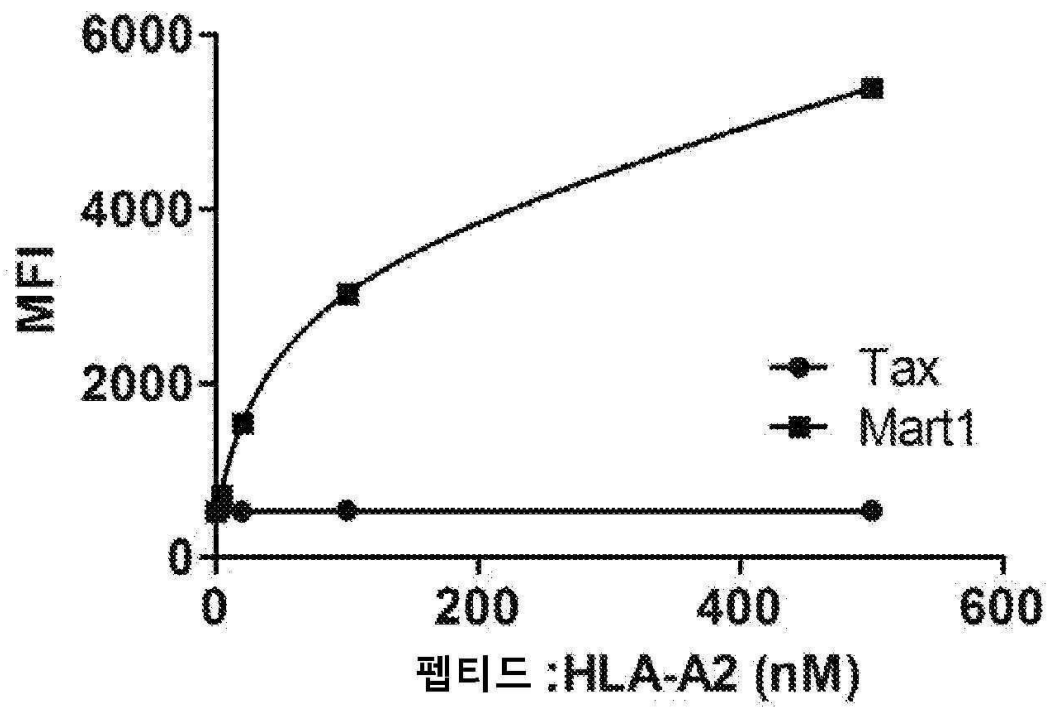
도면13c



도면13d



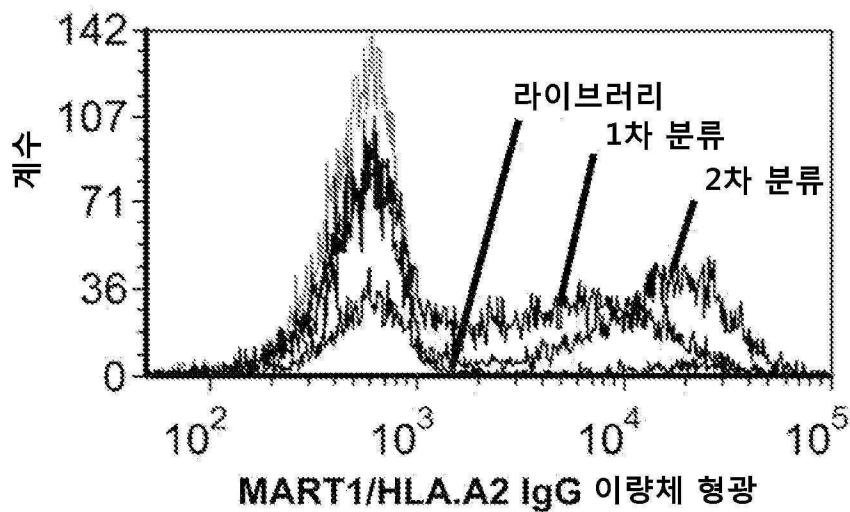
도면13e



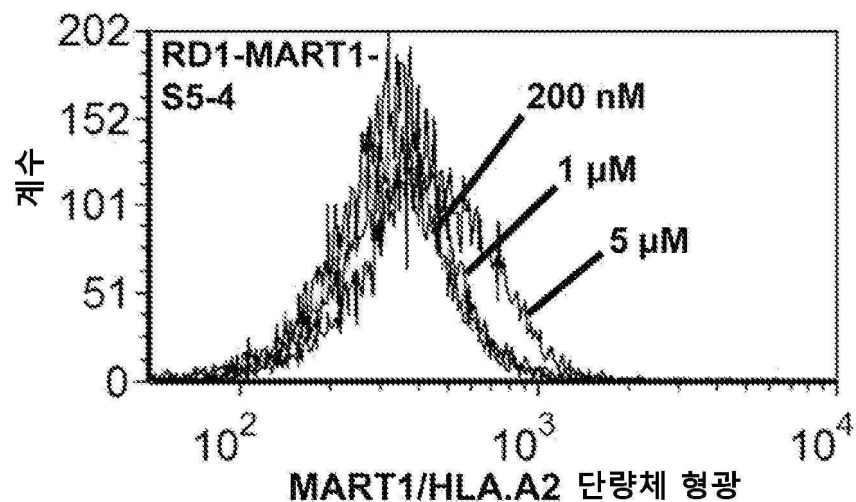
도면14

[illegible]

