



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월30일
(11) 등록번호 10-2747867
(24) 등록일자 2024년12월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 35/17 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7007661(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년04월10일
심사청구일자 2023년03월03일
(85) 번역문제출일자 2023년03월03일
(65) 공개번호 10-2023-0044016
(43) 공개일자 2023년03월31일
(62) 원출원 특허 10-2018-7032168
원출원일자(국제) 2017년04월10일
심사청구일자 2020년03월17일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/058580
(87) 국제공개번호 WO 2017/174824
국제공개일자 2017년10월12일
(30) 우선권주장
1606177.2 2016년04월08일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
Tatsuhiko Ozawa et al., 'Comprehensive analysis of the functional TCR repertoire at the single-cell level', Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 367, pp. 820-825, 2008.01.11.
GenBank: BAS03571.1, T cell receptor alpha chain V-J-region, partial [Homo sapiens], 2015.07.22.

(73) 특허권자
어댑티문 리미티드
영국, 애빙턴 옥스퍼드셔 오엑스14 4알엑스, 밀턴 파크, 주빌리 애비뉴 60
(72) 발명자
트리블, 니콜라스
영국 옥스퍼드셔 오엑스14 4알와이 아빙돈, 밀턴 파크, 101파크 드라이브, 어댑티문 리미티드 내
로랜스, 윌리엄
영국 옥스퍼드셔 오엑스14 4알와이 아빙돈, 밀턴 파크, 101파크 드라이브, 어댑티문 리미티드 내
매그, 엘리너
영국 옥스퍼드셔 오엑스14 4알와이 아빙돈, 밀턴 파크, 101파크 드라이브, 어댑티문 리미티드 내
(74) 대리인
강철중

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 문영준

(54) 발명의 명칭 T 세포 수용체

(57) 요약

본 발명은 MAGE-A4 단백질로부터 유래된 HLA-A*0201 제한 펩타이드 GYVDGREHTV (SEQ ID NO: 1)와 결합하는 T 세포 수용체 (TCRs)에 관한 것이다. 본 발명의 TCRs는 MAGE 항원결정부에 대해 우수한 특이성 프로파일을 나타낸다. 또한, 본 발명은 TCRs를 암호화하는 핵산, TCRs를 나타내기 위해 조작된 세포, TCRs를 암호화하는 발현 벡터를 하버링하는 세포, 및 본 발명의 TCRs, 핵산 또는 세포를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/4748 (2013.01)

C12N 5/0636 (2023.05)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

T 세포 수용체(TCR)에 있어서,

상기 T 세포 수용체는 TCR 알파 사슬 가변 영역을 포함하는 TCR 알파 사슬 및 TCR 베타 사슬 가변 영역을 포함하는 TCR 베타 사슬로 구성되며,

알파 CDR1은 VSPFSN이며;

알파 CDR2은 LTIMTF, LTIVTF 또는 LTILTF이며;

알파 CDR3은 CVVSGGTDSWGKLQF이며;

베타 CDR1은 KGHDR이며;

베타 CDR2은 SFDVK이며; 그리고

베타 CDR3은 CATSGQGAYEEQFF인, T 세포 수용체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 T 세포 수용체는 알파 사슬 TRAV10 + TRAC 불변 영역 서열 및 베타 사슬 TRBV24-1 + TRBC-2 불변 영역 서열을 가진, 알파-베타 이중이량체인, T 세포 수용체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 T 세포 수용체는 유형 $V\alpha-L-V\beta$, $V\beta-L-V\alpha$, $V\alpha-C\alpha-L-V\beta$, 또는 $V\alpha-L-V\beta-C\beta$ 의 단일 사슬 형태로 존재하고, 상기 $V\alpha$ 및 $V\beta$ 는 각각 TCR α 및 β 가변 부위이며, $C\alpha$ 및 $C\beta$ 는 각각 TCR α 및 β 불변 부위이며, L은 링커 서열인, T 세포 수용체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 T 세포 수용체는 검출가능한 표지, 치료제, 또는 PK 변형 잔기(pharmacokinetic modifying moiety)와 연합(associated) 되는 것인, T 세포 수용체.

청구항 5

핵산에 의해 암호화된 TCR을 제시하는(presenting) 분리된 또는 자연적으로 발생하지 않는 세포로서,

상기 핵산은 TCR 알파 사슬 가변 영역을 포함하는 TCR 알파 사슬 및 TCR 베타 사슬 가변 영역을 포함하는 TCR 베타 사슬로 구성된 TCR을 암호화하며, 여기서:

알파 CDR1은 VSPFSN이며;

알파 CDR2은 LTIMTF, LTIVTF 또는 LTILTF이며;

알파 CDR3은 CVVSGGTDSWGKLQF이며;

베타 CDR1은 KGHDR이며;

베타 CDR2은 SFDVK이며; 그리고

베타 CDR3은 CATSGQGAYEEQFF인, 분리된 또는 자연적으로 발생하지 않는 세포.

청구항 6

하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 함께, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 TCR을 포함하는 암을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 7

하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 함께, 제5항에 따른 세포를 포함하는 암을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 흑색종(melanoma)-관련 항원 (MAGE) A4 단백질 (아미노산 230-239)로부터 유래된 HLA-A*0201 제한 (restricted) 테카펩타이드 GYYDGREHTV와 결합하는 T 세포 수용체(TCRs, T cell receptors)에 관한 것이다. 본 발명의 TCRs는 상기 MAGE 항원결정부에 대해 우수한 특이성 프로파일을 나타낸다.

배경 기술

[0002] 암 정소 항원(cancer testis antigen, CTA)은 약 140 유전자에 의해 암호화된 종양-관련 항원 (TAA)의 하위 분류이다. 상기 항원들의 발현은 정소, 태반 및 태아의 난소와 같은 면역 특유 부위(immune privileged)에서 제한된다: 이들은 전형적으로 다른 조직에서는 발현되지 않는다. 이러한 유전자들의 발현은 악성 종양에서 관찰되어 왔다. CTA의 면역원성은 많은 고형 종양에서 이러한 항원들을 표적으로 하는 암 백신의 광범위한 개발로 이어져 왔다. TAA의 상기 큰 분류 안에서, 흑색종-관련 항원(MAGE)이 암 면역요법을 위한 유망한 후보로 나타났다.

[0003] 30 이상의 암 정소 (CT) 유전자는 염색체 X (CT-X 항원)에 대한 유전자군으로 구조화된 다-유전자계의 일원 (member)으로서 보고되어 왔다. CT 유전자군은 MAGE 및 NY-ESO-1와 같은 유전자계를 포함하고, Xq24 및 Xq28 사이에 위치한다. 유형 I MAGE 유전자군은 가장 대규모로 특징화되고, MAGE-A, MAGE-B 및 MAGE-C 계를 포함한다. MAGE-A 단백질은 12개의 상이한 MAGE-A 유전자계 일원(MAGE-A1 내지 MAGE-A12)에 의해 암호화되고, MAGE 상동 부위 (MHD)라 불리는, 보존된 165-171 아미노산 염기에 의해 정의된다. MHD는 모든 MAGE-A계 일원에 의해 공유되는 아미노산의 유일한 부위에 상응한다.

- [0004] T 세포는 인간 백혈구 항원 ("HLA"), 또는 주조직적합성복합체 ("MHCs")라 불리는, 세포 표면 분자의 복합체, 및 펩타이드와 함께 상호작용하고 인식된다. 또한 HLA/MHC 분자를 나타내는 세포에 의해 처리되는, 큰 분자로부터 펩타이드는 유래된다. HLA 분자 및 펩타이드의 특정 조합에 대해 특이한 T 세포를 요구하면서, T 세포 및 HLA/펩타이드 복합체의 상호작용은 제한된다. 특이한 T 세포가 존재하지 않는 경우, 비록 그의 파트너 복합체가 존재할지라도 T 세포 반응은 나타나지 않는다. 유사하게, 특이한 복합체가 존재하지 않지만 T 세포는 존재하는 경우 반응은 나타나지 않는다. 메커니즘은 감염에 대한 면역 시스템의 반응에, 자기 면역 질환에, 그리고 종양과 같은 기형(abnormalities)에 대한 반응에 연관되어 있다.
- [0005] 일부 MAGE 유전자계 단백질은 생식 세포(germ cells) 및 암 (MAGE-A 내지 MAGE-C 계)에서 단지 발현된다. 다른 것은 정상 조직 (MAGE-H를 통한 MAGE-D)에서 널리 발현된다. 모든 이러한 MAGE 단백질계는, 면역 인식반응에서 HLA/펩타이드 복합체로서 나타나는 펩타이드를 포함하고 다른 MAGE 단백질의 서열과 거의 일치하는 상동 부위를 갖는다. 따라서, 바람직한 MAGE 펩타이드/HLA-A2 항원에 대해 매우 특이한 TCR 임상 후보자를 고르는 것은 중요하다.
- [0006] MAGE A4는 MAGE A 유전자계의 CTA 일원이다. 배아 발달에서 역할을 할 수 있는 것으로 생각되지만, 그 기능은 알려지지 않았다. 종양 발생에서, 이것은 종양 변화 또는 종양 진행의 측면에 연루되어 있는 것 같다. MAGE A4는 정상피종, 선천성 각화부전증, 흑색종, 간세포암, 콩팥세포암, 췌장암, 폐암, 결장암, 및 유방암을 포함하는, 수많은 종양에 연루되어 있다. 펩타이드 GYVDGREHTV (SEQ ID No: 1)는 공지된 MAGE-A4 단백질의 아미노산 잔기 번호 230-239에 상응한다.
- [0007] MAGE B2는 MAGE B 유전자계의 CTA이다. MAGE B2는 태반 및 정소에서 발현되고, 다양한 조직적 유형의 종양의 상당한 부분에서 발현된다. 특정 TCRs가 둘 모두의 펩타이드를 나타내는 HLA 분자에 결합할 수 있도록, 펩타이드 GYVDGEEHSV (SEQ ID No. 2)은 MAGE A4과 교차 반응성을 나타낸다.
- 발명의 내용**
- 과제의 해결 수단**
- [0008] 본 발명의 출원인은 MAGE B2보다 우선적으로 MAGE A4 펩타이드 GYVDGREHTV를 보여주는 HLA 분자에 결합하는 TCR을 개발하였다. 첫 번째 측면에서, 본 발명은 TCR의 가용성 형태를 사용하여 pH 7.1 및 7.5 사이 및, 25℃에서 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)으로 측정하였을 때, 약 0.05 μ M 내지 약 20.0 μ M의 해리 상수를 가지고 HLA-A*0201와 복합체로 있는 GYVDGREHTV (SEQ ID No: 1 (서열 ID 번호:1))과 결합하는 특성을 가진 T 세포 수용체 (TCR)를 제공하며, 여기서 상기 TCR은 TCR 알파 사슬 가변 영역 및 TCR 베타 사슬 가변 영역을 포함하고, TCR 가변 영역 형태는 적어도 GYVDGREHTV(SEQ ID No: 1)의 잔기 V2, Y3 및 D4와 접촉한다.
- [0009] 실시형태에서, 본 발명에 따른 TCR은 TCR의 가용성 형태를 사용하여 pH 7.1 및 7.5 사이 및, 25℃에서 표면 플라즈몬 공명으로 측정하였을 때, 약 20 μ M 내지 약 50 μ M의 해리 상수를 가지고 HLA-A*0201와 복합체로 있는 GYVDGEEHSV (SEQ ID No: 2)와 결합하는 특성을 가지며, 여기서 TCR은 TCR 알파 사슬 가변 영역 및 TCR 베타 사슬 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 해리 상수는 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M 또는 그 이상과 같이, 50microM 이상이다.
- [0010] 따라서, 본 발명에 따른 TCR은 GYVDGREHTV를 나타내는 HLA에 효율적으로 결합할 수 있지만, GYVDGEEHSV를 나타내는 HLA에게는 아니다.
- [0011] 일부 실시형태에서, TCR의 알파 사슬 가변 영역은 SEQ ID No: 3 (**알파 사슬**)의 아미노산 잔기 1-111의 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 및/또는 베타 사슬 가변 영역은 SEQ ID No: 4 (**베타 사슬**)의 아미노산 잔기 1-111의 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0012] 추가적인 측면에서, 본 발명은 HLA-A*0201와 복합체를 이루고 GYVDGREHTV (SEQ ID No: 1)와 결합하는 특성을 가지고, TCR 알파 사슬 가변 영역 및 TCR 베타 사슬 가변 영역,
- [0013] SEQ ID No: 3의 아미노산 잔기 1-111의 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 알파 사슬 가변 영역, 및/또는
- [0014] SEQ ID No: 4의 아미노산 잔기 1-111의 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 베타 사슬 가변 영역을 포함하는, T 세포 수용체 (TCR)를 제공한다.

- [0015] GYVDGREHTV HLA-A2 복합체는 본 발명의 TCRs이 표적화할 수 있는 암 마커(cancer markers)를 제공한다. 본 발명은 암 세포에 세포 독성 또는 면역효과제를 전달하기 위한 목적에 유용한 TCRs 및/또는 입양 요법(adoptive therapy)에서 사용하기에 유용한 TCRs을 제공한다.
- [0016] TCRs은 국제면역유전학(International Immunogenetics: IMGT) TCR 명명법을 사용하여 설명되며, TCR 서열의 IMGT 공개 데이터베이스에 연결된다. 본래의 알파-베타 이중이량체 T 세포 수용체(native alpha-beta heterodimeric TCRs)는 알파 사슬 및 베타 사슬을 갖는다. 널리, 각 사슬은 가변, 결합(joining) 및 불변 부위를 포함하며, 베타 사슬은 또한 일반적으로 가변 부위와 결합 부위 사이의 짧은 다양성 부위(diversity region)를 포함하지만, 상기 다양성 부위는 종종 결합 부위의 일부로 간주된다. 각각의 가변 부위는 서열 구조(framework sequence)에 끼워진(embedded) 3개의 CDRs(상보성 결정 영역)을 포함하며, 하나는 CDR3로 명명된 초가변부위(hypervariable region)이다. 그들의 구조(framework), CDR1 및 CDR2 서열, 및 부분적으로 정의된 CDR3 서열에 의하여 구별되는 여러 유형의 알파 사슬 가변(V α) 부위 및 여러 유형의 베타 사슬 가변(V β) 부위가 있다. V α 유형은 고유한 TRAV 번호에 의해 IMGT 명명법에서 언급된다. 따라서, "TRAV21"은 고유한 구조 및 CDR1 및 CDR2 서열, 및 TCR에서 TCR로 보존되는 아미노산 서열에 의하여 부분적으로 정의되지만 또한 TCR에서 TCR로 다양화된 아미노산 서열을 포함하는 CDR3서열을 갖는 TCR V α 부위를 정의한다. 동일한 방식으로, "TRBV5-1"은 고유의 구조(framework) 및 CDR1 및 CDR2 서열을 가지지만, 부분적으로 정의된 CDR3 서열만을 갖는 TCR V β 부위를 정의한다.
- [0017] TCR의 결합 부위는 고유한 IMGT TRAJ 및 TRBJ 명명법에 의해 유사하게 정의되며, 그리고 불변 부위는 IMGT TRAC 및 TRBC 명명법에 의해 유사하게 정의된다.
- [0018] 베타 사슬 다양성 부위는 IMGT 명명법에서 약어 TRBD로 언급되며, 및, 언급된 바와 같이, 연결된(concatenated) TRBD/TRBJ 부위는 종종 결합 부위로서 함께 고려된다.
- [0019] $\alpha\beta$ TCR의 α 및 β 사슬은 일반적으로 각각 두 개의 "영역(domain)", 즉 가변 영역과 불변 영역을 갖는 것으로 간주된다. 가변 영역은 가변 부위와 결합 부위의 연결로 구성된다. 따라서, 본 명세서 및 청구범위에서, 용어 "TCR 알파 가변 영역(TCR alpha variable domain)"은 TRAV 및 TRAJ 부위의 연결을 지칭하며, 용어 TCR 알파 불변 영역은 세포 외 TRAC 부위, 또는 C-말단 절단 TRAC 서열(C-terminal truncated TRAC sequence)을 지칭한다. 마찬가지로, 용어 "TCR 베타 가변 영역(TCR beta variable domain)"은 TRBV 및 TRBD/TRBJ 부위의 연결을 지칭하며, 용어 TCR 베타 불변 영역은 세포 외 TRBC 부위, 또는 C-말단 절단 TRBC 서열을 지칭한다.
- [0020] MGT 명명법에 의해 정의된 고유한 서열은 널리 알려져 있으며, TCR 분야에서 일하는 사람들이 이용할 수 있다. 예를 들어, 그들은 IMGT 공용 데이터베이스에서 찾아볼 수 있다. "T 세포 수용체 팩트북"(2001, LeFranc and LeFranc, 아카데미 출판(Academic Press), ISBN 0-12-441352-8)은 또한 IMGT 명명법으로 정의된 서열을 개시하지만, 공개 일자 및 이에 따른 시간차 때문에, 그 안에 있는 정보는 때때로 IMGT 데이터베이스를 참조하여 확인되어야 한다.
- [0021] 본 발명에 따른 하나의 TCR은 SEQ ID No: 2(TRA ν 10 + TRAC)에 나타난 바와 같은 알파 사슬 세포 외 영역 및 SEQ ID NO: 3(TRBV24-1 + TRBC-2)에 나타난 바와 같은 베타 사슬 세포 외 영역을 포함한다. 용어 "부모 TCR(parental TCR)", "부모 MAGE-A4 TCR(parental MAGE-A4 TCR)"는 각각 SEQ ID No: 2 및 SEQ ID No: 3의 세포 외 알파 및 베타 사슬을 포함하는 상기 TCR을 지칭하기 위해 본 발명에서 동의어로 사용된다. 부모 TCR 보다 펩타이드-HLA 복합체에 대해 더 높은 친화도(affinity) 및/또는 더 느린 오프-레이트(분리-속도)를 갖는 부모 TCR에 관하여 돌연변이화된 또는 변형된 TCRs을 제공하는 것이 바람직하다.
- [0022] 그러한 돌연변이화된 또는 변형된 TCRs의 결합 프로파일(binding profile)이 비교될 수 있는 기준 TCR(reference TCR)을 제공하기 위해, SEQ ID No: 4에 주어진 부모 MAGE-A4 TCR 베타 사슬의 세포 외 서열 및 SEQ ID No: 3에 주어진 부모 MAGE-A4 TCR 알파 사슬의 세포 외 서열을 갖는 본 발명에 따른 가용성 TCR을 사용하는 것이 편리하다. 상기 TCR은 본 명세서에서 "기준 TCR" 또는 "기준 MAGE-A4 TCR"로 언급된다. SEQ ID No: 5는 SEQ ID No: 3의 부모 알파 사슬 세포 외 서열을 포함하고, C162는 T162 (즉, TRAC의 T48)에 대해 치환된다. 마찬가지로, SEQ ID No: 6은 SEQ ID No: 4의 부모 베타 사슬 세포 외 서열이고, C169는 S169 (즉, TRBC2의 S57)에 대해 치환되며, A187는 C187에 대해 치환되고, D201는 N201에 대해 치환된다. 부모 알파 및 베타 사슬 세포 외 서열과 관련된 이러한 시스테인 치환은 리폴딩된(refolded) 가용성 TCR, 즉 세포 외 알파 및 베타 사슬을 리폴딩함으로써 형성된 TCR을 안정화시키는 사슬 간 이황화 결합의 형성을 가능하게 한다. 기준 TCR로서 안정한 이황화 연결 가용성 TCR의 사용은 결합 친화도 및 결합 반감기의 보다 편리한 평가를 가능하게

한다. 본 발명의 TCRs은 상기에서 설명된 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 TCRs은 비-자연적으로 발생 및/또는 정제 및/또는 조작(engineered)될 수 있다. 본 발명의 TCRs은 부모 TCR에 관하여 알파 사슬 가변 영역 및/또는 베타 사슬 가변 영역에 존재하는 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다. "조작된 TCR(Engineered TCR)" 및 "돌연변이 TCR(mutant TCR)"은 본 명세서에서 동의어로 사용되며, 그리고 특히 그의 알파 사슬 가변 영역 및/또는 베타 사슬 가변 영역에서, 일반적으로 부모 TCR에 관하여 도입된 하나 이상의 돌연변이를 갖는 TCR을 의미한다. 이러한 돌연변이(들)는 HLA-A*020101와 복합체로 있는 GVYDGREHTV (SEQ ID No: 1)에 대한 결합 친화도를 향상시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 알파 사슬 가변 영역에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 돌연변이, 예를 들어 4 또는 8개의 돌연변이, 및/또는 베타 사슬 가변 영역에서 1, 2, 3, 4 또는 5개의 돌연변이, 예를 들어 5개의 돌연변이가 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 TCR의 α 사슬 가변 영역은 SEQ ID No: 3의 아미노산 잔기 1-111의 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 TCR의 β 사슬 가변 영역은 SEQ ID No: 4의 아미노산 잔기 1-111의 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0024] SEQ ID No: 3에서 나타난 번호 매김(numbering)을 참조하여, 본 발명의 TCR의 알파 사슬 가변 영역은 하기 돌연변이를 가질 수 있다: 및/또는

[0025]

M4	V or L
----	--------

[0026] SEQ ID No: 4에서 나타난 번호 매김을 참조하여, 베타 사슬 가변 영역은 하기 돌연변이 중 적어도 하나를 가질 수 있다.

[0027]

N10	E
-----	---

[0028] 본 발명의 TCR의 알파 사슬 가변 영역은 SEQ ID No: 3, 5 또는 7 내지 8의 아미노산 잔기 1-105의 아미노산 서열, 또는

[0029] 그의 아미노산 잔기 1-27, 34-47, 및 54-90가 각각 SEQ ID No: 3, 5 또는 7 내지 8의 아미노산 잔기 1-27, 34-47, 및 54-90의 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 갖고, 그리고 아미노산 잔기 28-33, 48-53 및 91-105가 각각 SEQ ID No: 3, 5 또는 7 내지 8의 아미노산 잔기 28-33, 48-53 및 91-105의 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0030] 알파 사슬 가변 영역에서,

[0031] (i) 그의 아미노산 잔기 1-26의 서열은, (a) SEQ ID No: 3의 아미노산 잔기 1-26의 서열과 적어도 90%의 동일성을 가질 수 있거나, 또는 (b) 상기 (a)의 서열과 관련하여 삽입되거나 결실된 하나, 둘 또는 세 개의 아미노산 잔기를 가질 수 있다;

[0032] (ii) 아미노산 잔기 28-33의 서열은 VSPFSN이다;

[0033] (iii) 그의 아미노산 잔기 33-49의 서열은 (a) SEQ ID No: 3의 아미노산 잔기 34-47의 서열과 적어도 90%의 동일성을 가질 수 있거나, 또는 (b) 상기 (a)의 서열과 관련하여 삽입되거나 결실된 하나, 둘 또는 세 개의 아미노산 잔기를 가질 수 있다;

[0034] (iv) 아미노산 잔기 48-53의 서열은 LTIMTF 또는 LTRMTF 또는 LTIVTF 또는 LTILTF일 수 있다;

[0035] (v) 그의 아미노산 잔기 55-89의 서열은 SEQ ID No: 3의 아미노산 잔기 54-90의 서열과 적어도 90%의 동일성을 가질 수 있거나, 또는 그와 관련하여 하나, 둘 또는 세 개의 삽입, 결실 또는 치환을 가질 수 있다;

[0036] (vi) 아미노산 90-93의 서열은 CVVSGGTDSWGKLQF일 수 있다.

[0037] 본 발명의 TCR의 베타 사슬 가변 영역은 SEQ ID No: 4 또는 6 또는 9의 아미노산 서열, 또는

[0038] 그의 아미노산 잔기 1-45, 51-67, 74-109가 각각 SEQ ID No: 4 또는 9의 아미노산 잔기 1-45, 51-67, 74-109의 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 갖고, 그리고 아미노산 잔기 46-50, 68-73 및 109-123가 각각 SEQ ID

No: 4 또는 9의 아미노산 잔기 46-50, 68-73 및 109-123의 서열과 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0039]

베타 사슬 가변 영역에서,

[0040]

(i) 그의 아미노산 잔기 1-45의 서열은 (a) SEQ ID No: 4의 잔기 1-45의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 가질 수 있거나, 또는 (b) 상기 (a)의 서열과 관련하여 삽입되거나 결실된 하나, 둘 또는 세 개의 아미노산 잔기를 가질 수 있다;

[0041]

(ii) 아미노산 잔기 46-50의 서열은 KGHDR일 수 있다;

[0042]

(iii) 그의 아미노산 잔기 51-67의 서열은 (a) SEQ ID No: 4의 아미노산 잔기 51-67의 서열과 적어도 90%의 동일성을 가질 수 있거나, 또는 (b) 상기 (a)의 서열과 관련하여 삽입되거나 결실된 하나, 둘 또는 세 개의 아미노산 잔기를 가질 수 있다;

[0043]

(iv) 아미노산 잔기 68-73의 서열은 SVFDK일 수 있다;

[0044]

(v) 그의 아미노산 잔기 54-90의 서열은 (a) SEQ ID No: 4의 아미노산 잔기 54-90의 서열과 적어도 90%의 동일성을 가질 수 있거나, 또는 (b) 상기 (a)의 서열과 관련하여 삽입되거나 결실된 하나, 둘 또는 세 개의 아미노산 잔기를 가질 수 있다;

[0045]

(vi) 아미노산 109-123의 서열은 CATSGQGAYNEQFF 또는 CATSGQGAYREQFF이다.