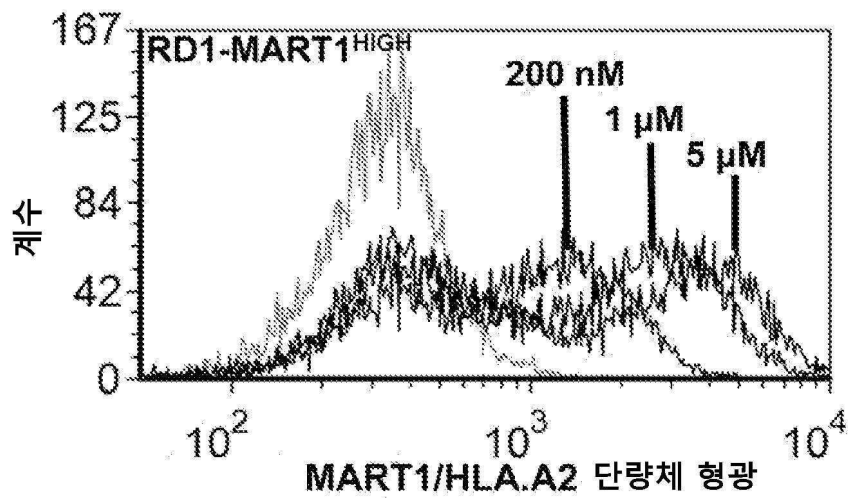
도면 15a



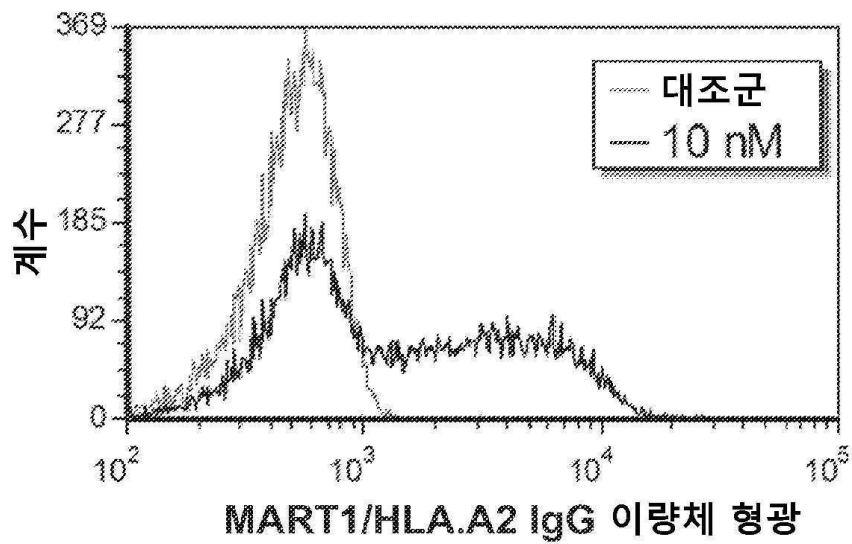
도면 15b



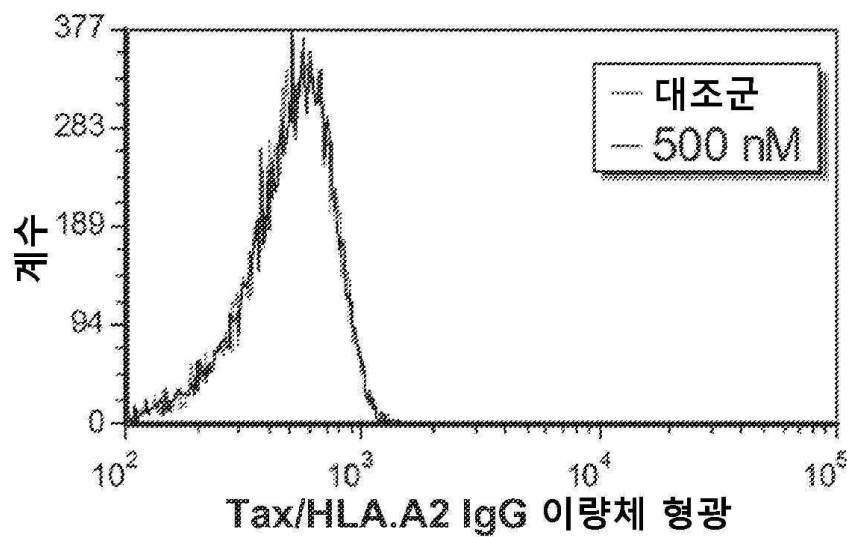
도면15c



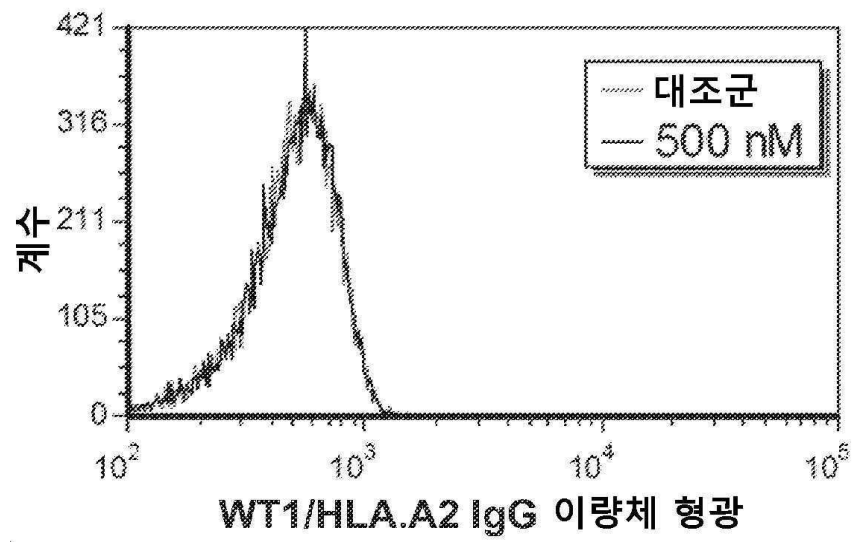
도면16a



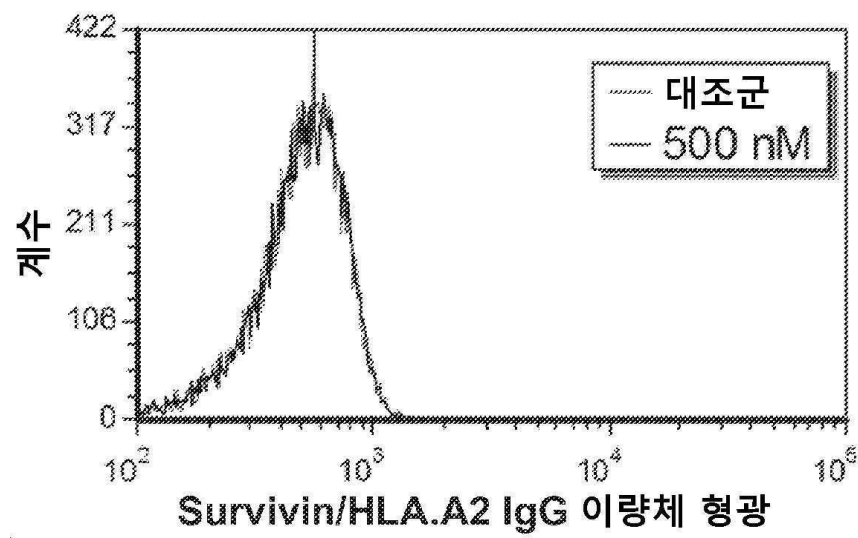
도면16b



도면16c



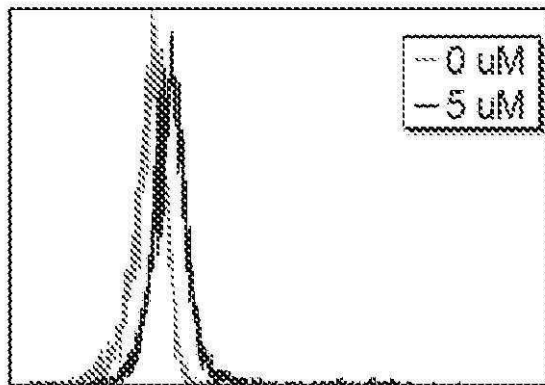
도면16d



도면17a

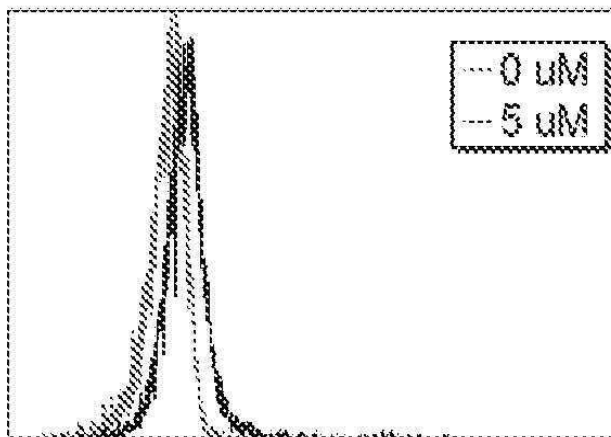