[0046]

본 발명의 TCR은 알파 및 베타 사슬 가변 영역의 하기 조합 중 하나를 가질 수 있다:

알파 사슬 SEQ ID No	베타 사슬 SEQ ID No
3	4
3	6
3	9
5	4
5	6
5	9
7	4
7	6
7	9
8	4
8	6
8	9

[0047]

[0048]

본 명세서에 개시된 본 발명의 임의의 TCR의 표현형적으로 침묵하는 변이체는 본 발명의 범위 안에 있다. 본 명세서에서 사용되는 것과 같이, 용어 "표현형적으로 침묵하는 변이체(phenotypically silent variants)"는 TCR이 상기 변화(들) 없이 상응하는 TCR과 유사한 표현형을 갖는, 상기에 제시된 것 뿐만 아니라 하나 이상의 추가의 아미노산 변화를 포함하는 TCR을 의미하는 것으로 이해된다. 본 출원의 목적을 위하여, TCR 표현형은 항원 결합 특이성(K_D 및/또는 결합 반감기) 및 항원 특이성을 포함한다. 표현형적으로 침묵하는 변이체는, 동일한 조건 (예를 들어, 25°C 및 동일한 SPR 칩(SPR chip)) 하에서 측정했을 때, 상기 변화(들) 없이 상응하는 TCR의 측정된 K_D 및/또는 결합 반감기의 10% 이내에서, GYDGREHTV (SEQ ID No: 1) HLA-A*0201 복합체에 대한 K_D 및/또는 결합 반감기를 가질 수 있다. 적합한 조건은 실시예 3에서 추가로 정의된다. 항원 특이성은 하기에 추가로

정의된다. 통상의 기술자에게 공지된 바와 같이, GYVDGREHTV (SEQ ID No: 1) HLA-A*0201 복합체와의 상호작용에 대한 친화도를 변경시키지 않으면서, 상기 기술된 것들과 비교하여 그것의 불변 영역 및/또는 가변 영역에서의 변화를 포함하는 TCRs을 생산하는 것이 가능할 수 있다. 특히, 그러한 침묵 돌연변이는 항원 결합(예를 들어, 외부 CDRs)에 직접적으로 관여하지 않는 것으로 공지된 서열의 일부 안에서 포함될 수 있다. 그런 사소한 변이체들은 본 발명의 범위 안에 포함된다. 하나 이상의 보존적 치환이 이루어진 TCRs도 또한 본 발명의 일부를 형성한다.

[0049] 돌연변이는 임의의 적절한 방법을 사용하여 수행될 수 있으며, 이에 제한되지는 않지만, 중합효소 연쇄 반응(PCR), 제한 효소-기반 클로닝(restriction enzyme-based cloning) 또는 라이게이션 인디펜던트 클로닝(ligation independent cloning: LIC) 절차에 근거한 방법들을 포함한다. 이러한 방법들은 많은 표준 분자 생물학 교과서에 자세히 나와 있다. 중합 효소 연쇄 반응(PCR) 및 제한 효소-기반 클로닝에 대한 보다 자세한 내용은, Sambrook & Russell(2001, Molecular Cloning - A Laboratory Manual (제3판), CSHL 출판사)를 참조할 수 있다. 라이게이션 인디펜던트 클로닝(LIC) 절차에 대한 자세한 내용은 Rashtchian(1995, Curr Opin Biotechnol **6** (1): 30-6)에서 찾을 수 있다.

[0050] 본 발명의 TCRs은 MAGE-A4 펩타이드, GYVDGREHTV (SEQ ID No: 1) HLA-A2 복합체와 결합하는 특성을 갖는다. 본 발명의 TCRs은 다른, 무관한 항원결정부와 관련하여 그들의 MAGE 항원결정부에 대해 매우 독특한 것으로 밝혀졌으며, 따라서 그들의 항원결정부를 나타내는 조직 및 세포로 치료제 또는 검출 가능한 표지를 전달하기 위한 표적 벡터로서 특히 적합하다. 본 발명의 TCRs에 관한 내용에서 특수성(specificity)은 펩타이드 GYVDGREHTV에 대해 양성인 HLA-A*0201 표적 세포를 인식하는 반면에, 펩타이드에 대해 음성인 HLA-A*0201 표적 세포, 또는 MAGE B2 펩타이드 GYVDGEEHSV를 나타내는 HLA 세포를 인식하는 최소한의 능력을 가진, 이들의 능력에 관한 것이다. 특수성을 시험하기 위해, TCRs은 T 세포의 표면에서 발현될 수 있고 및/또는 가용성 형태일 수 있다. 인식(Recognition)은 TCR 및 표적 세포의 존재에서 T 세포 활성화의 수준을 측정함으로써 결정될 수 있다. 이 경우에, 펩타이드 음성(negative) 또는 MAGE B2 표적 세포의 최소 인식은, 동일한 조건에서 측정되는 경우, 펩타이드 양성(positive) 표적 세포의 존재 하에서 생성된 수준의 10% 미만, 바람직하게는 5% 미만, 및 보다 바람직하게는 1% 미만의 T 세포 활성화의 수준으로서 정의된다. 본 발명의 가용성 TCRs에 대해, 특수성은 치료적으로 관련된 TCR 농도에서 결정될 수 있다. 치료적으로 관련된 농도는 10^{-9} M 이하의 TCR 농도, 및/또는 상응하는 EC50 값보다 100배 이하의 농도, 바람직하게는 1000배 이하의 농도로 더 큰 것으로 정의될 수 있다. 펩타이드 양성 세포는 펩타이드-펄싱(pulsing)에 의해 얻어질 수 있으며, 또는 보다 바람직하게는, 이들은 상기 펩타이드에 자연적으로 존재할 수 있다. 바람직하게는, 펩타이드 양성 및 펩타이드 음성 세포 모두는 인간 세포이다.

[0051] 본 발명의 특정 TCRs은 입양 요법에 사용하기에 매우 적합한 것으로 밝혀졌다. 이러한 TCRs은 200 μ M 미만, 예를 들어 약 0.05 μ M 내지 약 20 μ M 또는 약 100 μ M의 복합체에 대한 K_D 를 가질 수 있고 및/또는 약 0.5초 내지 약 12분 범위의 복합체에 대한 결합 반감기($T_{1/2}$)를 가질 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 TCRs은 약 0.05 μ M 내지 약 20 μ M, 약 0.1 μ M 내지 약 5 μ M, 또는 약 0.1 μ M 내지 약 2 μ M의 복합체에 대한 K_D 를 가질 수 있다. 이론에 얽매지 않고, 입양 세포 치료에서 치료적 용도를 가진 TCRs을 위한 친화도의 최적 윈도우(optimum window)가 있는 것으로 보인다. 종양 항원으로부터의 항원결정부를 인식하는 자연적으로 발생하는 TCRs은 일반적으로 너무 낮은 친화도(20microM 내지 50microM)이고, 매우 높은 친화도 TCRs (나노 몰(nanomolar) 범위 또는 그 이상)은 교차 반응성 문제를 겪는다(Robbins 등 (2008) J.Immunol.**180** 16116-6131; Zhao 등 (2007) J. Immunol. **179** 5845-5854; Schmid 등 (2010) J. Immunol **184** 4936-4946).

[0052] 본 발명의 TCRs은 $\alpha\beta$ 이종이량체(heterodimers)일 수 있거나 단일 사슬 형태일 수 있다. 단일 사슬 형태는 $V\alpha$ -L- $V\beta$, $V\beta$ -L- $V\alpha$, $V\alpha$ -C α -L- $V\beta$ 또는 $V\alpha$ -L- $V\beta$ -C β 유형의 $\alpha\beta$ TCR 폴리펩타이드를 포함하고, 여기에서 $V\alpha$ 및 $V\beta$ 는 각각 TCR α 및 β 가변 부위이고, C α 및 C β 는 각각 TCR α 및 β 불변 부위이고, L은 링커 서열이다. 치료제를 항원 제시 세포(antigen presenting cell)로 전달하기 위한 표적 제제로서 사용하기 위해, TCR은 가용성 형태(즉, 막전위 또는 세포질 영역(cytoplasmic domains)을 갖지 않음)일 수 있다. 안정성을 위해, 가용성 $\alpha\beta$ 이종이량체 TCRs은 바람직하게는, 예를 들어, WO 03/020763에 기재된 바와 같이, 각각의 불변 영역의 잔기 사이에 도입된 이황화결합을 갖는다. 본 발명의 $\alpha\beta$ 이종이량체에 존재하는 불변 영역 중 하나 또는 두 개는 C 말단 또는 C 말단들에서, 예를 들어 15개 이하, 또는 10개 이하 또는 8개 이하 또는 더 적은 수의 아미노산으로 절단(truncated)될 수 있다. 입양 요법에서 사용하기 위해, $\alpha\beta$ 이종이량체 TCR은, 예를 들어, 세포질 및 막전위 영역 모두를 갖는 전장 사슬로 형질 감염(transfected)될 수 있다. 입양 요법의 용도를 위한 TCRs은 각각의 알파 및 베타 불변 영역들 사이에서 자연적으로 발견되는 것에 상응하는 이황화결합을 함유

할 수 있고, 추가적으로 또는 대안적으로 비-자연적 이황화결합이 존재할 수 있다.

- [0053] 통상의 기술자에게 자명한 바와 같이, 실질적으로 TCR의 결합 특성에 영향을 미치지 않으면서, 1, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 잔기로, C-말단 및/또는 N-말단에 제공되는 서열을 절단할 수 있다. 모든 그러한 사소한 변이체들은 본 발명에 포함된다.
- [0054] 본 발명의 알파-베타 이중이량체 TCRs은 보통 알파 사슬 TRAC 불변 영역 서열 및 베타 사슬 TRBC1 또는 TRBC2 불변 영역 서열을 포함한다. 알파 및 베�타 사슬 불변 영역 서열은 절단 또는 치환에 의해 변형되어, TRAC의 엑손 2(exon 2)의 Cys4 및 TRBC1 또는 TRBC2의 엑손 2의 Cys2 사이의 본래의(native) 이황화결합을 제거할 수 있다. 알파 및 베타 사슬 불변 영역 서열은 또한 TRAC의 Thr 48 및 TRBC1 또는 TRBC2의 Ser 57에 대한 시스템인 잔기의 치환에 의해 변형될 수 있으며, 상기 시스템은 TCR의 알파 및 베타 불변 영역 사이에 이황화결합을 형성한다.
- [0055] 본 발명의 일부 TCRs은 기준 MAGE-A4 TCR의 그것보다 실질적으로 더 큰 GVDGREHTV -HLA-A2 복합체에 대한 결합 반감기 및/또는 결합 친화도를 갖는다. 본래의 TCR의 결합 친화도를 증가시키는 것은 종종 그것의 펩타이드-MHC 리간드에 대한 TCR의 특수성을 감소시키며, 이것은 Zhao Yangbing et al., The Journal of Immunology, The American Association of Immunologists, US, vol. 179, No.9, 1 November 2007, 5845-5854에 증명되어 있다. 그러나, 부모 TCR로부터 유래된 본 발명의 TCRs은 부모 TCR보다 실질적으로 더 높은 결합 친화도를 갖음에도 불구하고, GVDGREHTV-HLA-A2 복합체에 대해 특이하게 남아 있다. 또한, 이들은 부모 TCR보다 MAGE-B2를 넘어 MAGE-A4에 대해 상당히 더 선택적이다(예를 들어, 적어도 10배).
- [0056] 본 명세서의 실시예 3의 표면 플라즈몬 공명(BIAcore) 방법을 사용하여, 결합 친화도(평형 상수 K_D 에 반비례함) 및 결합 반감기($T_{1/2}$ 로 표시함)를 결정할 수 있다. 측정은 TCR의 가용성 형태를 사용하여 25°C, 및 pH 7.1 및 7.5 사이에서 수행될 수 있다. TCR의 친화도를 두 배로 하면 K_D 가 절반으로 줄어든다는 것을 알 수 있을 것이다. $T_{1/2}$ 는 오프-레이트(k_{off})로 나뉜 $\ln 2$ 로 계산된다. 따라서, $T_{1/2}$ 를 두 배로 하면 k_{off} 값이 절반으로 줄어든다. TCRs에 대한 K_D 및 k_{off} 값은 보통 가용성 형태의 TCR에 대해 측정된다. 즉 그러한 형태들은 소수성의 막전위 영역 잔기를 제거하기 위해 절단된 것이다. 따라서, 만약 해당 TCR의 가용성 형태가 해당 요구 사항을 충족시킨다면, 주어진 TCR이 GVDGREHTV -HLA-A2 복합체에 대한 결합 친화도 및/또는 결합 반감기를 갖는 요구 사항을 만족시키는 것으로 이해될 수 있다. 주어진 TCR의 결합 친화도 또는 결합 반감기는, 동일한 분석 프로토콜을 사용하여, 수회, 예를 들어 3회 이상 측정하는 것이 바람직하고, 결과의 평균값을 취한다. 기준 MAGE-A4 TCR은 그 방법으로 측정했을 때 약 65 μM 의 K_D 를 가지며, k_{off} 는 약 0.73 s^{-1} (즉, $T_{1/2}$ 은 약 0.95 s이다).
- [0057] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 TCR을 암호화하는 핵산을 제공한다. 일부 실시형태에서, 핵산은 cDNA이다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 TCR의 α 사슬 가변 영역을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 TCR의 $\alpha\beta$ 사슬 가변 영역을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산을 제공한다. 핵산은 비-자연발생적이고 및/또는 정제된 및/또는 조작될 수 있다.
- [0058] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 바람직하게는 벡터는 TCR 발현 벡터이다.
- [0059] 본 발명은 또한 본 발명의 벡터, 바람직하게는 TCR 발현 벡터를 하버링(harboring)하는 세포를 제공한다. 상기 벡터는 단일 오픈 리딩 프레임(open reading frame) 또는 두 개의 별개의 오픈 리딩 프레임 안에서, 알파 사슬 및 베타 사슬을 각각 암호화하는 본 발명의 핵산을 포함할 수 있다. 또 다른 측면은 본 발명의 TCR의 알파 사슬을 암호화하는 핵산을 포함하는 제 1 발현 벡터, 및 본 발명의 TCR의 베타 사슬을 암호화하는 핵산을 포함하는 제 2 발현 벡터를 하버링하는 세포를 제공한다. 이러한 세포는 입양 요법에 특히 유용하다. 본 발명의 세포는 분리 및/또는 재조합 및/또는 비-자연적 발생 및/또는 조작될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 TCRs이 입양 요법에 유용하기 때문에, 본 발명은 비-자연적으로 발생하는 및/또는 정제된 및/또는 조작된 세포, 특히 본 발명의 TCR을 나타내는, T 세포를 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 TCR을 나타내는 T 세포의 확장된 집단을 제공한다. 본 발명의 TCRs을 암호화하는 핵산(예를 들어, DNA, cDNA 또는 RNA)을 가진 T 세포의 형질 감염을 위해 적합한 다수의 방법이 있다(예를 들어 Robbins 등, (2008) J Immunol. **180** : 6116-6131를 참고). 본 발명의 TCR을 발현하는 T 세포는 암의 입양 요법-기반 치료의 용도에 적합할 것이다. 통상의 기술자에게 공지된 바와 같이, 입양 요법이 수행될 수 있는 다수의 적합한 방법이 있다(예를 들어, Rosenberg

등, (2008) Nat Rev Cancer 8 (4): 299-308 참고).

- [0061] 본 발명의 가용성 TCR은 검출 가능한 표지 또는 치료제를 항원 제시 세포 및 항원 제시 세포를 함유하는 조직에 전달하는데 유용하다. 따라서, 검출 가능한 표지(진단 목적을 위하여, 여기에서 TCR은 GYVDGREHTV-HLA-A2 복합체를 제시하는 세포의 존재를 검출하는데 사용된다); 치료제; 또는 PK 변형 잔기(PK modifying moiety) (예를 들어 폐길화(PEGylation)에 의함)와 (공유결합적으로 또는 다른 방법으로) 연관될 수 있다.
- [0062] 진단 목적을 위한 검출 가능한 표지는 예를 들어, 형광 표지(fluorescent labels), 방사성 표지(radiolabels), 효소, 핵산 프로브(nucleic acid probes) 및 대조 시약을 포함한다.
- [0063] 본 발명의 TCRs과 연관될 수 있는 치료제는 면역 치료제(immunomodulators), 방사성 화합물(radioactive compounds), 효소(예를 들면, 퍼포린(perforin)) 또는 화학치료제 (예를 들면, 시스플라틴(cisplatin))을 포함한다. 독성 효과가 원하는 위치에서 수행되도록 하기 위하여, 독소는 TCR에 연결된 리포솜 내부에 있을 수 있어서 화합물은 천천히 방출된다. 이것은 몸 안에서 전달하는 동안 손상되는 효과를 방지할 것이고, 관련된 항원 제시 세포에 TCR을 결합한 후 독소가 최대의 효과를 가지도록 보장할 것이다.
- [0064] 다른 적합한 치료제는 다음을 포함한다.
- [0065] 소분자 세포독성제, 즉, 700 달톤(Dalton) 미만의 분자량을 갖는 포유 동물 세포를 죽일 수 있는 화합물. 상기 화합물은 또한 세포 독성 효과를 가질 수 있는 독성 금속을 함유할 수 있다. 또한, 이들 소분자 세포독성제는 프로-약물(pro-drugs), 즉, 세포 독성제를 방출하기 위해 생리학적 조건 하에서 붕괴되거나 전환되는 화합물을 포함하는 것으로 이해된다. 그러한 제제들의 예로 시스-플라틴(cis-platin), 메이탄시네 유도체(maytansine derivatives), 라켈마이신(rachelmycin), 칼리키아미신(calicheamicin), 도세타셀(docetaxel), 에토포시드(etoposide), 겐시타빈(gemcitabine), 이포스파미드(ifosfamide), 이리노테칸(irinotecan), 멜파란(melphalan), 미토산트론(mitoxantrone), 소르피머 소듐포토프린 II(sorfiner sodiumphotofrin II), 테모졸로미드(temozolomide), 토포테칸(topotecan), 트리메트레이트 글루쿠로네이트(trimetreate glucuronate), 아우리스타틴 E 빈크리스티네(auristatin E vincristine) 및 독소루비신(doxorubicin)을 포함한다;
- [0066] · 펩타이드 세포독소 즉, 포유 동물 세포를 죽일 수 있는 단백질 또는 그의 단편. 예를 들어, 리신(ricin), 디프테리아 독소(diphtheria toxin), 슈도모나스 박테리아 외독소 A(pseudomonas bacterial exotoxin A), DNase 및 RNase;
- [0067] · 방사성 핵종(radio-nuclides), 즉 하나 이상의 α 또는 β 입자 또는 γ 선의 동시 방출로 붕괴되는 원소의 불안정한 동위 원소. 예를 들어, 요오드 131, 레늄(rhenium) 186, 인듐 111, 이트륨(yttrium) 90, 비스무트(bismuth) 210 및 213, 악티늄(actinium) 225 및 아스타틴(astatine) 213; 킬레이팅제(chelating agents)는 고친화도의 TCRs, 또는 그의 다량체에 대한 이러한 방사성 핵종의 연관을 촉진시키는 데 사용될 수 있다;
- [0068] · 면역-자극제, 즉 면역 반응을 자극하는 면역 효과제 분자. 예를 들어, IL-2 및 IFN- γ 와 같은 사이토카인;
- [0069] · 초-항원(Superantigens) 및 그의 돌연변이;
- [0070] · TCR-HLA 융합체;
- [0071] · IL-8과 같은 케모카인, 혈소판 제4인자(platelet factor 4), 흑색종 성장 자극 단백질(melanoma growth stimulatory protein) 등;
- [0072] · 항-T 세포 또는 NK 세포 결정자 항체 (예를 들어, 항-CD3, 항 -CD28 또는 항-CD16)를 포함하는, 항체 또는 그의 단편;
- [0073] · 결합 특성과 같은 항체를 가진 대안적인 단백질 스캐폴드;
- [0074] · 보체 활성화제(complement activators);
- [0075] · 이종 단백질 도메인(xenogeneic protein domains), 동종 단백질 도메인(allogeneic protein domains), 바이러스/박테리아 단백질 도메인, 바이러스/박테리아 펩타이드.
- [0076] 하나의 바람직한 실시 형태는 항-CD3 항체, 또는 상기 항-CD3 항체의 기능적 단편 또는 변이체와 관련된 (보통 알파 또는 베타 사슬의 N- 또는 C- 말단으로의 융합에 의해) 본 발명의 TCR에 의해 제공된다. 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법에서 사용하기에 적합한 항체 단편 및 변이체/유사체는 몇 가지 예를 들자면, 미니항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, dsFv 및 scFv 단편, 나노 항체 (Nanobodies™) (Ablynx (벨기에)에서 판매되는 이들의 구

성체는, 낙타과(예를 들어, 낙타 또는 라마) 항체에서 유래하는 합성 단일 면역글로불린 가변 무거운(heavy) 영역을 포함) 및 도메인 항체(Domantis(벨기에), 친화도 성숙 단일 면역글로불린 가변 무거운 영역 또는 면역글로불린 가변 가벼운(light) 영역을 포함), 또는 아피바디스(Affibodies)(Affibody(스웨덴), 조작된 단백질 A 스캐폴드를 포함) 또는 안티칼린스(Anticalins)(Pieris (독일), 조작된 안티칼린을 포함)와 같은 항체 유사 결합 특성을 나타내는 대체 단백질 스캐폴드를 포함한다.

[0077] 일부 목적을 위해, 본 발명의 TCRs은 몇 가지 TCRs을 포함하는 복합체로 응집되어, 다가(multivalent) TCR 복합체를 형성할 수 있다. 다가 TCR 복합체의 제조에 사용될 수 있는 다량체화(multimerisation) 영역을 포함하는 다수의 인간 단백질이 있다. 예를 들어 p53의 사량체화(tetramerisation) 영역은, 증가된 혈청 지속성(serum persistence)을 나타내고 단량체(monomeric) scFv 단편과 비교할 때 현저하게 감소한 오프-레이트(off-rate)를 나타내는 scFv 항체 단편의 사량체를 제조하는데 이용되어 왔다(Willuda 등 (2001) J. Biol. Chem. **276** (17) 14385-14392). 헤모글로빈은 또한 이러한 종류의 응용에 잠재적으로 사용될 수 있는 사량체화 영역을 가지고 있다. 본 발명의 다가 TCR 복합체는 본 발명의 비-다중적(multimeric) 야생형 또는 T 세포 수용체 이종이량체와 비교해서 GYVDGREHTV HLA-A2 복합체에 대해 향상된 결합 능력을 가질 수 있다. 따라서, 본 발명의 TCRs의 다가 복합체도 또한 본 발명 안에 포함된다. 본 발명에 따른 이러한 다가 TCR 복합체는 특히 시험관 내(*in vitro*) 또는 생체 내(*in vivo*)에서 특정 항원을 제시하는 세포를 추적하거나 표적화하는데 유용하며, 또한 이러한 용도를 갖는 추가의 다가 TCR 복합체의 제조를 위한 중간체로서 유용하다.

[0078] 당해 기술 분야에서 잘 알려진 바와 같이, TCRs는 번역 후 변형을 받을 수 있다. 글리코실레이션(Glycosylation)은 그러한 변형 중 하나이며, 이것은 TCR 사슬에서 정의된 아미노산에 올리고당 부분(oligosaccharide moieties)의 공유적인 부착(attachment)을 포함한다. 예를 들어, 아스파라긴 잔기, 또는 세린(serine)/트레오닌(threonine) 잔기는 올리고당 부착에 대해 잘 알려진 위치이다. 특정 단백질의 글리코실레이션 상태는, 단백질 서열, 단백질 구조 및 특정 효소의 이용 가능성을 포함하는 다수의 요인에 의존한다. 또한, 글리코실레이션 상태(즉, 올리고당 유형, 공유적 연결 및 총 부착 수)는 단백질 기능에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 재조합 단백질을 제조할 때, 종종 글리코실레이션을 제어하는 것이 바람직하다. 제어된 글리코실레이션은 항체-기반 치료법을 개선시키는데 사용되어 왔다 (Jefferis R., Nat Rev Drug Discov., 2009 Mar; 8 (3): 226-34). 본 발명의 가용성 TCRs에 대하여, 글리코실레이션은 예를 들어 생체 내에서 특정한 세포주를 사용함으로써, 또는 시험관 내에서 화학적인 조작에 의해서 제어될 수 있다. 글리코실레이션이 약물동력(pharmacokinetic)을 향상시키고 면역원성(immunogenicity)을 감소시키며 본래의 인간 단백질을 보다 더 가깝게 모방할 수 있기 때문에, 그러한 조작은 바람직하다(Sinclair AM 및 Elliott S., Pharm Sci. 2005 Aug; 94 (8): 1626-35).

[0079] 환자에게 투여하기 위해, 본 발명의 TCRs, 핵산 및/또는 세포 (보통 검출 가능한 표지 또는 치료제와 결합된)는 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제와 함께 약학적 조성물로 제공될 수 있다. 본 발명에 따른 치료적 또는 이미징 TCRs (imaging TCRs)은 보통 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 멸균된, 약학적 조성물의 일부로서 공급될 것이다. 상기 약학적 조성물은 임의의 적합한 형태일 수 있다 (환자에게 투여하는 바람직한 방법에 따름). 그것은 단위 투약 형태로 제공될 수 있고, 일반적으로 밀폐된 용기에 제공될 것이고, 키트의 일부로서 제공될 수 있다. 이러한 키트에는 일반적으로 (반드시 그런 것은 아니지만) 사용 설명서가 포함된다. 이것은 여러 개의 상기 단위 투여 형태(dosage forms)를 포함할 수 있다.