펩티드 펄스 T2 세포를 이용한 가용성 RD1-MART1^고의 결합 및 특이성

펩티드 부재



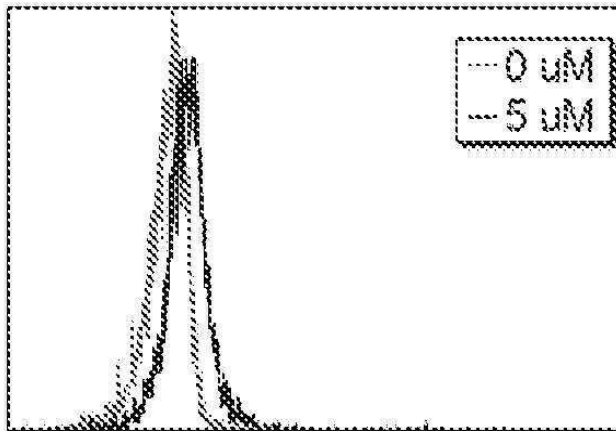
도면17b

Tax 펩티드 (1 uM)



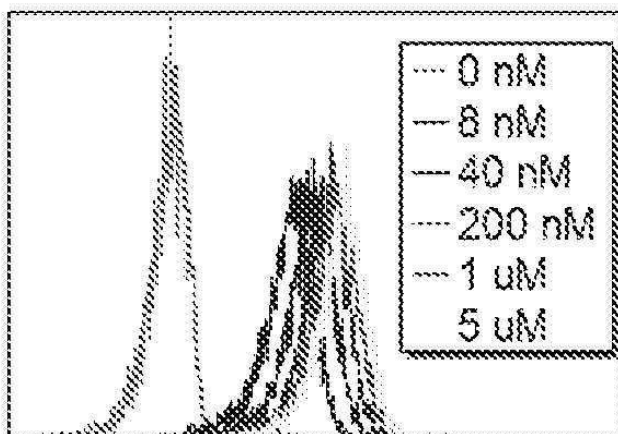
도면17c

WT1 펩티드 (1 μ M)

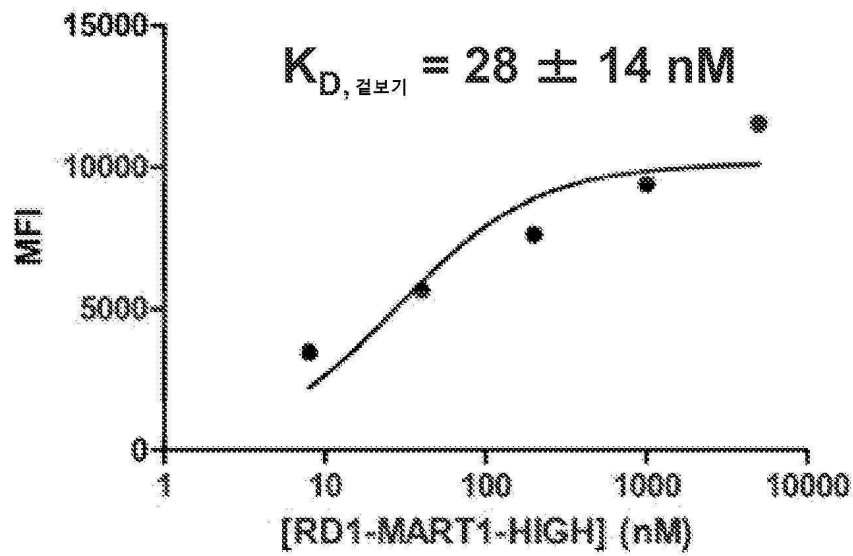


도면17d

MART1 펩티드 (1 μ M)



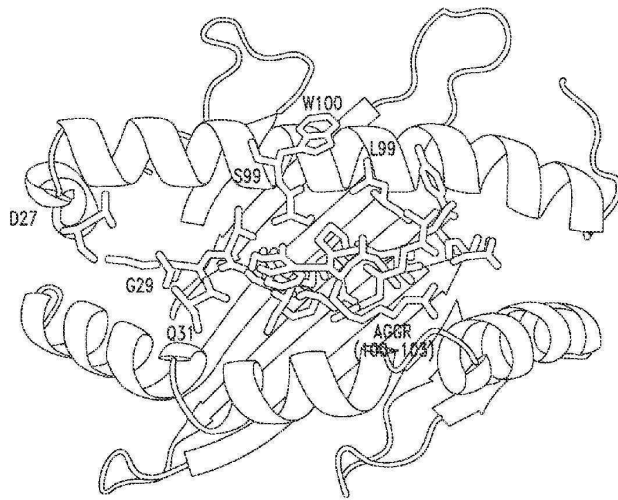
도면17e



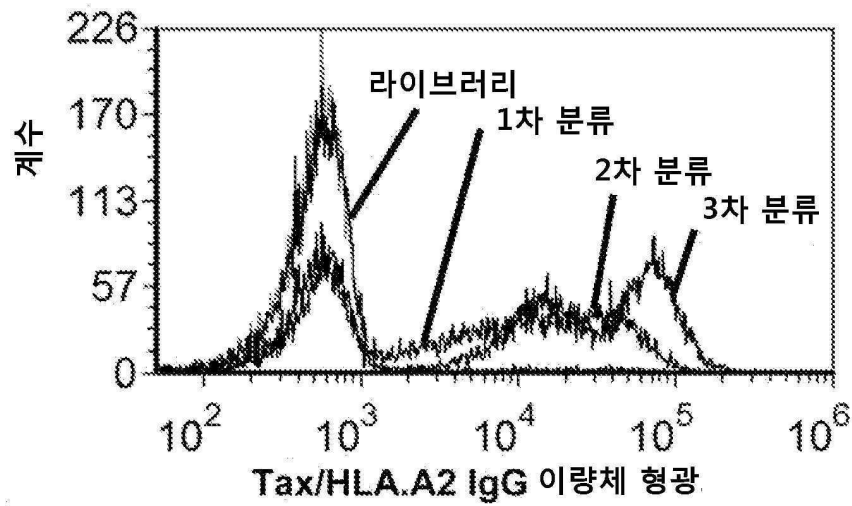
도면18

[illegible]