[0080] 약학적 조성물은 임의의 적합한 경로, 바람직하게는 비경구(parenteral) 경로(피하(subcutaneous), 근육 내(intramuscular) 또는 바람직하게는 정맥 내(intravenous)를 포함)에 의한 투여에 적합할 수 있다. 이러한 조성물은 예를 들어 활성 성분을 담체(들) 또는 부형제(들)와 무균 조건 하에서 혼합함으로써, 약학 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0081] 본 발명의 물질의 투여량은 치료할 질환 또는 장애, 치료할 개인의 연령 및 상태 등에 따라 넓은 허용치 사이에서 다양할 수 있으며, 의사는 사용될 적절한 투여량을 궁극적으로 결정할 것이다.

[0082] 본 발명의 TCRs, 약학적 조성물, 벡터, 핵산 및 세포는 실질적으로 순수한 형태, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 순도에서 제공될 수 있다.

[0083] 또한, 본 발명에 의해 제공되는 것은:

[0084] · 바람직하게는 고형 종양(solid tumours)(예를 들어, 폐, 간 및 위 전이(gastric metastases)) 및/또는 편평

상피암(squamous cell carcinomas)과 같은 암 치료 방법에서의 용도인 약물(medicine)에 사용하기 위한 본 발명의 TCR, 핵산 또는 세포.

- [0085] · 암을 치료하기 위한 약의 제조에 있어서의 본 발명의 TCR, 핵산 또는 세포의 용도.
- [0086] · 본 발명의 TCR, 핵산 또는 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함하는 환자의 암을 치료하는 방법.
- [0087] 본 발명의 각각의 측면의 바람직한 특징은 다른 측면의 각각에 있어서 필요한 부분만 약간 수정하는 것이다. 본 명세서에 언급된 선행 기술 문헌은 법이 허용하는 최대 한도 내에서 통합된다.
- [0088] 본 발명은 하기의 비-제한적인 실시예에서 추가로 기술된다.
- [0089] 참조는 동봉된 서열에 관한 것이며, 여기서:
- [0090] SEQ ID No. 1 은 MAGE A4 펩타이드이다.
- [0091] SEQ ID No. 2은 MAGE B2 펩타이드이다.
- [0092] SEQ ID No: 3은 부모 MAGE-A4-특이적인 TCR의 알파 사슬의 세포 외 부분의 아미노산 서열이고, SEQ ID No: 4는 부모 MAGE-A4-특이적인 TCR 베타 사슬 아미노산 서열의 베타 사슬의 세포 외 부분의 아미노산 서열을 나타낸다.
- [0093] SEQ ID No: 5는 본래의 렌티(Lenti) TCR (본 명세서에서 "기준 TCR"로 언급됨)의 알파 사슬의 아미노산 서열을 보여준다. 서열은 시스템이 T162(즉, TRAC 불변 영역의 T48)를 치환하는 것을 제외하고는 부모 TCR의 서열과 동일하다. SEQ ID No: 6는 본래의 Lenti TCR (본 명세서에서 "기준 TCR"로 언급됨)의 베타 사슬이다. 서열은 시스템이 S169 (즉, TRBC2 불변 영역의 S57)를 치환하는 것 및, A187이 C187를 치환하는 것, 및 D201이 N201를 치환하는 것을 제외하고는 부모 TCR의 서열과 동일하다.
- [0094] SEQ ID Nos: 7 및 8은 본 발명의 TCRs에 존재할 수 있는 알파 사슬의 서열을 보여준다. CDR 부위를 형성하는 서브서열(subsequences), 또는 CDR 부위의 실질적인(substantial) 부분은 밑줄로 그어져있다.
- [0095] SEQ ID Nos 9는 본 발명의 TCRs에서 존재할 수 있는 베타 사슬의 서열을 보여준다. CDR 부위를 형성하는 서브서열, 또는 CDR 부위의 실질적인 부분은 밑줄로 그어져있다.
- [0096] SEQ ID Nos 10 내지 15는 TCRs A, B 및 C의 가용성 알파 및 베타 사슬의 서열을 보여준다. 상기 TCRs는 어느 것도 본 발명에 따라서 기능적 TCR로 발전될 수 없다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0097] **실시예들**
- [0098] **실시예 1- pGMT7-기반 발현 플라스미드로의 기준 MAGE-A4 TCR 알파 및 베타 사슬 가변 부위 서열의 클로닝**
- [0099] SEQ ID NOS: 3 및 4의 부모 MAGE-A4 TCR 가변 알파 및 TCR 가변 베타 영역은 각각 (분자 클로닝 실험 메뉴얼 제3판, 샘브룩 및 러셀 저)에 기재된 표준 방법에 의해, Cα 또는 Cβ 둘 중 하나를 함유하는 pGMT7-기반 발현 플라스미드로(into) 복제되었다. 적용된 바이오시스템 3730x1 DNA 분석기를 사용하여, 플라스미드를 서열 분석하였다. SEQ ID NOS: 4 및 5의 기준 MAGE-A4 TCR 가변 알파 및 TCR 가변 베타 영역은 각각 동일한 방식으로 복제되었다.
- [0100] TCR 알파 사슬 가변 부위를 암호화하는 DNA 서열을 pEX956에 연결하고, 제한 효소로 절단하였다. TCR 베타 사슬 가변 부위를 암호화하는 DNA 서열을 pEXb21에 연결하고, 또한 제한 효소로 절단하였다.
- [0101] 연결된 플라스미드를 컴피턴트(competent) E. coli 균주 XL1-blue 세포로 형질 전환시키고 100μg/mL 암피실린을 함유하는 LB/한천 평판 상에 두었다(plated out). 37℃에서 하룻밤 동안 배양한 후, 단일 콜로니를 채취하고 100 μg/mL 암피실린이 함유된 5 mL LB 에서 하룻밤 동안 37℃에서 흔들면서 성장시켰다. 복제된 플라스미드를 미니프렙킷(Miniprep kit (Qiagen))를 사용하여 정제하고, 플라스미드를 적용된 바이오시스템 3730x1 DNA 분석기를 사용하여 서열 분석하였다.
- [0102] **실시예 2- 가용성 기준 MAGE-A4 TCR의 발현, 리폴딩(refolding) 및 정제**
- [0103] 실시예 1에서 제조된 것과 같이, 기준 TCR α-사슬 및 β-사슬 각각을 포함하는 발현 플라스미드를 E.coli 균주 BL21pLysS 로 각각 형질 전환하고, 단일 암피실린-내성 콜로니를 TYP(암피실린 100 μg/ml) 배지에서 ~0.6-0.8의 OD₆₀₀가 되도록 37℃에서 성장시킨 후, 0.5 mM IPTG로 단백질 발현을 유도하였다. 베크만(Beckman) J-6B에서

4000rpm으로 30분간 원심 분리하여 3시간 유도 후 세포를 수확하였다. 세포 펠렛을 염화마그네슘($MgCl_2$) 및 DNaseI의 존재 하에 25 ml 버그버스터(Bug Buster (NovaGen))로 용해시켰다. 봉입체 펠렛(inclusion body pellets)을 베크만(Beckman) J2-21 원심분리기에서 13000rpm으로 30분 동안 원심 분리하여 회수하였다. 세포 파편 및 멤브레인 성분을 제거하기 위해 3 회 세제 세척을 하였다. Beckman J2-21에서 13000rpm으로 15 분간 원심 분리하여 펠렛화하기 전에, 매번 봉입체 펠렛이 Triton 완충액(50mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5% Triton-X100, 200mM NaCl, 10mM NaEDTA)에서 균질화 하였다. 다음의 완충액: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM NaEDTA에서 유사한 세척에 의해 세제 및 염이 제거되었다. 마지막으로, 봉입체를 30mg 부분 표본(aliquots)으로 나누고, $-70^{\circ}C$ 에서 동결시켰다. 봉입체 단백질 수율을 6M 구아니딘-염산(guanidine-HCl)로 가용화하여 정량하고, Hitachi U-2001 분광광도계(spectrophotometer)로 OD 측정을 하였다. 다음, 단백질 농도를 흡광 계수(extinction coefficient)를 사용하여 계산하였다.

[0104] 약 15mg의 TCR α 사슬 및 15mg의 TCR β 사슬 가용화된 봉입체를 동결 보존물로부터 해동시키고, 10ml의 구아니딘 용액(6M 구아니딘-염산, 50 mM Tris HCl pH 8.1, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM DTT)에 완전한 사슬 변성을 확실히 하기 위해, 희석시켰다. 완전히 환원되고 변성된 TCR 사슬을 함유하는 구아니딘 용액을 다음 0.5L의 리폴딩 완충액: 100 mM Tris pH 8.1, 400 mM L-아르기닌, 2 mM EDTA, 5 M Urea에 주입하였다. 변성된 TCR 사슬을 첨가하기 약 5분 전에, 각각 6.6 mM 및 3.7 mM의 최종 농도로 산화환원 쌍(시스테인 염산염 및 시스테인 중염산염)을 첨가하였다. 그 용액을 ~30분 동안 방치하였다. 리폴딩된 TCR을 18-20시간 동안, 10L의 H_2O 에 대하여 Spectrapor 1 멤브레인(스펙트럼; Product No. 132670) 안에서 투석하였다. 이 시간 후, 투석 완충액을 신선한 10 mM Tris pH 8.1 (10 L)로 두 번 바꾸고, 투석을 $5^{\circ}C \pm 3^{\circ}C$ 에서 다른 ~8시간 동안 계속하였다.

[0105] 투석된 리폴드를 POROS 50HQ 음이온 교환 컬럼에 장착하고, Akta 정화기 (GE Healthcare)를 사용하여 50 컬럼 부피 이상의 10 mM Tris pH 8.1에서 0-500 mM NaCl의 구배로 결합 단백질을 용리(eluting)함으로써, 분해 생성물 및 불순물로부터 가용성 TCR을 분리하였다. 피크 분획을 모으고 프로테아제 억제제(Calbiochem)의 혼합물을 첨가하였다. 다음, 모아진 분획을 $4^{\circ}C$ 에서 저장하고, 쿠마시-염색 SDS-PAGE(Coomassie-stained SDS-PAGE)로 분석한 후, 모으고 농축시켰다. 마지막으로, 가용성 TCR을 PBS 완충액(Sigma) 안에서 사전-평형화된 GE Healthcare Superdex 75HR 겔 여과 컬럼을 사용하여 정제하고 특성화하였다. BIAcore 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 특성화하기 전에 대략 50 kDa의 상대 분자량에서 용리하는 피크를 모으고 농축하였다.

[0106] 실시예 3- 결합 특성화

[0107] BIAcore 분석

[0108] 표면 플라즈몬 공명 바이오 센서(BIAcore 3000™)는 가용성 TCR이 그것의 펩타이드-MHC 리간드에 결합하는 것에 대한 분석에 사용될 수 있다. 이것은 스트렙타비딘-코팅 결합 표면(센서 칩)에 고정화될 수 있는 가용성의 바이오티닐화(Biotinylated) 펩타이드-HLA("pHLA") 복합체를 생성함으로써 촉진된다. 센서칩은 4개의 상이한 pHLA 복합체에 결합하는 T-세포 수용체의 동시 측정을 가능하게 하는 4 개의 개별 유동 세포를 포함한다. pHLA 복합체의 수동적 주입은 정확한 수준으로 고정화된 클래스 I 분자를 쉽게 조작하도록 해준다.

[0109] 바이오티닐화된 클래스 I HLA-A*0201 분자는 구성하는 서브 유닛 단백질 및 합성 펩타이드를 함유하는 박테리아 적-발현 봉입체로부터 생체 외에서 리폴딩되었고, 그 다음으로 정제 및 생체 외 효소적 바이오티닐화(O'Callaghan et al. (1999) Anal.Biochem. **266**: 9-15)되었다. HLA-A*0201- 무거운 사슬은, 적절한 구조 안에서 단백질의 막 전위 영역과 세포질 영역을 대체하는 C-말단 바이오티닐화 표지(tag)와 함께 발현되었다. ~75 mg/L 박테리아 배양의 봉입체 발현 수준이 얻어졌다. MHC 가벼운-사슬 또는 $\beta 2$ -마이크로글로불린은 또한 적절한 구조로부터 E.coli 안의 봉입체로 발현되었고, ~500 mg/L 박테리아 배양 수준이었다.

[0110] E. coli 세포를 용해시키고, 봉입체를 약 80% 순도로 정제하였다. 봉입체로부터의 단백질을 6M 구아니딘- HCl, 50mM Tris pH 8.1, 100mM NaCl, 10mM DTT, 10mM EDTA 안에서 변성시키고, 0.4 M L-아르기닌, 100 mM Tris pH 8.1, 3.7 mM 시스테인 중염산염, 6.6 mM 시스테인 염산염, HLA-A*02 분자에 운반되어야 하는 4 mg/L의 MAGE-A4 GVDGREHTV 또는 MAGE-B2 GVDGEEHSV 펩타이드에서, 30 mg/L 무거운 사슬, 30 mg/L $\beta 2m$ 농도로, $5^{\circ}C$ 미만 ($< 5^{\circ}C$)의 리폴딩 완충액 속으로 단일 펄스의 변성 단백질을 첨가함으로써, 리폴딩하였다. 리폴딩은 적어도 1 시간 동안 $4^{\circ}C$ 에서 완료될 수 있었다.

[0111] 10 mM Tris pH 8.1의 10 부피에서 투석에 의해 완충액을 교환하였다. 용액의 이온 강도를 충분히 줄이기 위해서는 두 가지 완충액의 변경이 필요했다. 그런 다음 단백질 용액을 1.5 μm 셀룰로스 아세테이트 필터를 통해 여과하고 POROS 50HQ 음이온 교환 컬럼(8ml 베드 부피)에 장착했다. 단백질을 Akta 정화기(GE Healthcare)를 사용

하여, 10 mM Tris pH 8.1에서 선형의 0-500 mM NaCl 구배로 용리시켰다. 약 250 mM NaCl에서 용리된 HLA-A*0201-펩타이드 복합체, 및 피크 분획을 수집하고, 프로테아제 억제제(Calbiochem)의 혼합물을 첨가하고 분획을 얼음 위에서 냉각시켰다.

[0112] 바이오틴-표지된 pHLA 분자를 동일한 완충액에서 평형화된 GE Healthcare 신속 탈염 컬럼(fast desalting column)을 사용하여, 10 mM Tris pH 8.1, 5 mM NaCl로 완충액 교환하였다. 용리 직후, 단백질-함유 분획을 얼음에서 냉각시키고, 프로테아제 억제제 혼합물(Calbiochem)을 첨가하였다. 다음, 바이오틴화 시약: 1mM 바이오틴, 5mM ATP (pH 8로 완충됨), 7.5mM MgCl₂, 및 5 μ M/ml BirA 효소(O'Callaghan 등. (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15에 따라 정제됨)을 첨가하였다. 다음, 혼합물을 실온에서 하룻밤 동안 배양시켰다.

[0113] 바이오틴화된 pHLA-A*0201 분자를 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. GE Healthcare Superdex 75 HR 10/30 컬럼을 여과된 PBS로 사전-평형화하고, 1 ml의 바이오틴화 반응 혼합물을 장착하고, Akta 정제기(GE Healthcare)를 사용하여 0.5 ml/분에서 PBS로 컬럼을 전개시켰다. 바이오틴화된 pHLA-A*0201 분자를 약 15 ml에서 단일 피크로서 용리시켰다. 단백질을 함유하는 분획을 모으고, 얼음에서 냉각시키고, 프로테아제 억제제 혼합물을 첨가하였다. 쿠마시(Coomassie)-결합 분석(PerBio)을 사용하여 단백질 농도를 결정하고, 바이오틴화된 pHLA-A*01 분자의 부분 표본(aliquot)을 -20°C에서 동결 보관하였다.

[0114] 이러한 고정화된 복합체는 T 세포 수용체 및 공수용체 CD8 α 모두와 결합할 수 있으며, 이들 모두는 가용성 상에 주입될 수 있다. 가용성 TCRs의 pHLA 결합 특성은 TCR이 가용성 또는 고정된 상에서 사용되는 경우, 정성 및 양적으로 유사한 것으로 관찰된다. 이것은 가용성 종(species)의 부분 활성화에 대한 중요한 조절이며, 또한 바이오틴화된 pHLA 복합체가 비-바이오틴화 복합체처럼 생물학적으로 활성을 갖는다는 것을 시사한다.

[0115] BIAcore 3000™ 표면 플라즈몬 공명(SPR) 바이오 센서는, 수용체 리간드 상호작용을 검출하고 친화도 및 운동 파라미터를 분석하는데 사용할 수 있는 원리인, 작은 흐름 세포 내의 센서 표면 근처의 반응 단위(RU)로 표현된 굴절률의 변화를 측정한다. BIAcore 실험을 단백질 샘플의 희석액을 제조하는데 있어서 실행 완충액으로서 PBS 완충액 (Sigma, pH 7.1-7.5)를 사용하여, 25°C 온도에서 수행하였다. 스트렙타비딘을 표준 아민 커플링 방법에 의해 유동 세포에 고정화시켰다. pHLA 복합체를 바이오틴 표지를 통해 고정화시켰다. 다음, 상이한 유동 세포의 표면에 일정한 유속으로 가용성 TCR을 통과시키고 SPR 반응을 측정함으로써, 분석을 수행하였다.

[0116] 평형 결합 상수

[0117] 상기 BIAcore 분석 방법을 사용하여 평형 결합 상수를 결정하였다. 기준 MAGE-A4 TCR의 이황화물 연결된 가용성 이중이량체 형태의 계열 희석을 제조하였고, 2개의 상이한 유동 세포에 대해 5 μ M min⁻¹의 일정 유속으로 주입하였다; 하나는 ~1000 RU의 특이적 GYDGREHTV HLA-A*0201 복합체로 코팅되었고, 두 번째는 ~1000 RU의 비특이적 복합체로 코팅되었다. 반응은 대조군 세포 측정값을 이용하여 각각의 농도에 대해 표준화되었다. 표준화된 데이터 반응을 TCR 샘플의 농도에 대하여 표시하고, 평형결합상수 K_D를 계산하기 위해 비선형 곡선 피팅 모델에 맞추었다(Price & Dwek, Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists(생물화학자를 위한 물리화학의 원리와 문제)(제2판) 1979, Clarendon Press, Oxford). 기준 MAGE-A4 TCR (실시예 2)의 이황화물 연결된 가용성 형태는 약 2.00 μ M의 K_D 값을 나타내었다. 동일한 BIAcore 데이터에서 T_{1/2}는 약 0.95 s이다.

[0118] 운동 파라미터(Kinetic Parameters)

[0119] 상기 위의 BIAcore 분석 방법은 또한 평형 결합 상수 및 오프-레이트 값을 결정하는데 사용되었다.

[0120] 고친화성 TCRs(하기 실시예 4 참조)에 대해, 해리 속도 상수 k_{off} 및 결합 속도 상수 k_{on}을 실험적으로 측정함으로써 K_D를 결정하였다. 평형 상수 K_D는 k_{off}/k_{on}으로 계산되었다.

[0121] TCR은 두 개의 다른 세포에 주입되었으며, 하나는 ~1000 RU의 특이적 GYDGREHTV HLA-A*0201 복합체로 코팅되었고, 두 번째는 ~1000 RU의 비특이적 복합체로 코팅되었다. 유속은 50 μ l/분으로 설정하였다. 전형적으로 ~1 μ M 농도에서 TCR 250 μ l가 주입되었다. 다음, 반응이 기준선(baseline)으로 돌아가거나 2시간을 초과하여 경과할 때까지 완충액을 흘려보냈다. 운동 파라미터를 BIAevaluation 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. 해리 상(phase)은 반감기의 계산을 가능하게 하는 단일 지수 붕괴 방정식(single exponential decay equation)에 맞춰졌다.

[0122] 실시예 4- 본 발명의 고친화도 TCRs의 제조

[0123] 실시예 1에서와 같이, TCR α -사슬과 β -사슬을 각각 함유하는 발현 플라스미드를 제조하였다:

TCR ID	알파 사슬 SEQ ID No	베타 사슬 SEQ ID No
TCR1 (부모)	3	4
TCR2	3	9
TCR3	7	9
TCR4	8	9

[0124]

[0125] 플라스미드를 *E. coli* 균주 BL21pLysS로 개별적으로 형질 전환시키고, 단일 암피실린 - 저항성 콜로니를 TYP(암피실린 100 $\mu\text{g/ml}$) 배지에서 37°C에서 ~0.6-0.8의 OD₆₀₀으로 성장시킨 다음, 0.5mM IPTG로 단백질 발현을 유도하였다. Beckman J-6B에서 4000rpm으로 30분 동안 원심 분리하여 3시간 유도 후 세포를 수확하였다. 세포 펠릿을 MgCl₂ 및 DNaseI 존재 하에 25 ml 버그 버스터(Bug Buster (Novagen))로 용해시켰다. 봉입체 펠릿을 Beckman J2-21 원심 분리기에서 13000rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 회수하였다. 세포 파편 및 멤브레인 성분을 제거하기 위해 3회의 세제 세척을 수행하였다. Beckman J2-21에서 13000rpm으로 15분 간 원심 분리하여 펠릿화 되기 전에, Triton 완충액(50mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5% Triton-X100, 200mM NaCl, 10mM NaEDTA)에서 매번 봉입체 펠릿을 균질화하였다. 다음, 완충액: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM NaEDTA에서 유사한 세척에 의해 세제 및 염을 제거하였다. 마지막으로, 봉입체를 30mg 부분 표본으로 나누고 -70°C에서 동결시켰다. 봉입체 단백질 수율을 6M 구아니딘-HCl로 가용화시킴으로써 정량화하였고, OD 측정을 Hitachi U-2001 분광 광도계 상에서 수행하였다. 단백질 농도는 흡광 계수를 사용하여 계산되었다.

[0126]

본 발명의 각각의 TCR에 대한, 약 10 mg의 TCR α 사슬 및 10 mg의 TCR β 사슬 가용화된 봉입체를, 완전한 사슬 변성을 보장하기 위하여, 10 ml의 구아니딘 용액 (6 M 구아니딘-염산염, 50 mM Tris HCl pH 8.1, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM DTT)에 희석시켰다. 완전히 환원되고 변성된 TCR 사슬을 함유하는 구아니딘 용액을 다음의 0.5L의 리폴딩 완충액: 100 mM Tris pH 8.1, 400 mM L-아르기닌, 2 mM EDTA, 5 M 요소에 주입하였다. 변성된 TCR 사슬의 첨가 전에, 각각 6.6 mM 및 3.7 mM의 최종 농도로 산화 환원 쌍(시스테인 염산염 및 시스테인 중염산염)을 약 5분 동안 첨가하였다. 용액을 ~30분 동안 방치하였다. 리폴딩된 TCR을 18-20시간 동안 10L의 H₂O에 대한 스펙트라포어 1 멤브레인(Spectrapor 1 membrane (스펙트럼; 제품 번호 132670))에 투석시켰다. 이 시간 후, 투석 완충액을 신선한 10 mM Tris pH 8.1 (10 L)로 두 번 바꾸고, 투석을 5°C $\pm$ 3°C에서 다른 ~8시간 동안 계속하였다.

[0127]

투석된 리폴드를 POROS 50HQ 음이온 교환 컬럼에 장착하고 Akta 정제기(GE Healthcare)를 사용하여 15 컬럼 부피 이상의 10 mM Tris pH 8.1에서 0-500mM NaCl 구배로 결합된 단백질을 용리함으로써, 가용성 TCR을 분해 생성물 및 불순물로부터 분리하였다. 다음, 모아진 분획을 4°C에서 저장하고, 쿠마시-염색 SDS-PAGE로 분석한 후, 모으고 농축시켰다. 마지막으로, 가용성 TCRs를 정제하고 PBS 완충액(Sigma)에서 사전 평형화된 GE Healthcare Superdex 75HR 겔 여과 컬럼을 사용하여 특성을 분석하였다. 약 50 kDa의 상대 분자량에서 용리되는 피크를 모으고, BIAcore 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 특성화하기 전에 농축시켰다.

[0128]

MAGE-A4 항원결정부 또는 MAGE-B2 항원결정부에 대한 이렇게 제조된 TCRs의 친화도 프로파일을 실시예 3의 방법을 사용하여 평가하고, 기준 TCR과 비교하였다. 결과는 다음 표에 설명되어 있다.