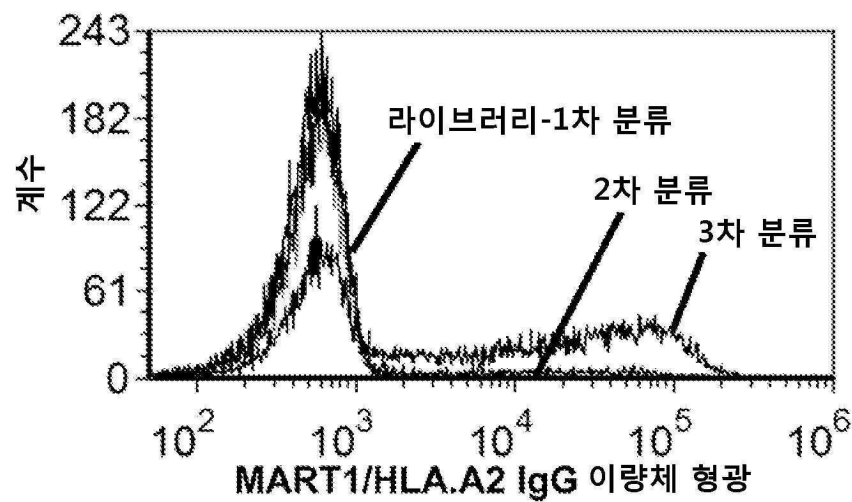
도면19a



도면19b



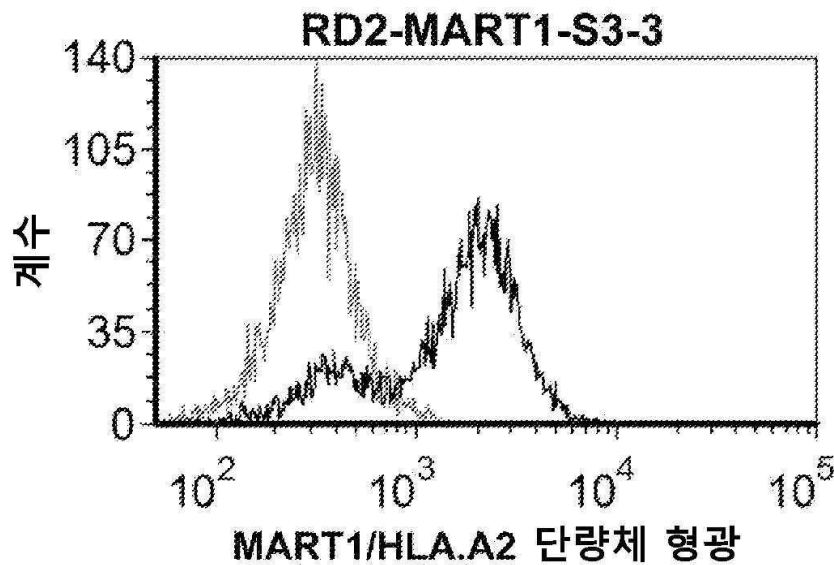
도면19c



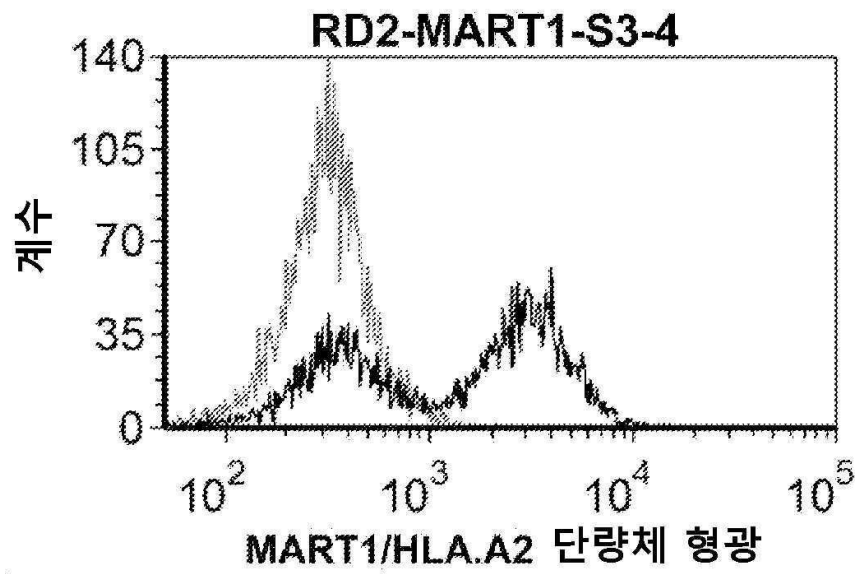
도면20

VP 세													CDR 1													CDR 2												
RD2 라이브러리	1	N	A	G	V	T	Q	T	P	K	F	I	Q	V	L	V	L	K	T	G	L	S																
클론 번호 1-5	2																																					
VP (계속)													CDR 3																									
RD2 라이브러리	62	D	S	G	V	K	V	S	S	F	I	E	D	F	A	S	A	Q	S	R	A	G																
클론 번호 1	63																																					
클론 번호 2	64																																					
클론 번호 3	65																																					
클론 번호 4	66																																					
클론 번호 5	67																																					
원거																																						
RD2 라이브러리	1	G	A	D	D	A	D	K	K	D	A	I	K	I	K	I	K	I	K	I	K	I																
클론 번호 1-5	2																																					
Va 세													CDR 1													CDR 2												
RD2 라이브러리	1	K	E	V	E	D	N	D	S	S	F	I	Q	V	L	V	L	K	T	G	L	S																
클론 번호 1	2																																					
클론 번호 2	3																																					
클론 번호 3	4																																					
클론 번호 4	5																																					
클론 번호 5	6																																					
Va (계속)													CDR 3																									
RD2 라이브러리	59	G	R	E	V	E	D	N	D	S	S	F	I	Q	V	L	V	L	K	T	G	L	S															
클론 번호 1	60																																					
클론 번호 2	61																																					
클론 번호 3	62																																					
클론 번호 4	63																																					
클론 번호 5	64																																					
클론 번호 6	65																																					
클론 번호 7	66																																					
클론 번호 8	67																																					
클론 번호 9	68																																					
클론 번호 10	69																																					
클론 번호 11	70																																					
클론 번호 12	71																																					
클론 번호 13	72																																					
클론 번호 14	73																																					
클론 번호 15	74																																					
클론 번호 16	75																																					
클론 번호 17	76																																					
클론 번호 18	77																																					
클론 번호 19	78																																					
클론 번호 20	79																																					