	MAGE A4 K _D (μM)	MAGE-B2 K _D (μM)
기준 (TCR1)	65.1	17
TCR2	17.2	197.5
TCR3	2.6	27.6
TCR4	5.1	52.6

[0129]

- [0130] 또한, SEQ ID Nos 10/11, 12/13, 14/15의 조합에 기초하여 고친화도의 TCRs를 제조하기 위해 시도를 하였다.
- [0131] SEQ ID No 10의 알파 사슬 및 SEQ ID No. 11의 베타 사슬을 조합하는 TCR A의 경우에, MAGE-A1, MAGE-A10 및 PRAME 사이의 교차-반응성을 주목하였다. 돌연변이 및 선택에 의해 상기 교차-반응성을 제거하는 것은 불가능하였다.
- [0132] TCR B는 SEQ ID No 12의 알파 사슬 및 SEQ ID No. 13의 베타 사슬을 조합한다. TCR B는 가용성 TCR을 형성하기 위해 폴딩될 수 없었으며, 따라서 결합 특징화는 불가능하였다.
- [0133] TCR C는 SEQ ID NO 14의 알파 사슬 및 SEQ ID No 15의 베타 사슬을 조합한다. 이러한 TCR은 발현될 때 가용성이었고, 항원에 결합될 수 있었다. 그러나, T-세포에서 발현되는 경우, TCR C는 활성을 보이지 않았다.
- [0134] **실시예 5- 부모 및 변이체 MAGE-A4 TCRs을 가진 T-세포의 형질 감염**
- [0135] (a) 293T 세포의 익스프레스-인(Express-In) 매개된 일시적 형질 감염에 의한 렌티바이러스 벡터(Lentiviral vector)의 제조
- [0136] 제 3 세대 렌티바이러스 패키징 시스템은 원하는 TCR을 암호화하는 유전자를 함유하는 렌티바이러스 벡터를 패키징하는데 사용되어왔다. 293T 세포를 4개의 플라스미드(실시예 5c(아래)에서 기술된 TCR 알파 사슬-P2A-TCR 베타 사슬 단일 ORF 유전자를 함유하는 렌티바이러스 벡터 1개, 및 감염성이지만 비복제적인 렌티바이러스 입자를 만드는데 필요한 다른 성분을 함유하는 3개의 플라스미드)를 가지고 익스프레스-인 매개된 형질 감염(Open Biosystems)을 사용하여 형질 감염시켰다.
- [0137] 형질 감염을 위해, 플레이트 위에 고르게 분포되고 그리고 50% 보다 약간 많은 융합성인 세포와 함께, 기하급수적 성장 단계의 293T 세포의 T150 플라스크 한 개가 취해졌다. 익스프레스-인 부분 표본을 실온으로 유지시켰다. 무-혈청 배지 3 ml (RPMI 1640 + 10 mM HEPES)를 무균 15 ml 코니컬 튜브에 넣었다. 174 μ l의 익스프레스-인 시약을 무-혈청 배지에 직접 첨가하였다 (이것은 시약 대 DNA를 3.6 : 1 중량비로 제공함). 이것을 3-4 번 튜브를 뒤집어 완전히 혼합하고, 5-20 분 동안 실온에서 배양하였다.
- [0138] 별도의 1.5ml 마이크로튜브에서, 15 μ g 플라스미드 DNA를 미리 혼합된 패키징 믹스 부분 표본(18 μ g pRSV.REV (Rev 발현 플라스미드), 18 μ g pMDLg/p.RRE (Gag/Pol 발현 플라스미드), 7 μ g pVSV-G (VSV 글리코프로테인 발현 플라스미드를 포함)에 통상 $\sim$ 22 μ l로 첨가하고, DNA 믹스의 동일성을 유지하기 위해 위 아래로 피펫팅하였다. 익스프레스-인/무-혈청 배지 약 1mL를 DNA 믹스에 드롭 방식으로 첨가한 다음, 부드럽게 위 아래로 피펫팅한 뒤, 익스프레스-인/무-혈청 배지의 나머지 부분으로 다시 옮겼다. 튜브를 3-4번 거꾸로 뒤집고 실온에서 15-30분 동안 배양하였다. 오래된 배양 배지를 세포의 플라스크로부터 제거하였다. 익스프레스-인/배지/DNA(3mL) 복합체를 293T 세포의 직립 플라스크의 바닥에 직접 첨가하였다. 천천히 플라스크를 평평하게 놓아 세포를 덮고, 매우 부드럽게 흔들어서 균일하게 분포시켰다. 1분 후 22 ml의 신선한 배양 배지(R10+HEPES: RPMI 1640, 10% 열-불활성화 FBS, 1% Pen/Strep/L-글루타민, 10 mM HEPES)를 첨가하고, 플라스크를 조심스럽게 배양기로 옮겼다. 이것을 37°C/5% CO₂에서 하룻밤 배양하였다. 24시간 후, 패키징된 렌티바이러스 벡터를 함유하는 배지를 수확하였다.
- [0139] 패키징된 렌티바이러스 벡터를 수확하기 위해, 세포 배양 상청액을 0.45 마이크론 나일론 주사기 필터를 통해 여과하고, 배양 배지를 10,000g에서 18시간 동안(또는 112,000 g에서 2시간 동안) 원심 분리하고, 대부분의 상청액을 제거하고(펠렛을 건드리지 않도록 주의를 기울임), 펠렛을 남는 수 mL의 상청액(보통 튜브 당 31ml로 시작하는 부피로부터 약 2ml)에서 재현탁하였다. 이것을 1ml의 부분 표본에서 드라이아이스로 급속 냉동시키고, -80°C에서 보관하였다.
- [0140] (b) 관심 유전자를 함유하는 패키징된 렌티바이러스 벡터를 가진 T 세포의 형질 도입
- [0141] 패키징된 렌티바이러스 벡터로 형질 도입(transduction)하기 전에, 건강한 지원자들의 혈액으로부터 인간 T 세포(필요에 따라 CD8 또는 CD4 또는 둘 다)를 분리하였다. 이들 세포 수를 세고, 세포 당 3개의 비드의 비율로, 미리 세척된 항 -CD3/CD28 항체- 코팅된 마이크로비드(Dynabeads® T 세포 익스팬더, Invitrogen)를 가진 48 웰 플레이트 안에서 1×10^6 cells/ml (0.5 mL/well)에서 50 U/mL IL-2를 함유하는 R10에서 하룻밤 동안 배양하였다.
- [0142] 하룻밤 동안 자극한 후, 깔끔한 패키징된 렌티바이러스 벡터 0.5 ml를 원하는 세포에 첨가 하였다. 이것을 37°C

/5% CO₂에서 3일 동안 배양하였다. 형질 도입 3일 후에 세포 수를 세고, 0.5x10⁶ cells/ml로 희석하였다. 필요에 따라 IL-2를 함유하는 신선한 배지를 첨가하였다. 비드를 형질 도입 후 5-7 일 후에 제거하였다. 세포 수를 세고 IL-2를 함유하는 새로운 배지를 2일 간격으로 대체하거나 첨가하였다. 세포를 0.5x10⁶ 및 1x10⁶ cells/mL 사이로 유지하였다. 세포를 3일째부터 유동세포계수법(flow cytometry)에 의해 분석하고, 5일째부터 기능 분석을 위해 사용하였다(예를 들어, IFN γ 방출을 위한 ELISpot, 실시예 6 참조). 10일째부터, 또는 세포가 분열을 늦추고 크기가 감소될 때, 보관을 위해 적어도 4x10⁶ cells/vial (90% FBS/10% DMSO에서 1x10⁷ cells/ml)의 부분 표본에서 세포를 동결시켰다.

실시예 6- MAGE A4 TCR 조작된 T 세포의 활성화

종양 세포주에 반응하여 TCR- 유도된 세포 독성 T 림프구 (CTLs)의 활성화를 입증하기 위해 다음의 분석을 수행하였다. ELISPOT 분석을 사용하여 측정된 것과 같이 IFN- γ 생성은, 세포 독성 T 림프구 (CTL) 활성화를 위한 판독 값(read-out)으로서 사용되었다.

ELISPOTs

시약

배지 분석: 10% FCS (Gibco, Cat# 2011-09), 88% RPMI 1640 (Gibco, Cat# 42401), 1% 글루타민(Gibco Cat# 25030) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco Cat# 15070-063).

세척 완충액: 0.01M PBS/0.05% Tween 20

PBS (Gibco Cat# 10010)

연관된 AEC 기질 세트(BD Bioscience, Cat# 551951)와 함께, 포획 및 검출 항체 및 인간 IFN- γ PVDF ELISPOT 96 웰 플레이트를 함유하는 인간 IFN γ ELISPOT 키트(BD Bioscience; Cat# 551849)

방법

표적 세포 준비

상기 방법에서 사용된 표적 세포는 본래의 항원결정부-제시 세포였다: A375 인간 흑색종 세포는 둘 다 HLA-A2⁺ MAGE A10⁺ 이다. HLA-A2⁺ MAGE A10⁻인, HCT116 인간 결장암을 음성 대조군으로서 사용하였다. 충분한 표적 세포 (50,000 cells/well)를 Megafuge® 1.0 (Heraeus)에서 10 분간 1200 rpm으로 3 회 원심 분리하여 세척하였다. 다음, 세포를 10⁶ cells/ml의 분석 배지에 재현탁시켰다.

작동체 세포(effector cells) 준비

상기 방법에 사용된 작동체 세포(T 세포)는, 건강한 지원자의 정맥 혈액에서 신선하게 분리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 유래한 CD14 및 CD25 마이크로비드 키트(각각 Miltenyi Biotech Cat# 130-050-201 및 130-092-983)를 사용하여 음성 선별에 의하여 얻어진, 말초 혈액 림프구(PBL)였다. 세포를 항 CD3/ CD28 코팅된 비드 (Dynabeads® T 세포 팽창제, Invitrogen)로 자극하였고, 관심 있는 전체 $\alpha\beta$ TCR (실시예 5에 기재되어 있는 구조체에 기초함)을 암호화하는 유전자를 가지는 렌티바이러스와 함께 형질 도입하였고, 형질 도입 후 10일 및 13일 사이가 될 때까지 50U/mL IL-2를 함유하는 분석 배지에서 팽창하였다. 다음, 이러한 세포들을 분석 배지에 옮기고, 다음 1200 rpm, 10분, Megafuge® 1.0 (Heraeus) 안에서 원심분리로 세척하였다. 다음, 세포들을 분석 배지에서 최종 요구 농도의 4배(4X)로 재현탁하였다.

플레이트를 다음과 같이 준비하였다: 100 μ L 항-IFN- γ 포획 항체를 플레이트 당 10 ml 멸균 PBS로 희석시켰다. 희석된 포획 항체 100 μ L를 각각의 웰에 분배하였다. 다음 플레이트를 하룻밤 동안 4°C에서 배양하였다. 배양 후, 플레이트를 세척하여(프로그램 1, 플레이트 유형 2, Ultrawash Plus 96-웰 플레이트 워셔, Dynex) 포획 항체를 제거하였다. 다음, 각각의 웰에 분석 배지 200 μ L를 첨가함으로써 플레이트를 차단하고, 2 시간 동안 실온에서 배양하였다. 다음, 분석 배지를 플레이트(프로그램 1, 플레이트 유형 2, Ultrawash Plus 96- 웰 플레이트 워셔, Dynex)로부터 세척하고, 종이 타월 상의 ELISPOT 플레이트를 가볍게 치고(flicking) 두드려서(tapping) 나머지 모든 배지를 제거하였다.

다음, 분석의 구성 성분을 ELISPOT 플레이트에 다음의 순서로 첨가하였다:

- [0158] 50 μ L의 표적 세포 10^6 cells/ml (총 50,000 표적 cells/ml을 제공함)
- [0159] 50 μ L 배지 (분석 배지)
- [0160] 50 μ L의 작동체 세포 (20,000 TCR-형질 도입 PBL cells/well)
- [0161] 다음, 플레이트를 하룻밤 동안 (37°C/5% CO₂) 배양하였다. 다음날, 플레이트를 세척 완충액을 사용하여 3회 세척하고(프로그램 1, 플레이트 유형 2, Ultrawash Plus 96- 웰 플레이트 워셔, Dynex), 과량의 세척 완충액을 제거하기 위해 종이 타월 위에서 가볍게 두드려 건조시켰다. 그 다음, 100 μ L의 1 차 검출 항체를 각각의 웰에 첨가하였다. 1차 검출 항체를 10 mL 의 희석 완충액(단일 플레이트에 필요한 부피)으로 제조사의 설명서에 명시된 희석법을 사용하여 희석시켰다. 다음, 플레이트를 실온에서 적어도 2 시간 동안 배양한 후, 세척 완충액으로 3 번 세척하였고(프로그램 1, 플레이트 유형 2, Ultrawash Plus 96- 웰 플레이트 워셔, Dynex), 종이 타월 위에서 플레이트를 가볍게 두드림으로써 과량의 세척 완충액을 제거하였다.
- [0162] 희석된 스트렙타비딘-HRP 100 μ L를 각각의 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 배양함으로써, 2 차 검출을 수행하였다. 스트렙타비딘-HRP를 제조사의 설명서에 명시된 희석법을 사용하여 10 mL 희석 완충액(단일 플레이트에 필요한 부피)으로 희석시켰다. 다음, 플레이트를 세척 완충액으로 3 회 세척하고 (프로그램 1, 플레이트 유형 2, Ultrawash Plus 96- 웰 플레이트 워셔, Dynex), 과도한 세척 완충액을 제거하기 위해 종이 타월 위에서 가볍게 두드렸다. 다음, 각각의 웰에 200 μ L를 첨가하고, 완충액을 가볍게 털어내고 타월 상에서 가볍게 두드림으로써 플레이트를 PBS로 2회 세척하여서, 과량의 완충액을 제거하였다. 사용 전 15 분 이내에 AEC 색소원(chromogen) 1방울 (20 μ L)을 각각 1 mL의 AEC 기질에 첨가하고 혼합하였다. 상기 용액 10mL를 각각의 플레이트에 대해 제조하였고, 웰당 100 μ L를 첨가하였다. 다음, 호일을 사용하여 플레이트를 빛으로부터 보호하고, 스폿(spot) 성장이 규칙적으로 관찰되었고, 보통 5-20분 내에 발생하였다. 플레이트를 수돗물로 세척하여 성장 반응을 종결시키고, 흔들어 건조시켜 3개의 구성 부분으로 분해하였다. 다음, 플레이트를 Immunospot® Plate 판독기 (CTL; Cellular Technology Limited)를 사용하여 스폿을 계수하기 전에 적어도 2 시간 동안 실온에서 건조시켰다.
- [0163] **실시예 7- 모든 대체 아미노산과의 치환에 의해 결합 모티프를 확인**
- [0164] 각각의 위치에서의 아미노산 잔기가 19개의 모든 대체가능한 자연 발생적인 아미노산으로 순차적으로 대체되는, 본래의 MAGE-A4 펩타이드의 변이체를 수득하였고, 총 171개의 펩타이드가 제조되었다. 항원 제시 세포 상에 본래의 및 아미노산 치환된 펩타이드를 펄스하였고, ELISpot 분석을 사용하여 측정한 것과 같이 인터페론 γ (IFN γ) 생산을 TCR4와 함께 형질 도입된 T 세포의 활성화를 위한 판독 값으로 사용하였다. 필수적인 위치는 본래의 펩타이드에 관하여 T 세포 활성이 50% 이상 감소한 것으로 정의되었다.
- [0165] ELISpot 분석은 실시예 6에 기재된 바와 같이 수행되었다.
- [0166] 펩타이드의 각각의 위치에서 허용되는 잔기를 아래에 나타낸다. 밑줄 친 아미노산은 펩타이드의 상응하는 위치에 있는 본래의 잔기를 나타낸다.