클론 번호 21	80																																					
클론 번호 22	81																																					
클론 번호 23	82																																					
클론 번호 24	83																																					
클론 번호 25	84																																					
클론 번호 26	85																																					
클론 번호 27	86																																					
클론 번호 28	87																																					
클론 번호 29	88																																					
클론 번호 30	89																																					
클론 번호 31	90																																					
클론 번호 32	91																																					
클론 번호 33	92																																					
클론 번호 34	93																																					
클론 번호 35	94																																					
클론 번호 36	95																																					
클론 번호 37	96																																					
클론 번호 38	97																																					
클론 번호 39	98																																					
클론 번호 40	99																																					
클론 번호 41	100																																					
클론 번호 42	101																																					
클론 번호 43	102																																					
클론 번호 44	103																																					
클론 번호 45	104																																					
클론 번호 46	105																																					
클론 번호 47	106																																					
클론 번호 48	107																																					
클론 번호 49	108																																					
클론 번호 50	109																																					
클론 번호 51	110																																					
클론 번호 52	111																																					
클론 번호 53	112																																					
클론 번호 54	113																																					
클론 번호 55	114																																					
클론 번호 56	115																																					
클론 번호 57	116																																					
클론 번호 58	117																																					
클론 번호 59	118																																					
클론 번호 60	119																																					
클론 번호 61	120																																					
클론 번호 62	121																																					
클론 번호 63	122																																					

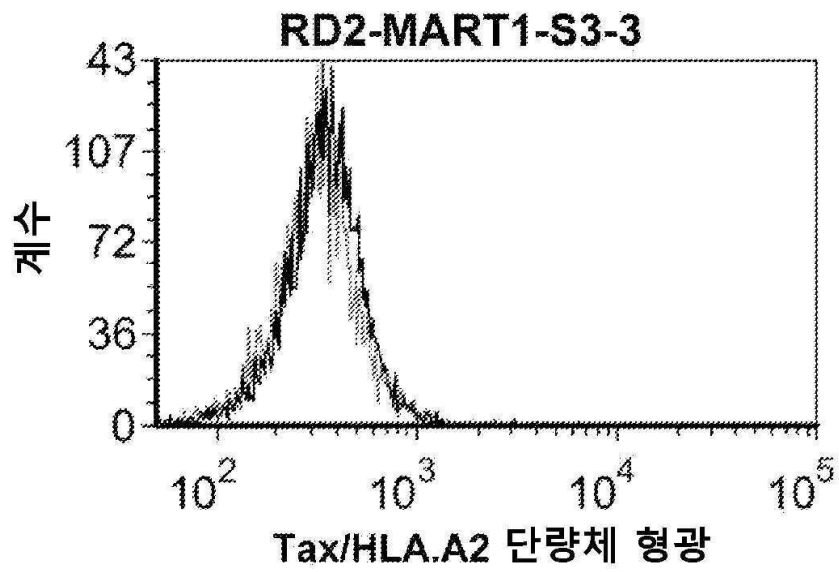
도면21a



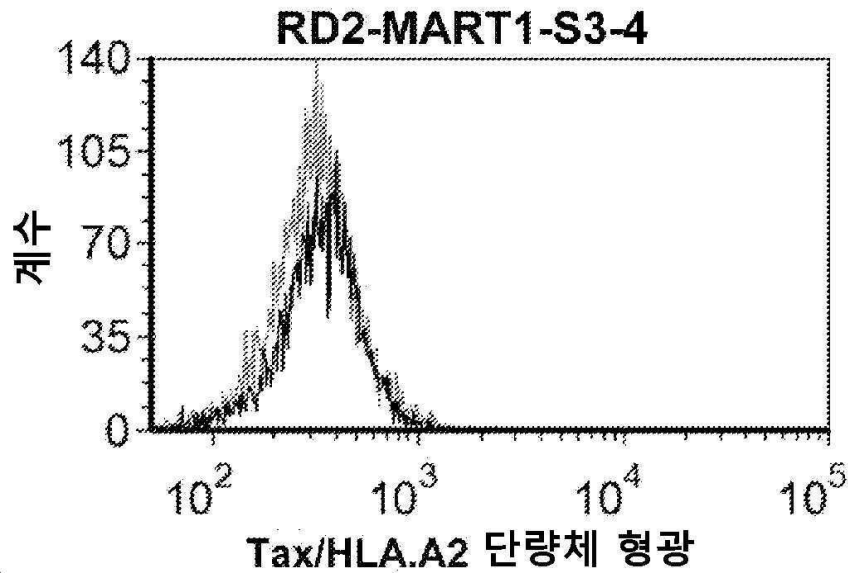
도면21b



도면21c



도면21d



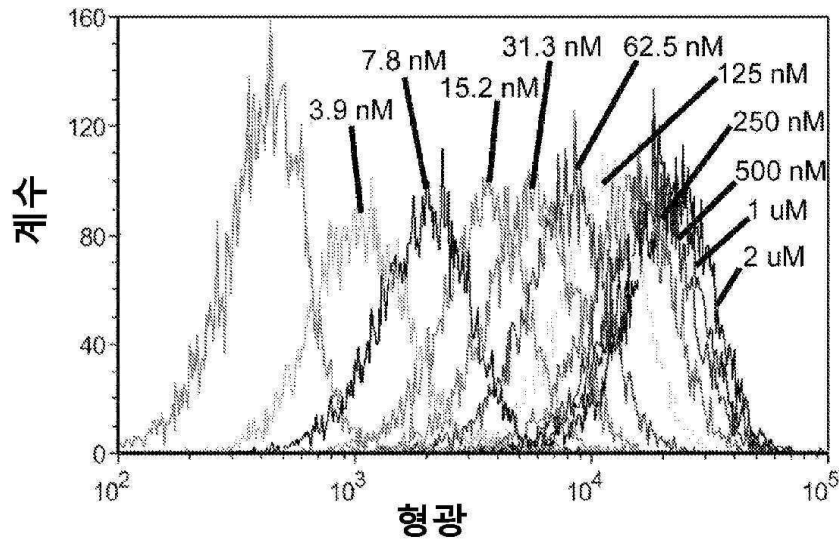
도면21e

[illegible]