위치	허용되는 잔기
1	<u>G</u> H
2	<u>V</u> IL
3	<u>Y</u> VF
4	<u>D</u> N
5	<u>G</u> N
6	K <u>A</u> RGSCHTQM <u>F</u> VNLYI
7	SHQMEILWPYFATCNDGRKV
8	DSHQMEILWPYFATCNGRKV
9	SHQMEILWPYFATCNDGRKV
10	<u>V</u> FMAILT

- [0167]
- [0168] 따라서, 항원 제시 세포의 표면 상의 HLA-A*0201와 복합체일 때, 펩타이드 (SEQ ID no: 1)의 적어도 V2 Y3 및

D4와 MAGE A4 TCR4가 접촉하는 것은 명백하다.

- [0169] SEQ ID No.1 MAGE A4 항원결정부
- [0170] GVVDGREHTV
- [0171] SEQ ID No. 2 MAGE B2 항원결정부
- [0172] GGYDGEHHSV
- [0173] SEQ ID No. 3 알파 가변 사슬
- [0174] MKNQVEQSPQSLI ILEGKNTLQCNYTVSPFNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENKSNRGYATLADATKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTD~~SWGK~~
LQF
- [0175] SEQ ID No. 4 베타 가변 사슬
- [0176] MASLLFFCGAFYLLGTGSMADVTQTPNRNITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDPGLGLRLIYYSF~~DKD~~INKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSESAIP
NQTALYFCATSGQ~~GAYNEQFF~~
- [0177] SEQ ID No. 5 알파 사슬 가용성 형태
- [0178] MKKHLTTFVLVILWLYFYRNGNGKNQVEQSPQSLI ILEGKNTLQCNYTVSPFNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENKSNRGYATLADATKQSSLHITASQ
LSDSASYICVVSGGTD~~SWGK~~LQFGAGTQVVVTPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA~~VAWSNKS~~
DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS
- [0179] SEQ ID No 6 베타 사슬 가용성 형태
- [0180] MASLLFFCGAFYLLGTGSMADVTQTPNRNITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDPGLGLRLIYYSF~~DKD~~INKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSESAIP
NQTALYFCATSGQ~~GAYNEQFF~~FGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS~~WWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDS~~
RYCLSSRLRVSATFWQNP~~RNHFR~~CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV~~TQIVSAEAWGRAD~~
- [0181] SEQ ID No. 7 돌연변이의 알파 가변 사슬
- [0182] MKNQVEQSPQSLI ILEGKNTLQCNYTVSPFNLRWYKQDTGRGPVSL~~ITV~~TFSENKSNRGYATLADATKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTD~~SWGK~~
LQF
- [0183] SEQ ID No. 8 돌연변이의 알파 가변 사슬
- [0184] MKNQVEQSPQSLI ILEGKNTLQCNYTVSPFNLRWYKQDTGRGPVSL~~ITL~~TFSENKSNRGYATLADATKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTD~~SWGK~~
LQF
- [0185] SEQ ID No. 9 돌연변이의 베타 가변 사슬
- [0186] MASLLFFCGAFYLLGTGSMADVTQTPNRNITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDPGLGLRLIYYSF~~DKD~~INKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSESAIP
NQTALYFCATSGQ~~GAYNEQFF~~
- [0187] SEQ ID No. 10 알파 사슬 가용성 형태
- [0188] METLLGLLILWLQLQWVSSKQEV~~TQIP~~AALSVPEGENLVLCNSFTDSA~~YINLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPG~~
DSATYLCAVGGYSTLTFGKGT~~VLLVSPDN~~IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA~~VAWSNKSDFACA~~
NAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL~~SVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS~~
- [0189] SEQ ID No 11 베타 사슬 가용성 형태
- [0190] MSISLLCCAAFP~~LLWAGPVNAGVTQTPKFRILKIGQSM~~TLQCAQDMNHNYMYWYRQDPGMGLKL IYYSVGAGITDKGEVPNGYNVSRSTTE~~DFPLRLELAAP~~
SQT~~SVYFCASSYSRW~~SPLHFGNGTRLTVTEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS~~WWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSR~~
YCLSSRLRVSATFWQNP~~RNHFR~~CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV~~TQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRK~~
DF
- [0191] SEQ ID No. 12 알파 사슬 가용성 형태
- [0192] MQKEVEQNSGPLSV~~PEGA~~IASLNCTYSDRGSSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSL~~LIRDSQPSDSATYLCAVKMANQAGTAL~~
IFGKGT~~TLSSVSN~~IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSA~~VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS~~

PESS

[0193] SEQ ID No 13 베타 사슬 가용성 형태

[0194] MQDGGITQSPKFQVLRTGQSMITLLCAQDMNHEMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPGYNGVSRNLKREFSLRLESAAPSQTSVYFCASLGGLADE
QFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDP
RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRAD

[0195] SEQ ID No. 14 알파 사슬 가용성 형태

[0196] MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNDMDKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQT
GDSAIYFCAERNSGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD
FACANAFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

[0197] SEQ ID No 15 베타 사슬 가용성 형태

[0198] MGTSLLCWMLCCLLGADHDTGVSQNPRIKTRGQNVTFRCDPISSEHRLYWRQTLGQGPFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERPFGSFSTLEIQRTE
QGDSAMYLCASSLFSGVNTEAFFGQGTSLTVVEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN
DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRIKTRGQNVTFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMMAMV
KRKDF

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ADAPTIMMUNE LIMITED

<120> T CELL RECEPTORS

<130> P5486PC00

<140> PCT/EP2017/058580

<141> 2017-04-10

<150> GB 1606177.2

<151> 2016-04-08

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val

1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Val Tyr Asp Gly Glu Glu His Ser Val

1 5 10

<210> 3

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 3

Met Lys Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu

1 5 10 15

Gly Lys Asn Cys Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser

20 25 30

Asn Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu

35 40 45

Thr Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr

50 55 60

Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala

65 70 75 80

Ser Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Ser Gly Gly

85 90 95

Thr Asp Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe

100 105

<210> 4

<211> 123

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 4

Met Ala Ser Leu Leu Phe Phe Cys Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Gly Thr
1 5 10 15

Gly Ser Met Asp Ala Asp Val Thr Gln Thr Pro Arg Asn Arg Ile Thr
20 25 30

Lys Thr Gly Lys Arg Ile Met Leu Glu Cys Ser Gln Thr Lys Gly His
35 40 45

Asp Arg Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu
50 55 60

Ile Tyr Tyr Ser Phe Asp Val Lys Asp Ile Asn Lys Gly Glu Ile Ser
65 70 75 80

Asp Gly Tyr Ser Val Ser Arg Gln Ala Gln Ala Lys Phe Ser Leu Ser
85 90 95

Leu Glu Ser Ala Ile Pro Asn Gln Thr Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Thr
100 105 110

Ser Gly Gln Gly Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Phe
115 120

<210> 5

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 5

Met Lys Lys His Leu Thr Thr Phe Leu Val Ile Leu Trp Leu Tyr Phe
1 5 10 15

Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu
20 25 30

Ile Ile Leu Glu Gly Lys Asn Cys Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val
35 40 45

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

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

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

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

 Ser Pro Glu Ser Ser
 225
 <210> 6
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 6
 Met Ala Ser Leu Leu Phe Phe Cys Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Gly Thr

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

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

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

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

 225 230 235 240
 Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
 245 250 255

Ala Trp Gly Arg Ala Asp

260

<210> 7

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 7

Met Lys Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu

1 5 10 15

Gly Lys Asn Cys Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser

20 25 30

Asn Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu

35 40 45

Thr Ile Val Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr

50 55 60

Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala

65 70 75 80

Ser Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Ser Gly Gly

85 90 95

Thr Asp Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe

100 105

<210> 8

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 8

Met Lys Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu

1 5 10 15

Gly Lys Asn Cys Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser

20 25 30

Asn Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu

35 40 45

Thr Ile Leu Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr

50 55 60

Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala

65 70 75 80

Ser Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Ser Gly Gly

85 90 95

Thr Asp Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe

100 105

<210> 9

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 9

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

1 5 10 15

Gly Ser Met Asp Ala Asp Val Thr Gln Thr Pro Arg Asn Arg Ile Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ile Tyr Tyr Ser Phe Asp Val Lys Asp Ile Asn Lys Gly Glu Ile Ser

65 70 75 80

Asp Gly Tyr Ser Val Ser Arg Gln Ala Gln Ala Lys Phe Ser Leu Ser
85 90 95

Leu Glu Ser Ala Ile Pro Asn Gln Thr Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Thr
100 105 110

Ser Gly Gln Gly Ala Tyr Glu Glu Gln Phe Phe
115 120

<210> 10

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 10

Met Glu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Ile Leu Trp Leu Gln Leu Gln Trp
1 5 10 15

Val Ser Ser Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val
20 25 30

Pro Glu Gly Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala
35 40 45

Ile Tyr Asn Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr
50 55 60

Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg
65 70 75 80

Leu Asn Ala Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile
85 90 95

Ala Ala Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Gly
100 105 110

Gly Tyr Ser Thr Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Val Leu Leu Val Ser
115 120 125

Pro Asp Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp
130 135 140

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

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

Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 260 265 270

<210> 11

<211> 308

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 11

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

Lys Ile Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His
 35 40 45
 Asn Tyr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Lys Leu
 50 55 60

Ile Tyr Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Lys Gly Glu Val Pro
65 70 75 80
Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg
85 90 95
Leu Glu Leu Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser
100 105 110
Ser Tyr Ser Arg Trp Ser Pro Leu His Phe Gly Asn Gly Thr Arg Leu
115 120 125
Thr Val Thr Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
130 135 140
Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
145 150 155 160
Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
165 170 175
Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln
180 185 190
Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
195 200 205
Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
210 215 220
Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
225 230 235 240
Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
245 250 255
Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly
260 265 270
Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr
275 280 285
Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys
290 295 300
Arg Lys Asp Phe

305

<210> 12

<211> 208

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Lys Met Ala Asn

85 90 95

Gln Ala Gly Thr Ala Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Thr Leu Ser Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190
 Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
 195 200 205

<210> 13

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 13

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

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

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

165 170 175
Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser Ser

180 185 190
Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His Phe

195 200 205
Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr

210 215 220
Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp

225 230 235 240
Gly Arg Ala Asp

<210> 14

<211> 275

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110
 Arg Asn Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr
 115 120 125
 Lys Leu Ser Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr
 130 135 140
 Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr
 145 150 155 160
 Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val
 165 170 175

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

 Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile
 245 250 255
 Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu
 260 265 270
 Trp Ser Ser
 275
 <210> 15
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 15

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

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

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

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

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

245 250 255
Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr

260 265 270
Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly

275 280 285
Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala

290 295 300
Met Val Lys Arg Lys Asp Phe

305 310

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Val Val Asp Gly Arg Glu His Thr Val

1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Gly Val Tyr Asp Gly Ala Tyr Val Ser Val

1 5 10

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 18

Val Ser Pro Phe Ser Asn

1 5

<210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 19
 Leu Thr Ile Met Thr Phe
 1 5

<210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 20
 Leu Thr Arg Met Thr Phe
 1 5

<210> 21
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 21
 Leu Thr Ile Val Thr Phe
 1 5

<210> 22
 <211> 6
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 22

Leu Thr Ile Leu Thr Phe

1 5

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 23

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

1 5 10 15

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 24

Lys Gly His Asp Arg

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 25

Ser Val Phe Asp Lys

1 5

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<

223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 26

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

1 5 10

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 27

Cys Ala Thr Ser Gly Gln Gly Ala Tyr Arg Glu Gln Phe Phe

1 5 10

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Gly Val Asp Gly Lys Ser Asp Ser Val

1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 29

Ser Phe Asp Val Lys

1 5