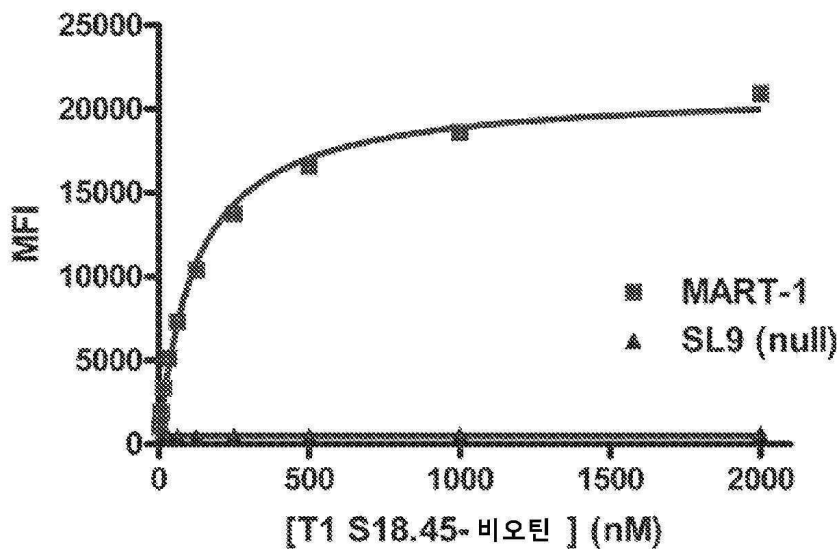
도면22

VP #										CDR 1										CDR 2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
A6 wt	N	A	G	V	T	Q	T	P	K	F	Q	V	L	K	T	G	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

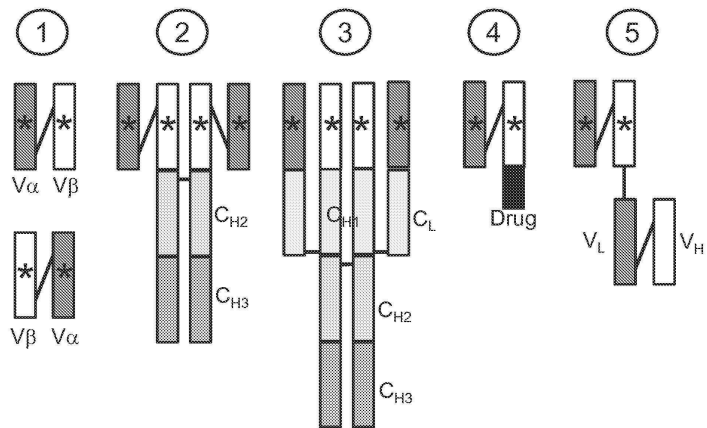
도면23a



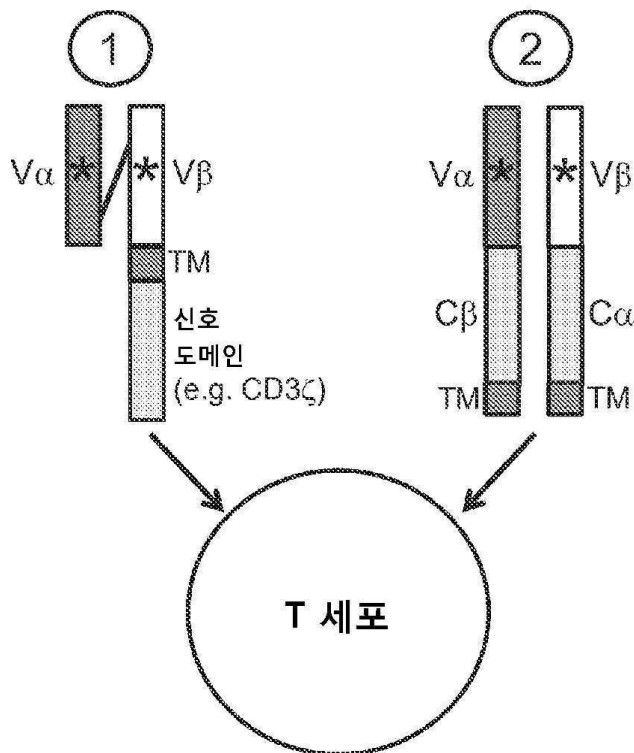
도면23b



도면24a



도면24b



서열 목록

<110> THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS

<120> ENGINEERING T-CELL RECEPTORS

<130> IPA150053-US-D1

<150> US 61/676,373

<151> 2012-07-27

<160> 61

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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 Val Thr Thr Asp Ser Trp

85 90 95

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

100 105 110

Ile

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
 Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr
 50 55 60
 Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser
 65 70 75 80
 Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro Gly
 85 90 95
 Leu Ala Gly Gly Arg Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

100 105 110
 Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn
 115 120

<210> 3

<211> 250

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

35 40 45
 Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr
 50 55 60
 Lys Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser
 65 70 75 80
 Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro Gly
 85 90 95
 Leu Met Ser Ala Gln Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

100 105 110
 Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys
 115 120 125

Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys Ser Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn
130 135 140
Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys
145 150 155 160
Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr
165 170 175
Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp
180 185 190
Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr
195 200 205
Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr
210 215 220
Leu Cys Ala Val Thr Thr Asp Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala

225 230 235 240
Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile

245 250

<210> 4

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized amino acid sequence of the RD1 library

<220><221> misc_feature

<222> (97)..(97)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (100)..(100)

<223> Xaa = Any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (168)..(168)

<223>

> Xaa = Any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (230)..(230)

<223> Xaa = Any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (231)..(231)

<223> Xaa = Any amino acid

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Xaa Met Ser Xaa Gln Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

100 105 110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220
 Leu Cys Ala Val Thr Xaa Xaa Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala

225 230 235 240
 Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile

245 250

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Human T cell lymphotropic virus

<400> 5

Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 8

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu

1 5

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
 1 5

 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
 1 5
 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Ala Leu Trp Gly Pro Asp Ala Ala Ala
 1 5
 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Val Leu Phe Tyr Leu Gly Gln Tyr

1 5
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Hepatitis B virus
 <400> 14
 Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile

1 5
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val

1 5
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val

1 5
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 21

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

1 5 10 15

Ser

<210> 22

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of clone from RD1 library

<400> 22

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

1	5	10	15
Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met			
	20	25	30
Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr			
	35	40	45
Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr			
	50	55	60
Lys Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser			
65	70	75	80
Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro Gly			
	85	90	95
Ile Met Ser Glu Gln Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu			
	100	105	110
Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys			
	115	120	125
Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys Ser Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn			
	130	135	140
Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys			
145	150	155	160
Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Ser Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr			
	165	170	175
Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp			
	180	185	190
Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr			
	195	200	205
Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr			
	210	215	220
Leu Cys Ala Val Thr Pro Pro Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala			
225	230	235	240
Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile			
	245	250	

<210> 23

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of clone from RD1 library

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Met Ser Met Gln Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

100 105 110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210

215

220

Leu Cys Ala Val Thr Pro Cys Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala

225

230

235

240

Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile

245

250

<210> 24

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of clone from RD1 library

<400> 24

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35

40

45

Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ser Met Ser Ala Gln Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

100

105

110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys

115

120

125

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

130

135

140

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

145 150 155 160
 Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Ala Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr
 165 170 175
 Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp
 180 185 190
 Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr
 195 200 205

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

<210> 25

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of clone from RD1 library

<400> 25

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

1 5 10 15
 Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
 20 25 30
 Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
 35 40 45
 Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr
 50 55 60
 Lys Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser

65 70 75 80
 Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro Gly
 85 90 95
 Thr Met Ser Arg Gln Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

100 105 110
 Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys
 115 120 125
 Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys Ser Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn

130 135 140
 Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys
 145 150 155 160
 Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gly Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr
 165 170 175
 Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp
 180 185 190
 Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr

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

<210> 26

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of clone from RD1 library

<400> 26

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Leu Cys Ala Val Thr Leu His Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala

225

230

235

240

Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile

245

250

<210> 27

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of clone from RD1 library

<400> 27

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

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

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

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

245

<210> 28

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of clone from RD1 library

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Met Ser Arg Gln Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

100 105 110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile
245 250

<210> 29

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of clone from RD1 library

<400> 29

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

35 40 45
Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr
50 55 60
Lys Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser
65 70 75 80
Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro Gly
85 90 95
Arg Met Ser Gln Gln Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

100 105 110
Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys
115 120 125
Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys Ser Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn
130 135 140

Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys
145 150 155 160
Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Trp Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr

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

225 230 235 240
Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile
 245 250
<210> 30
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Amino acid sequence of clone from RD1 library
<400> 30
Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly
1 5 10 15
Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
 20 25 30

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

85 90 95

Tyr Met Ser Pro Gln Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

100 105 110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Cys Ala Val Thr Phe Leu Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala

225 230 235 240

Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile

245 250

<210> 31

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of clone from RD1 library

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
35 40 45

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

Lys Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser
65 70 75 80

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

Leu Met Ser Leu Gln Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
100 105 110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys
115 120 125

Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys Ser Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn
130 135 140

Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys
145 150 155 160

Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr
165 170 175

Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp
180 185 190

Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr
195 200 205

Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr
210 215 220

Leu Cys Ala Val Thr Arg Ala Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala
225 230 235 240

Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile
245 250

<210> 32
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> RD1-Tax-S4-1 clone sequence

<400> 32

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

Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
20 25 30

Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
35 40 45

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

Lys Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser
65 70 75 80

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

Leu Met Ser Ala Gln Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
100 105 110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys
115 120 125

Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys Ser Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn
130 135 140

Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys
145 150 155 160

Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Thr Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr
165 170 175

Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp
180 185 190

Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr
195 200 205

Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr
210 215 220

Leu Cys Ala Val Thr Thr Asp Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala

225 230 235 240
 Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile
 245 250
 <210> 33
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RD1-Mart1-S5-5 clone sequence
 <400> 33
 Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly

 1 5 10 15
 Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
 20 25 30
 Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
 35 40 45
 Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr
 50 55 60
 Lys Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser

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

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

180 185 190
Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr

195 200 205
Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr

210 215 220
Leu Cys Ala Val Thr Lys Tyr Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala

225 230 235 240
Gly Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile

245 250

<210> 34

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RD1-Mart1-High clone sequence

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Trp Met Ala Gly Gly Val Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

100 105 110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys

115 120 125

Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys Ser Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn
130 135 140
Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys
145 150 155 160
Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Thr Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr
165 170 175
Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp
180 185 190

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

<210> 35
<211> 249
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Degenerate amino acid sequence for RD2 library
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (97)..(97)
<223> Xaa = Any amino acid
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (98)..(98)
<223> Xaa = Ala or Met
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(99)
<223> Xaa = Gly or Ser
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (100)..(100)
<223> Xaa = Gly or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (101)..(101)

<223> Xaa = Arg or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(163)

<

223> Xaa = Any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (165)..(165)

<223> Xaa = Any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (167)..(167)

<223> Xaa = Gln or Thr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (231)..(231)

<223> Xaa = Any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (232)..(232)

<223> Xaa = Any amino acid

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

100 105 110
 Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys
 115 120 125
 Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys Ser Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser
 130 135 140
 Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr

 145 150 155 160
 Tyr Ser Xaa Arg Xaa Ser Xaa Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser
 165 170 175
 Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys
 180 185 190
 Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val
 195 200 205
 Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu

 210 215 220
 Cys Ala Val Thr Thr Asp Xaa Xaa Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile
 245
 <210> 36
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Amino acid sequence of clone from RD2 library
 <400> 36
 Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly
 1 5 10 15

 Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
 20 25 30
 Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
 35 40 45
 Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr

50 55 60
 Lys Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser
 65 70 75 80

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

Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr
 145 150 155 160
 Tyr Ser Cys Arg Met Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser
 165 170 175
 Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys
 180 185 190
 Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val
 195 200 205

Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu
 210 215 220
 Cys Ala Val Thr Thr Asp Tyr Ser Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile
 245

<210> 37

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of clone from RD2 library

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Ala Gly Gly Arg Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

100 105 110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Tyr Ser Pro Arg Arg Ser Thr Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Cys Ala Val Thr Thr Asp Thr Asn Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly

225 230 235 240

Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile

245

<210> 38

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of clone from RD2 library

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45

Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Met Ser Ala Gln Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

100 105 110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Tyr Ser Cys Arg Phe Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

<210> 39

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of clone from RD2 library

<400> 39

Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly
 1 5 10 15
 Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
 20 25 30
 Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
 35 40 45
 Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr
 50 55 60
 Lys Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser
 65 70 75 80
 Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro Gly
 85 90 95
 Leu Met Ser Ala Gln Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
 100 105 110
 Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys

115 120 125
 Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys Ser Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser
 130 135 140

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

 180 185 190
 Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val
 195 200 205
 Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu
 210 215 220
 Cys Ala Val Thr Thr Asp Pro Leu Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile
 245

<210> 40

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of clone from RD2 library

<400> 40

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

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

Arg Ala Gly Gly Arg Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
100 105 110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys
115 120 125

Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys Ser Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser
130 135 140

Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr
145 150 155 160

Tyr Ser Asn Arg Ser Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser
165 170 175

Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys
180 185 190

Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val
195 200 205

Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu
210 215 220

Cys Ala Val Thr Thr Asp Asn His Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly
225 230 235 240

Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile
245

<210> 41

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RD2-Mart1-S3-3 clone sequence

<400> 41

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

Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
20 25 30

Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

35 40 45
 Ser Val Gly Val Gly Ile Thr Asp Gln Gly Asp Val Pro Asp Gly Tyr
 50 55 60
 Lys Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser
 65 70 75 80
 Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Arg Pro Gly
 85 90 95
 Met Ala Gly Gly Arg Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

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

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

225 230 235 240
 Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile

245

<210> 42

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RD2-Mart1-S3-4 clone sequence

<400> 42

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

Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
20 25 30

Ala Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
35 40 45

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

Lys Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser
65 70 75 80

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

Met Ala Gly Gly Arg Pro Glu Leu Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
100 105 110

Thr Val Thr Glu Asp Leu Ile Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys
115 120 125

Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys Ser Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser
130 135 140

Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr
145 150 155 160

Tyr Ser Ser Arg His Ser Gln Ser Phe Ser Trp Tyr Arg Gln Tyr Pro
165 170 175

Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys
180 185 190

Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val
195 200 205

Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu
210 215 220

Cys Ala Val Thr Thr Asp Leu Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly
225 230 235 240

Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile

245

<210> 43

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone T1-S18.45 amino acid sequence

<400> 43

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

1 5 10 15

Gln Thr Val Thr Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Asp Asn Leu

20 25 30

Tyr Trp Tyr Arg Arg Val Met Gly Lys Glu Ile Lys Phe Leu Leu His

35 40 45

Phe Val Lys Glu Ser Lys Gln Asp Glu Ser Gly Met Pro Asn Asn Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195

200

205

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

210

215

220

Cys Ala Val Ser Ser Ser Asp Phe Leu Met Phe Gly Asp Gly Thr Gln

225

230

235

240

Leu Val Val Lys Pro Asn Ile

245

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Ala Gly Gly Arg

1

<210> 45

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Ser Ala Gln

1

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 46

Ala Ser Asn Glu Asn Met Asp Ala Met

1

5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' region of RD1 gene optimized for yeast and E. coli

<400> 48

tctgctagc 9

<210> 49

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3' region of RD1 gene optimized for yeast and E.coli

<400> 49

ctcgagatct ga 12

<210> 50

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer used to add pCT302 overhangs

<400> 50

caggctagtgt gtggtggtgg ttctggtggt ggtggttctg gtggtggtgg ttctgctagc 60

aatgctggtg taacacaaac gccaa 85

<210> 51

<211> 75

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer used to add pCT302 overhangs

<400> 51

ggaacaaagt cgattttgtt acatctacac tgttgtaac agatctcgag tcattataaa 60

tcttcttcag agatc 75

<210> 52
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer to generate the CDR3 1 library (Splice 4L)
 <400> 52
 ggcagcccca taaacacaca gtat 24
 <210> 53
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer to generate a CDR3 1 library (Splice 4L)
 <400> 53
 cggacgggaa gcgcagaaat acactgaggt ttgagaaggt gcagcgctta acagacgcag 60
 cgg 63
 <210> 54
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer to generate a CDR3 1 library (T7)
 <220><221> misc_feature
 <222> (31)..(32)
 <223> n = A, T, C or G
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(35)
 <223> n = A, T, C or G
 <220><221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> n = A, T, C or G
 <220><221> misc_feature
 <222> (40)..(41)
 <223> n = A, T, C or G
 <220><221> misc_feature

<222> (43)..(44)

<223> n = A, T, C or G

<400> 54

acctcagtgt atttctgcgc ttcccgccg nnknnknnkn nknnkcagcc tgaactgtac 60

tttgggtccag gcactaga 78

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer to generate a CDR3 1 library (T7)

<400> 55

taatacgact cactataggg 20

<210> 56

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer to generate a CDR3 2 library

<400> 56

cggacgggaa gcgcagaaat acactgaggt ttgagaaggt gcagcgctta acagacgcag 60

cgg 63

<210> 57

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer to generate a CDR3beta2 library

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(38)

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

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(41)

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

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(44)

<223> n = a, t, g or c
 <220><221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> n = a, t, g or c
 <220><221> misc_feature
 <222> (49)..(50)
 <223> n = a, t, g or c
 <400> 57
 acctcagtgt atttctgcgc ttcccgccg ggttggnkn nknnknkn kgaactgtac 60
 ttgtgtccag gcactagact gaccg 85
 <210> 58

 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer to generate a CDR3alpha library
 <400> 58
 cgtaaccgcg cacaagtatg tggccgaatc ggaaggctgg gagtcacgaa tcagcaaact 60
 aacatactgg c 71
 <210> 59
 <211> 82
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer to generate a CDR3alpha library
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(35)
 <223> n = a, t, c or g
 <220><221> misc_feature
 <222> (37)..(38)

 <223> n = a, t, c or g
 <220><221> misc_feature
 <222> (40)..(41)
 <223> n = a, t, c or g
 <220><221> misc_feature

<222> (43)..(44)

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

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(47)

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

<400> 59

tccgattcgg ccacatactt gtgcgcggtt acggnknknkn nknknknkaa actgcaattt 60

ggtgcgggca cccaggttgt gg 82

<210> 60

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flanking N-terminal DNA from yeast codon optimized RD2 gene

<400> 60

ggcagcccca taaacacaca gtatgttttt aaggacaata gctcgacgat tgaaggtaga 60

taccatacg acgttcaga ctacgtctg caggctagtg gtggtggtgg ttctggtggt 120

ggtggttctg gtggtggtgg ttctgctagc 150

<210> 61

<211> 346

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flanking C-terminal DNA from yeast codon optimized RD2 gene

<400> 61

ctcgagatct gttacaaca gtgtagatgt aacaaaatcg actttgttcc cactgtactt 60

ttagctcgta caaaatacaa tatacttttc atttctccgt aaacaacatg ttttcccatg 120

taataatcctt ttctatTTTT cggtccgtta ccaactttac acatacttta tatagctatt 180

cattctata cactaaaaaa ctaagacaat tttatTTTtg ctgcctgccca tatttcaatt 240

tgttataaat tctataaatt tatcttatta gtagctaaaa aaagatgaat gtgaatcgaa 300

tcctaagaga attgagctcc aattcgccct atagtgagtc gtatta 346